



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANNA PAULA PERIN VIDIGAL**

**EFEITOS IDADE-DEPENDENTES DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELO  
ORGANOFOSFORADO TRIAZOFÓS SOBRE COMPORTAMENTOS  
RELACIONADOS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS**

VITÓRIA

2022

ANNA PAULA PERIN VIDIGAL

**EFEITOS IDADE-DEPENDENTES DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELO  
ORGANOFOSFORADO TRIAZOFÓS SOBRE COMPORTAMENTOS  
RELACIONADOS À ANSIEDADE E DEPRESSÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora: Profa. Dra. Vanessa  
Beijamini Harres**

**Coorientadora: Profa. Dra. Karla Nivea  
Sampaio**

VITÓRIA

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

V653e Vidigal, Anna Paula Perin, 1995-  
Efeitos idade-dependentes da intoxicação aguda pelo organofosforado triazofós sobre comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em ratos / Anna Paula Perin Vidigal. - 2022.  
79 f. : il.

Orientadora: Vanessa Beijamini Hares.  
Coorientadora: Karla Nivea Sampaio.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Depressão. 2. Ansiedade. 3. Organofosforado. 4. Triazofós. 5. Comportamento. 6. Bioquímica. I. Beijamini Hares, Vanessa. II. Sampaio, Karla Nivea. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615.1

---

Anna Paula Perin Vidigal

**Efeitos idade-dependentes da intoxicação aguda pelo organofosforado triazofós sobre comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado(a) em 24 de fevereiro de 2022.


**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Beijamini Harres (orientadora) - UFES**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valquíria Camin de Bortoli - UFES**

 Documento assinado digitalmente  
SIMONE PINTON  
Data: 03/03/2022 14:10:52-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Pinton - UNIPAMPA**

**Vitória/ES  
2022**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
VALQUIRIA CAMIN DE BORTOLI - SIAPE 1828879  
Departamento de Ciências da Saúde - DCS/CEUNES  
Em 03/03/2022 às 17:50

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/370145?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
VANESSA BEIJAMINI HARRES - SIAPE 1489959  
Departamento de Ciências Farmacêuticas - DCFA/CCS  
Em 04/03/2022 às 15:14

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/370854?tipoArquivo=O>

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me guiar durante esse caminho, por acalmar meu coração mesmo quando tudo parecia que nada iria funcionar. Ele sempre estava cuidando de cada passo para que tudo terminasse bem.

Aos meus pais, **Anna Claudia** e **Paulo Moises** pelo apoio incondicional e as incontáveis caronas que me deram para que eu pudesse concluir os experimentos.

Agradeço a **Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres** pela excelente orientação. Por me aguentar durante todos esses anos e ser dessas professoras que te faz evoluir a cada dia adquirindo além de conhecimento, ética e responsabilidade. Agradeço também a **Profa. Dra. Karla Nivea Sampaio** pelo apoio, por sempre estar disponível para tirar minhas dúvidas e pelos ensinamentos que me fizeram crescer.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas.

Agradeço também a todos os alunos que passaram pelos **Laboratório de Psicofarmacologia** e Investigação de **Farmacotoxicológica da Função Cardiovascular** durante os quase cinco anos em que trabalhamos juntos. Um agradecimento especial a **Julia Ayub** e ao **Vitor** que foram meu apoio emocional durante os últimos dois anos com nossas conversas e momentos de desabafo. E a **Gabriela, Raphael, Julia Gomes e João**, pois sem vocês para ajudar nos experimentos tudo seria muito mais complicado.

Ao Biotério central da UFES e ao **Rodolfo**, veterinário do mesmo que sempre esteve disponível para me auxiliar em tudo que fosse necessário

A **CAPES**, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Os compostos organofosforados (OF) são inibidores da acetilcolinesterase (AChE) amplamente utilizados na agricultura para o controle de pragas, principalmente em países em desenvolvimento. A exposição aos OF pode aumentar o risco de depressão, ansiedade e distúrbios cognitivos. As consequências comportamentais da intoxicação aguda por triazofós (TZF), um OF moderadamente tóxico, em testes relacionados à depressão e ansiedade ainda não foram investigadas. Os OF tendem a afetar animais jovens em maior extensão que os adultos. Portanto, nosso objetivo foi investigar se a exposição aguda ao TZF induziria diferentes perfis de alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão em ratos jovens e adultos. Para isso, ratos Wistar jovens (28 dias) e adultos (8 semanas) foram intoxicados agudamente (ip) com doses subletais de uma formulação comercial de TZF (doses de 3,75, 7,5 e 15 mg/kg para jovens e, 7,5, 15 e 30 mg/kg para adultos) ou tratados com solução salina (grupo controle). Os animais foram testados 24 horas após a intoxicação em um campo aberto (CA) e em labirinto em cruz elevado (LCE) para avaliação da atividade locomotora e comportamentos ansiosos. Grupos independentes de animais foram submetidos ao teste de nado forçado (TNF) 24 h, 8, 15 e 22 dias após a intoxicação para avaliar os efeitos comportamentais persistentes. Também avaliamos a atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal desses animais 24 h e 22 dias após a intoxicação. Em ratos adultos, o TZF 7,5 mg/kg aumentou a porcentagem de entradas, enquanto TZF 15 mg/kg diminuiu a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo efeito ansiolítico e ansiogênico, respectivamente. Nos animais jovens, apenas o TZF 3,75 mg/kg promoveu efeito ansiogênico. TZF comprometeu a locomoção no CA nos ratos jovens na maior dose. O TZF diminuiu a porcentagem de entradas no centro do CA na dose mais alta tanto em ratos jovens quanto em adultos. Nas doses mais altas, o TZF inibiu a AChE hipocampal e cortical em ratos jovens e adultos. Todas as doses de TZF aumentaram a frequência de imobilidade e reduziram a de natação no TNF 24 h após a intoxicação, sugerindo um efeito tipo-depressivo. Em ratos jovens, o TZF 15 mg/kg também diminuiu a frequência de escalada. O efeito tipo-depressivo persistiu por até 15 dias em animais jovens tratados com TZF 7,5 e 15 mg/kg e por 22 dias em animais adultos tratados com TZF 7,5 e 30 mg/kg. Nossos resultados demonstram que animais jovens e adultos apresentam diferentes padrões de alterações comportamentais mesmo com uma única exposição ao TZF, sugerindo que a intoxicação aguda é suficiente para causar danos a curto e longo prazo. Adicionalmente, a inibição da AChE cerebral não parece ser o único mecanismo responsável por esses comportamentos. Nossos resultados apontam a necessidade de monitoramento da saúde mental dos pacientes que sobrevivem à intoxicação aguda por OF.

**Palavras-chave:** Organofosforado, Triazofós, Ansiedade, Depressão, Labirinto em Cruz Elevado, Campo Aberto, Teste do Nado Forçado, Colinesterase.

## ABSTRACT

Organophosphate compounds (OP) are acetylcholinesterase (AChE) inhibitors widely used in agriculture for pest control, especially in developing countries. Exposure to OP can increase the risk of developing depression, anxiety and cognitive disorders. The behavioral consequences of acute triazophos (TZP) intoxication, a moderately toxic OP, in tests related to depression and anxiety have not yet been investigated. OP tend to affect juvenile animals to a greater extent than adults. Therefore, our objective was to investigate whether acute exposure to TZP would induce different profiles of behavioral changes related to anxiety and depression in juvenile and adult rats. For this, juvenile (28 days) and adult (8 weeks) male Wistar rats were acutely intoxicated (ip) with sublethal doses of a commercial formulation of TZP (doses of 3.75, 7.5 and 15 mg/kg for juveniles and, 7.5, 15 and 30 mg/kg for adults) or treated with saline solution (control group). The animals were tested 24 hours after intoxication in an open field (OF) and in an elevated plus maze (EPM) to assess locomotor activity and anxious behaviors. We also evaluated the activity of AChE in the hippocampus and cortex of these animals. An independent group of animals was subjected to the forced swim test (FST) 24 h, 8, 15 and 22 days after intoxication to assess persistent behavioral effects. In adult rats, TZP 7.5 mg/kg increased the percentage of entries, while TZP 15 mg/kg decreased the percentage of time spent in the open arms of the EPM, suggesting anxiolytic and anxiogenic effects, respectively. In juvenile animals, only TZP 3.75 mg/kg promoted anxiogenic effect. TZP impaired locomotion in the OF in juveniles at the highest dose. TZP decreased the percentage of OF center entries at the highest dose in both juvenile and adult rats. At the highest doses, TZP inhibited hippocampal and cortical AChE in both juvenile and adult rats. All doses of TZP increased immobility and reduced swimming frequency in the FST 24 h after intoxication, suggesting a depressive-like effect. In juvenile rats, TZP 15 mg/kg also decreases climbing frequency. The depressive-like effect of TZP persisted for up to 15 days in juvenile animals treated with TZP 7.5 and 15 mg/kg and for 22 days in adult animals treated with TZP 7.5 and 30 mg/kg. Our results demonstrate that juvenile and adult animals present different patterns of behavioral changes after a single TZP exposure, suggesting that acute intoxication is sufficient to cause short- and long-term damage. Additionally, AChE inhibition seems not to be the only mechanism underlying these behavioral effects. Our results point to the need for monitoring the mental health of patients who survive an acute OP intoxication.

**Keywords:** Organophosphate, Triazophos, Anxiety, Depression, Elevated Plus-Maze, Open-Field Test, Forced Swimming Test, Cholinesterase

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Histórico de comercialização de agrotóxicos no Brasil entre 2000 e 2019.....	17
<b>Figura 2:</b> Estrutura geral dos organofosforados.....	18
<b>Figura 3:</b> Estrutura química dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico.....	18
<b>Figura 4:</b> Estrutura do organofosforado Triazofós.....	19
<b>Figura 5:</b> Figura esquemática da neurotransmissão colinérgica em ausência ou presença de inibidores da acetilcolinesterase.....	21
<b>Figura 6:</b> Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase.....	23
<b>Figura 7:</b> Inibição da acetilcolinesterase pelo organofosforado.....	23
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do protocolo geral.....	38
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática do Labirinto em Cruz Elevado.....	39
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do Teste do Campo Aberto.....	40
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática do Teste do Nado Forçado.....	41
<b>Figura 12:</b> Representação esquemática dos comportamentos ativos e passivo no Teste do Nado Forçado.....	42
<b>Figura 13:</b> Resultados do Labirinto em Cruz elevado.....	47
<b>Figura 14:</b> Resultados do Teste do Nado Forçado em ratos jovens.....	50
<b>Figura 15:</b> Resultados do Teste do Nado Forçado em ratos adultos.....	51
<b>Figura 16:</b> Atividade da Butirilcolinesterase .....	52
<b>Figura 17:</b> Atividade da Acetilcolinesterase em ratos jovens.....	54
<b>Figura 18:</b> Atividade da Acetilcolinesterase em ratos adultos .....	55

## LISTA DE TABELAS E FÓRMULAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação de toxicidade.....	18
<b>Tabela 2:</b> Sinais e sintomas da intoxicação aguda por organofosforados.....	25
<b>Tabela 3:</b> Efeitos da intoxicação aguda por triazofós na atividade locomotora de ratos jovens e adultos no teste de campo aberto 24 h após a administração.....	48

## **LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS**

5-HT – Serotonina

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BChE – Butirilcolinesterase

CA – Campo aberto

CEUA-UFES – Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFES

Ch – Colina

ChE – Colinesterase

DA – Dopamina

DL50 – Dose Letal 50

DTNB – Ácido ditiobisnitrobenzóico

EC50 – Concentração Efetiva 50

EPM – Erro Padrão da Média

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

i.p. – Intraperitoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

mAChR – Receptor muscarínico

nAChR – Receptor nicotínico

NaCl – Cloreto de Sódio

PON1 - Paraoxonase-1

OF – Organofosforado

OMS – Organização Mundial de Saúde

SAL – Salina

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas;

SNA – Sistema Nervo autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TOXCEN – Centro Toxicológico do Espírito Santo

TNF – Teste do Nado Forçado

TZF – Triazofós

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS.....	16
1.2 TRIAZOFÓS.....	19
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS .....	21
1.4 QUADRO CLÍNICO DAS INTOXICAÇÕES POR ORGANOFOSFORADOS .....	24
1.5 ORGANOFOSFORADOS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS .....	25
1.6 INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE AS CONSEQUÊNCIAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS A INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS .....	28
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	33
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 ANIMAIS .....	35
4.2 DROGA.....	35
<b>4.2.1 Preparo das soluções</b> .....	35
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS.....	36
4.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA .....	38
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	39
<b>4.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)</b> .....	39
<b>4.5.2 Campo Aberto (CA)</b> .....	39
<b>4.5.3 Teste do Nado Forçado</b> .....	40
4.6 DOSAGENS ENZIMÁTICAS.....	42
<b>4.6.1 Atividade da Colinesterase Plasmática (BChE)</b> .....	42
<b>4.6.2 Preparo da amostra para determinação da atividade da colinesterase     cerebral</b> .....	43
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>
<b>ANEXOS 1</b> .....	<b>75</b>
<b>APÊNDICE 1</b> .....	<b>76</b>

# INTRODUÇÃO

## 1. INTRODUÇÃO

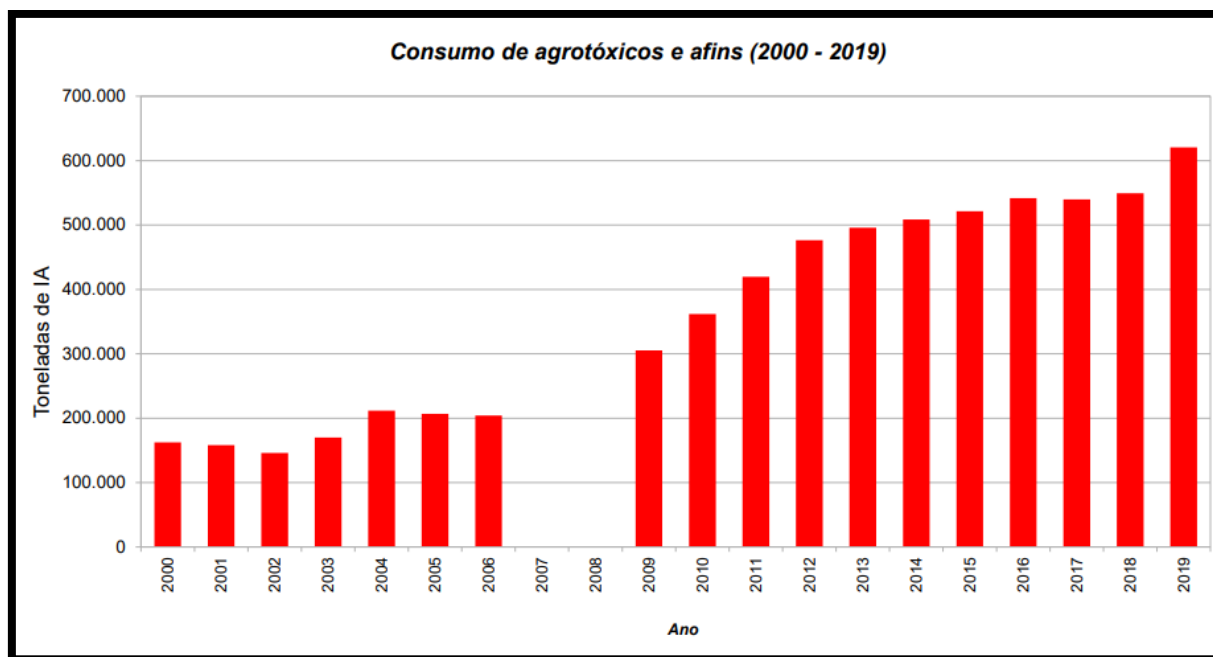
### 1.1 AGROTÓXICOS ORGANOFOSFORADOS

Os agrotóxicos são substâncias introduzidas na agricultura com o objetivo de facilitar o manejo agrícola, controlar doenças e aumentar a produtividade. Existem terminologias utilizadas para definir esse grupo de substâncias. Defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, biocidas, sendo cada um desses termos utilizado por uma parcela da sociedade de acordo com a visão que se tem a respeito da importância desses produtos. A indústria, por exemplo, utiliza o termo “defensivo agrícola”, pois entende que esse produto exclusivamente defende ou protege os produtos agrícolas. Em contrapartida, a legislação Brasileira adota o termo “agrotóxico”, que significa “tóxico de uso agrícola”, com a intenção de adicionar maior peso a esse tipo de produto, uma vez que, sabidamente, os agrotóxicos causam danos a população (MORAGAS, W.; SCHNEIDER; MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Segundo o artigo 2º da lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, são considerados agrotóxicos:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; (BRASIL, 1989)

No Brasil, o consumo dessas substâncias teve um aumento significativo nos anos de 2000 a 2019. Como observado (Figura 1), durante esse período, as 100.000 toneladas consumidas passaram a ser mais de 500.000 toneladas de produtos tóxicos (IBAMA, 2020). Esse aumento explica o porquê desde 2009 o país é dito como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (BOMBARDI, 2012). Excepcionalmente em 2019 o aumento no consumo superou 600.000 toneladas de produtos agrícolas provavelmente devido ao aumento na liberação e comercialização de agrotóxicos nos últimos anos.



**Figura 1:** Histórico de comercialização de agrotóxicos no Brasil entre 2000 e 2019 Fonte: IBAMA, 2020.

Em 2014, a incidência de casos de intoxicação por agrotóxicos no Estado do Espírito Santo era de 16,32 casos a cada 100 mil habitantes, muito acima da média nacional de 6,26 casos a cada 100 mil habitantes (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Além disso, 5 municípios do Espírito Santo ficaram entre os 50 do país com maior incidência de notificação de intoxicações por agrotóxicos no ano de 2014 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

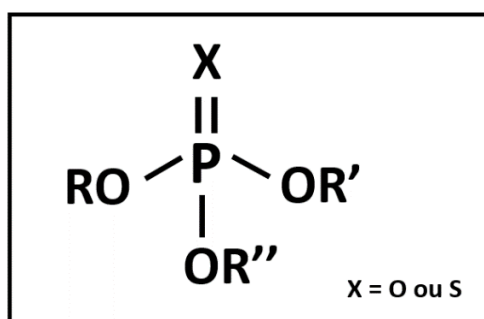
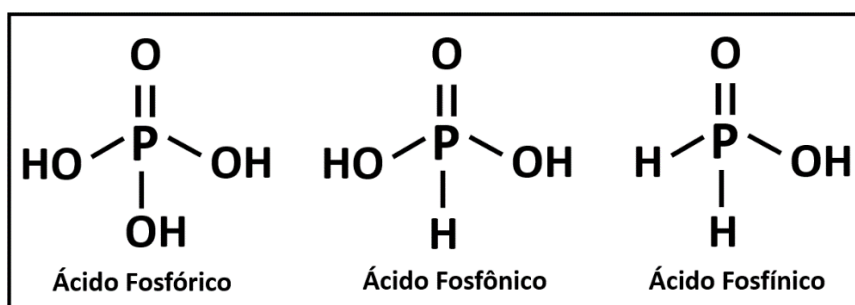
O crescimento do consumo desse tipo de substância é preocupante, pois juntamente com ele existe uma maior chance de exposição e risco de envenenamento (ARAÚJO et al., 2007; MEW et al., 2017; RECENA; PIRES; CALDAS, 2006). Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) corroboram essa afirmativa, uma vez que, no ano de 2016, os agrotóxicos ocuparam o segundo lugar dentre os casos registrados de intoxicação humana por exposição ocupacional, além de também ocupar o segundo lugar entre os casos de tentativa de suicídio por produtos tóxicos (SINITOX, 2016).

Em função da toxicidade aguda, a ANVISA (2016) definiu que os agrotóxicos devem ser classificados e identificados em uma das cinco categorias de acordo com o grau de toxicidade, sendo cada uma delas representada por uma cor diferente (Tabela 1).

**Tabela 1:** Classificação de Toxicidade. ANVISA, 2016 (adaptado)

<b>Categoria</b>	<b>Toxicidade</b>	<b>Cor da Faixa</b>
<b>1</b>	Extremamente Tóxico	Vermelha
<b>2</b>	Altamente Tóxico	Vermelha
<b>3</b>	Moderadamente Tóxico	Amarela
<b>4</b>	Pouco Tóxico	Azul
<b>5</b>	Improvável de Causar Dano Agudo	Azul
<b>Não Classificado</b>	Não Classificado	Verde

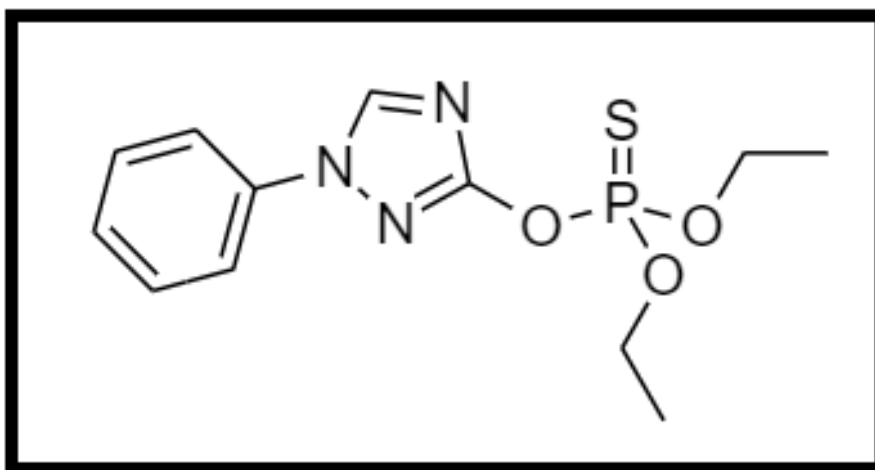
Os organofosforados (OF, figura 2) representam uma classe química de substâncias comumente utilizadas na agricultura como pesticidas e inseticidas em diversos países, sobretudo aqueles em desenvolvimento, assim como o Brasil. A palavra OF é genericamente utilizada para definir diversos produtos químicos derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico representados na figura 3 (TERRY; 2012).

**Figura 2:** Estrutura geral dos Organofosforados. Elaborada pela autora.**Figura 3:** Estrutura química dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico. Elaborada pela autora.

O surgimento dos OF ocorre em meados do século XIX. Costuma-se atribuir ao químico Philippe de Clermont a síntese do primeiro composto OF inibidor de colinesterases em 1854 (COSTA, 2018; PETROIANU et al., 2015). Contudo, foi a partir da década de 80 que os OF se tornaram a principal classe de substâncias usada para o controle de pragas de agricultura em todo o mundo (STEPHENS et al., 1995).

## 1.2 TRIAZOFÓS

O Triazofós [O,O-dietil O-1-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-il forforotioato] (Figura 4) é um inseticida e acaricida OF de amplo espectro não sistêmico extensivamente utilizado em práticas agrícolas (SHARMA; SANGHA, 2014). A dose letal mediana (DL50) do composto por via oral em ratos é de 59 mg/kg (CHANDRA et al., 2014) e a dose máxima tolerada via intraperitoneal é de 30 mg/kg (SINGH; RISHI, 2005).



**Figura 4:** Estrutura do organofosforado Triazofós. Elaborada pela autora.

O composto anteriormente classificado pela ANVISA (2016) como um pesticida moderadamente tóxico em classificação toxicológica, de acordo com a nova legislação é definido como sendo moderadamente tóxico (faixa amarela).

Quimicamente o triazofós é semelhante a outro OF, o clorpirifós. Assim como este último, o triazofós também é um agrotóxico comercializado em sua forma não ativa (tiofosforado) e precisa ser biotransformado no organismo para se tornar ativo.

A conversão a oxon (molécula ativa) é feita pela enzima CYP450 (YANG et al., 2019). O triazofós também pode ser convertido a 1-fenil-3-hidroxi-1,2,4-triazol metabolito

inativo a ser eliminado. Essa conversão pode ser feita tanto pela clivagem direta do triazofós tiofosforado ou pela hidrólise do oxon realizada pela enzima paraoxonase 1 (PON-1) (ROBERTS T.R., HUTSON D.H., 1999).

O triazofós é altamente tóxico para a maioria dos peixes e mariscos (YANG et al., 2011) e se acumula facilmente no ambiente devido à sua estabilidade relativamente alta e longa meia-vida, e, portanto, apresenta risco potencial à saúde humana (WU et al., 2016). Devido a essas características de estabilidade o triazofós passou a ser proibido em países da União Europeia em 2002 (COMMISSION, 2002), bem como retirado de comercialização na China em 2013 com o objetivo de proteger a segurança agrícola, manter a qualidade dos produtos prevenir a saúde da população (MOA CHINA, 2013).

Não obstante, a presença do agrotóxico em água também foi avaliada em sua forma comercial. Testes utilizando o Hostathion (triazofós 40 EC) demonstraram que o produto se manteve presente em água por até noventa dias com taxa de dissipação de 91,7% na Índia (RANI; MADAN; KATHPAL, 2001).

Além disso, a Índia foi alvo de um recente surto repentino de intoxicação por triazofós, no qual centenas de pacientes apresentaram sintomas neurológicos como convulsões, perda de consciência, os quais foram atribuídos a contaminação de uma fonte de água pelo OF (MUMMADI et al., 2021).

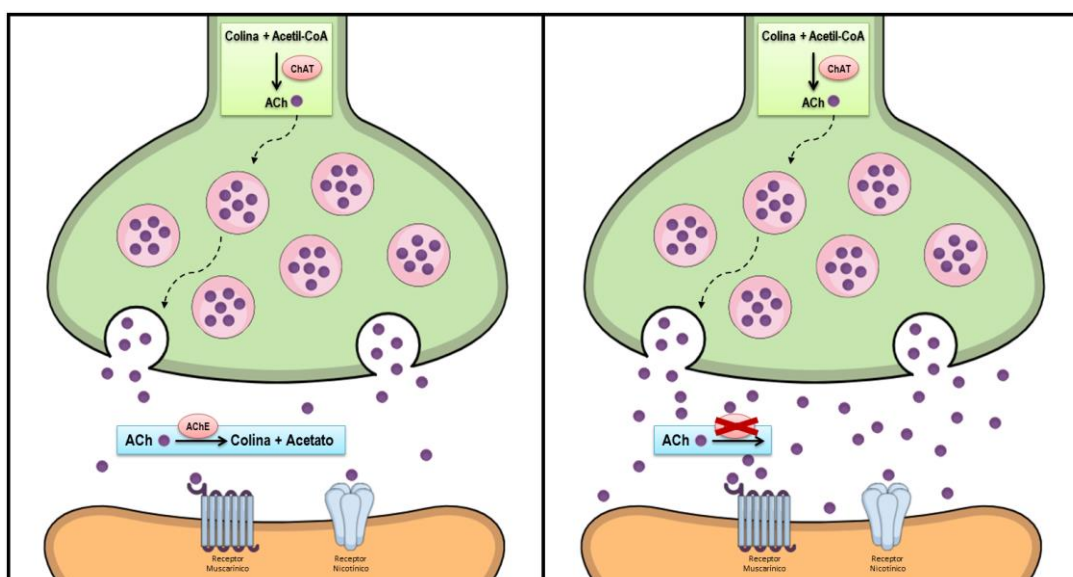
É importante ressaltar que mesmo com a proibição em diversos países por sua toxicidade elevada, o triazofós continua liberado para comercialização no Brasil pela instrução normativa - IN nº 103, de 19 de outubro de 2021 (ANVISA, 2021) e segue sendo utilizado em grande escala nas plantações bem como sendo uma fonte de contaminação.

Estudos realizados nas plantações do Espírito Santo demonstraram a presença do contaminante em água em concentrações superiores a Concentração Efetiva 50 (EC50) do agrotóxico para invertebrados aquáticos e algas (DE QUEIROZ et al., 2018).

### 1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS

A maioria dos OF são bastante lipofílicos e não ionizados, características que favorecem a absorção dessas substâncias pelo sistema respiratório e pelo trato gastrointestinal (VALE, 1998). A biotransformação desses compostos tende a produzir metabólitos mais polares e com toxicidade aumentada (JOKANOVIĆ, 2001).

O mecanismo de ação dos OF está principalmente relacionado com a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), principal enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) (MILESON et al., 1998), primeira molécula a ser definida como neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central (SNC) (VAN DER ZEE; LUITEN, 1999) e do sistema nervoso periférico (SNP) dos vertebrados (MILESON et al., 1998; Figura 5).



**Figura 5:** Figura esquemática da neurotransmissão colinérgica em ausência ou presença de inibidores da acetilcolinesterase. Elaborada pela autora.

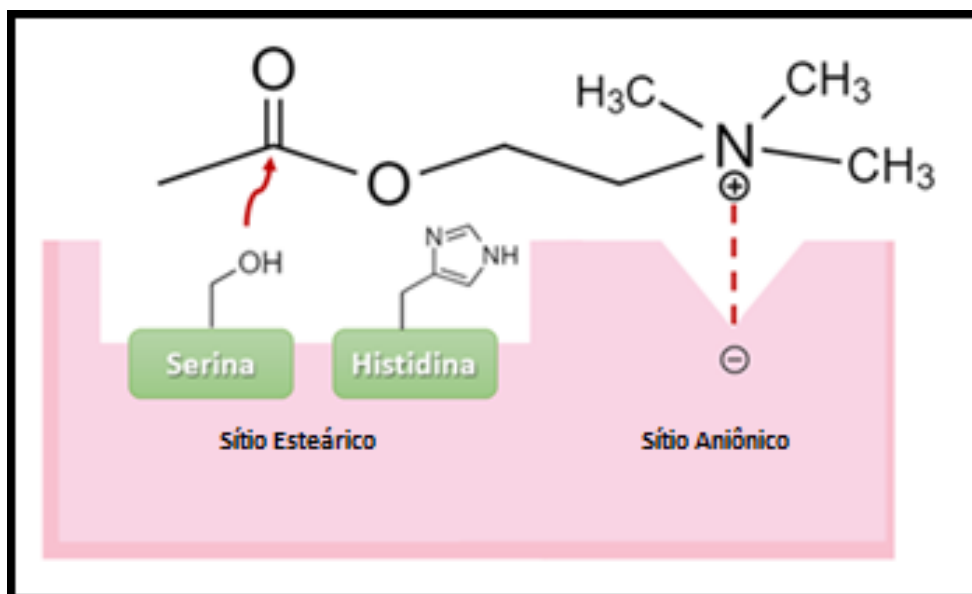
A síntese da ACh ocorre pela transferência de um grupamento acetil, proveniente de uma molécula de acetil coenzima-A a uma molécula de colina (Ch). Essa reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) que se encontra no citoplasma de terminais pré-sinápticos colinérgicos. Em seguida, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas pela ação do transportador de ACh até que sua liberação na fenda sináptica seja necessária (DEIANA; PLATT; RIEDEL, 2011; PARSONS, 2000). A AChE é a enzima responsável por catalisar a hidrólise da ACh em Ch e acetato na

fenda sináptica. Sendo assim, a enzima é a responsável por tornar a ativação promovida pela ACh nos receptores colinérgicos temporária (MILESON et al., 1998).

A AChE, presente nos eritrócitos e nas terminações nervosas, é uma enzima que integra a família das colinesterases (POHANKA, 2011), da qual também faz parte a butirilcolinesterase (BChE). A BChE, conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática, possui afinidade por diversos substratos, diferentemente da AChE que possui maior afinidade pela ACh (POHANKA, 2011). Por mais que a hidrólise da ACh ocorra predominantemente pela ação da AChE, a hidrólise deste neurotransmissor também pode acontecer pela ação da BChE (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989).

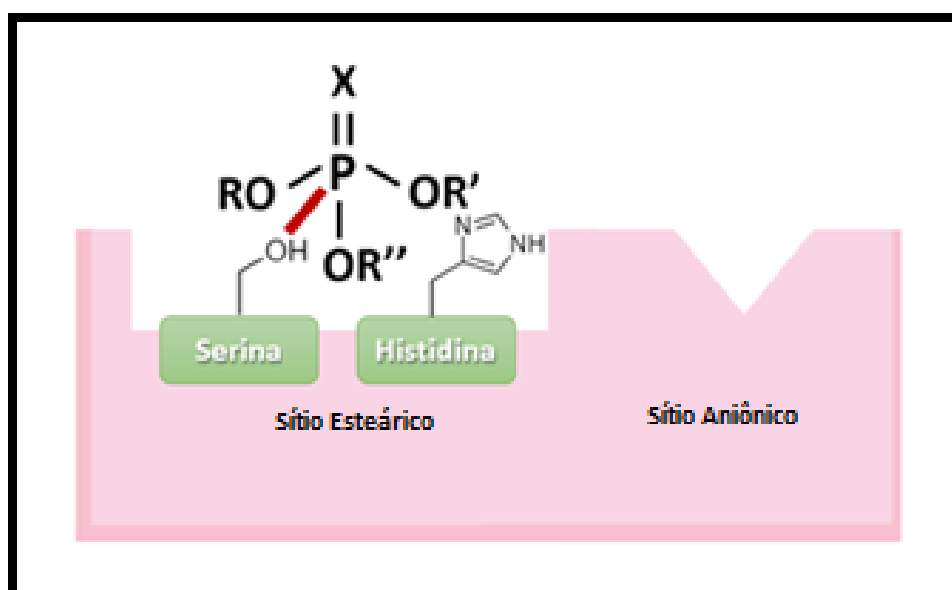
Apesar da BChE não apresentar um papel biológico bem definido, a atividade da BChE plasmática é considerada um bom marcador da exposição à maioria dos OF ou outros inibidores das colinesterases, pois sua atividade é facilmente dosada em amostras de plasma. Entretanto, sua atividade parece não apresentar relação direta com a gravidade da intoxicação (EDDLESTON et al., 2008).

Os OF agem de forma não seletiva sobre as colinesterases, promovendo uma ligação covalente e forte ao sítio catalítico dessas enzimas (COLOVIĆ et al., 2013). A hidrólise da ACh pela AChE depende dos resíduos de histidina e serina, o primeiro funciona como um catalisador ácido-base, e o segundo atua como um nucleófilo. Para que ocorra a hidrólise da ACh, é necessário que o resíduo de serina interaja com a carbonila da ACh (Figura 6). O par de elétrons livres presente no resíduo de serina ataca a carbonila do neurotransmissor, em seguida, a histidina protonada atua como um ácido, doando um próton para a porção colina da ACh que é, então, liberada e recaptada pelo neurônio pré-sináptico (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).



**Figura 6:** Hidrólise da acetilcolina pela acetilcolinesterase. Elaborada pela autora.

Na presença de um OF, a serina é fosforilada (Figura 7). Uma vez fosforilada, a enzima pode hidrolisar o OF lentamente, o que leva à reativação espontânea da enzima, ou ao processo de envelhecimento da enzima (perda total da função) ao reagir com uma molécula de água e ocorrer a desalquilação do grupo alcóxila que está ligado ao átomo de fósforo do OF, inibindo a enzima irreversivelmente (ASSIS et al., 2018; SANTOS et al., 2007).



**Figura 7:** Inibição da acetilcolinesterase pelo Organofosforado. Elaborada pela autora.

#### 1.4 QUADRO CLÍNICO DAS INTOXICAÇÕES POR ORGANOFOSFORADOS

O quadro clínico resultante da intoxicação aguda por OF é dividido em três fases: síndrome colinérgica aguda, síndrome intermediária e neuropatia tardia induzida por OF (JOKANOVIĆ, 2018).

A síndrome colinérgica aguda acontece durante as primeiras horas (4-6) de intoxicação. Essas manifestações clínicas são consideradas as mais críticas em um caso de intoxicação, uma vez que, é durante esse período que se tem a maior possibilidade de evolução para morte. Em casos nos quais o tratamento é feito de maneira rápida e eficiente, é muito provável que o paciente sobreviva (HOLSTEGE; DOBMEIER; BECHTEL, 2008). As manifestações clínicas da síndrome colinérgica são respostas diretas a inibição das colinesterases e conseqüentemente o acúmulo de ACh (STORM, 2012). O excesso de ACh ocasiona um aumento na ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos, o que altera a função do sistema nervoso autônomo (SNA), dos neurônios motores e do SNC (MILESON et al., 1998).

O SNA controla as funções viscerais do corpo e é dividido nas divisões parassimpática e simpática. Os neurônios pós-ganglionares da divisão parassimpática liberam a ACh que atua nos receptores muscarínicos em órgãos efetores, como coração, olhos, glândulas, trato gastrointestinal e sistema respiratório (MILESON et al., 1998).

Por outro lado, também ocorre a ativação de receptores nicotínicos localizados nos gânglios das divisões parassimpáticas e simpáticas do SNA e nas junções neuromusculares. Neurônios motores somáticos controlam funções voluntárias, incluindo locomoção, respiração e postura. Os axônios dos neurônios motores inervam diretamente as células musculares na junção neuromuscular, liberando a ACh para atuar nos receptores nicotínicos (MILESON, 1998).

As vias colinérgicas no SNC, por sua vez, estão associadas ao controle de uma ampla variedade de comportamentos e funções fisiológicas, incluindo fome e sede, termorregulação, respiração, agressão e cognição (MILESON et al., 1998).

Os sinais e sintomas causados pela intoxicação aguda por OF foram resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Sinais e sintomas da intoxicação aguda por organofosforados.

<b>Receptores Nicotínicos</b>	<b>Receptores Muscarínicos</b>	<b>Sistema Nervoso Central</b>
Taquicardia	Lacrimejamento	Êmese
Hipertensão	Salivação	Convulsões
Fasciculação	Broncoconstrição	Confusão mental
Tremores	Broncossecreção	Depressão do sistema respiratório
Fraqueza muscular	Miose	Letargia
Paralisia flácida	Diarreia	Inquietação
	Micção	Fraqueza generalizada
	Bradycardia	Coma
	Cólicas gastrointestinais	Ataxia

**Fonte:** Adaptado de (MILESON, 1998) e (STORM, 2012)

A segunda fase de uma intoxicação aguda por OF é a síndrome intermediária, que tem seu início de 24 a 96 h depois da intoxicação. Na síndrome intermediária, 20 a 50% dos pacientes são sintomáticos. Durante essa fase, ocorre uma aparente recuperação dos sinais colinérgicos (SENANAYAKE; KARALLIEDDE, 1987). Nesses casos, é comum a presença de fraqueza da musculatura respiratória e de membros proximais (JAYAWARDANE et al., 2008; KARALLIEDDE; BAKER; MARRS, 2006).

Em último caso, a intoxicação pode evoluir para a neuropatia tardia induzida por OF, que pode persistir por semanas ou anos. Acredita-se que os OF são capazes de inibir algumas esterases neuronais específicas (JOHNSON, 1969; KARALLIEDDE; SENANAYAKE, 1989). Essa neuropatia pode surgir tanto por uma exposição crônica aos OF quanto pela exposição única a estes agentes (CLARK, 2006).

### 1.5. ORGANOFOSFORADOS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Alguns estudos clínicos evidenciaram que a exposição a inibidores da AChE, tais como os OF, é capaz de provocar alterações cognitivo-comportamentais como depressão, aumento das tentativas de suicídio, ansiedade e comprometimento cognitivo (BESELER et al., 2006; DAVIES, 2000; JAGA; DHARMANI, 2007; ROSENSTOCK et al., 1991; SAVAGE et al., 1988; STALLONES; BESELER, 2002). Existe uma aparente relação entre a exposição crônica aos OF e a alta incidência de

tentativas de suicídio em todo o mundo, sobretudo pela indução de distúrbios afetivos (JAGA; DHARMANI, 2007; LONDON et al., 2005).

Além disso, sabe-se que trabalhadores rurais e agricultores são populações susceptíveis a apresentar ansiedade, distúrbios na memória, irritabilidade, nervosismo e agressividade relacionadas a constante exposição aos OF (JOUBERT; JOUBERT, 1988; LONDON et al., 2005; ROHLMAN et al., 2007; STEENLAND et al., 2000; ZHANG et al., 2016). Um maior percentual de ansiedade e depressão foi observado em criadores de ovelhas cronicamente expostos a OF quando comparados com indivíduos não expostos (MACKENZIE ROSS et al., 2010; STEPHENS et al., 1995). No mesmo sentido, um risco aumentado de depressão (BESELER et al., 2008), suicídio (PARRÓN; HERNÁNDEZ; VILLANUEVA, 1996; WESSELING et al., 2010) e ansiedade (HARRISON; MACKENZIE ROSS, 2016) também foi descrito entre indivíduos cronicamente expostos à OF.

Estudos em roedores evidenciam aparecimento de alterações comportamentais após exposição crônica ao clorpirifós em diferentes protocolos. Esses trabalhos demonstraram que esse OF é capaz de induzir um efeito ansiogênico em um modelo animal de ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) (BRAQUENIER et al., 2010; SÁNCHEZ-AMATE; FLORES; SÁNCHEZ-SANTED, 2001; (SILVA et al., 2017) Distúrbios comportamentais relacionados a depressão também podem ser evidenciados. Por exemplo, ratos adolescentes tratados diariamente com clorpirifós por via subcutânea apresentaram aumento do tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (TNF) (CHEN et al., 2011). Lima e colaboradores (LIMA et al., 2009) também observaram que a administração repetida do OF metamidofós induz efeito tipo-depressivo em animais testados em tanto no TNF quanto no teste de suspensão de cauda. Também foi observado que a exposição repetida ao metamidofós é capaz de aumentar a agressividade de camundongos (DO NASCIMENTO et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar os prejuízos que podem ser causados nos sistemas biológicos pelo contato com agrotóxicos, nosso grupo tem investigado as alterações comportamentais e bioquímicas da exposição aguda aos OF. Dessa forma, observamos que o clorpirifós, um OF muito utilizado no nosso país, é capaz de induzir um efeito tipo-depressivo em roedores quando administrado em uma única dose subletal (SIQUEIRA et al., 2019). Nesse mesmo trabalho, foi observado que o efeito não persistiu por 30 dias após a intoxicação, o que trouxe à tona a pergunta de em

qual momento esse efeito deixou de aparecer. Nosso grupo também mostrou que o triazofós, um OF quimicamente semelhante ao clorpirifós, é capaz de prejudicar a extinção de memória aversiva de animais expostos ao teste do medo condicionado em apenas uma dose (RODRIGUES et al., 2020). Em ambos os trabalhos, além dos testes comportamentais, foi avaliada a atividade da AChE no córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e estriado. Essas estruturas são importantes na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade e depressão (BRANDÃO et al., 2003) (JOCA; PADOVAN; GUIMARÃES, 2003) e são ricas em sinapses colinérgicas (LAUDER; SCHAMBRA, 1999; SOUZA et al., 2006) Foi observada redução na atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal hipocampal de ratos 24 ou 48 horas após uma exposição aguda ao triazofós (RODRIGUES et al., 2020), bem no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal de ratos 24 h após a exposição ao clorpirifós (SIQUEIRA et al., 2019).

Além dos trabalhos já citados, apenas alguns poucos estudos pré-clínicos também demonstram que a exposição crônica ao triazofós pode causar disfunção cognitiva e perda de memória em roedores devido ao aumento no estresse oxidativo gerado pela intoxicação (JAIN et al., 2013). Dessa forma, diferentemente do clorpirifós, que é amplamente estudado, praticamente não existem estudos envolvendo o triazofós e alterações neuropsiquiátricas, o que torna ainda mais importante o avanço nos estudos sobre esse pesticida.

Além disso, sabe-se que para cada uma das alterações comportamentais existem áreas cerebrais mais ou menos envolvidas no comportamento manifestado. Dentre as estruturas cerebrais, o hipocampo e o córtex pré-frontal são listados na literatura como áreas envolvidas com o desenvolvimento da ansiedade e depressão. Situado nos lobos temporais mediais, o hipocampo é uma das estruturas mais estudadas do sistema cerebral. É composta por uma massa cinzenta que está envolvida em processos de aprendizado, consolidação da memória de curto a longo prazo e navegação espacial (BIRD; BURGESS, 2008; CAMPBELL; MACQUEEN, 2004).

Além disso, alguns trabalhos da literatura também relataram que quando o hipocampo apresenta algum prejuízo estrutural ou funcional, como redução do volume ou da neurogênese, pode ocasionar o desenvolvimento do transtorno de ansiedade generalizada e transtorno depressivo maior (CHA et al., 2016).

A sinalização colinérgica também parece estar envolvida com essas desordens, como já demonstrado por Mineur et al. (2013), onde a administração de um inibidor de colinesterase por infusão direta no hipocampo induziu comportamentos tipo-depressivo e tipo-ansiosogênico em modelos animais.

O córtex pré-frontal é outra estrutura relacionada a comportamentos de depressão e ansiedade. Localizada na porção anterior do cérebro, esta estrutura está associada à cognição, também conhecida como o processo de aprendizado e elaboração de conhecimento, permitindo o desenvolvimento de linguagem, memória, raciocínio, atenção e processamento de informação. Além disso, o córtex pré-frontal está envolvido a funções emocionais ou afetivas (KOENIGS; GRAFMAN, 2009; SIDDIQUI et al., 2008).

Lesões e prejuízos funcionais no córtex pré-frontal podem estar associadas a casos de depressão e ansiedade (BERKOWITZ et al., 2007; HAMA et al., 2007; SHI et al., 2014).

#### 1.6 INFLUÊNCIA DA IDADE SOBRE AS CONSEQUÊNCIAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS A INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

Apesar de pesticidas estarem comumente associados a intoxicações ocupacionais ou intencionais em indivíduos adultos, esse não é o único grupo que acaba sendo alvo de intoxicação. Em estudo recente sobre as características das intoxicações no Estado do Espírito Santo, foi observado que além dos jovens adultos, o outro grupo de indivíduos com alto índice de intoxicação por pesticidas são as crianças (DOS SANTOS et al., 2020). Acredita-se que a intoxicação desse grupo etário se deve sobretudo a casos de exposição acidental.

No trabalho de Barr e colaboradores (BARR et al., 2005) foi relatada a presença de metabólitos do clorpirifós em indivíduos com idades variadas. Contudo, as concentrações desses metabólitos são mais elevadas em crianças do que em adolescentes e, por sua vez, os níveis de metabólitos são maiores em adolescentes do que em adultos, o que demonstra que pode existir uma relação inversamente proporcional entre a idade e o grau de intoxicação.

Outros trabalhos também relataram a presença de resíduos urinários de inseticidas OF em crianças em diversas áreas do mundo (ROHITRATTANA et al., 2014). Joode e colaboradores (ROHITRATTANA et al., 2014; VAN WENDEL DE JOODE et al., 2016) relataram que a exposição a pesticidas estava associada a prejuízo neurocomportamental em crianças de 6 a 9 anos. Outro estudo clínico associou a diminuição da atividade da AChE eritrocitária com o desenvolvimento de sintomas de depressão, sobretudo durante a adolescência (SUAREZ-LOPEZ et al., 2019).

Percebendo esse potencial significativo de exposição na infância, diversas investigações têm se concentrado na determinação de mecanismos por trás das diferenças de toxicidade relacionadas à idade. Sabe-se que bebês e crianças tendem a ser mais sensíveis à exposição a OF devido a um sistema de detoxificação imaturo e um sistema nervoso ainda em desenvolvimento. Sendo assim, os bebês e as crianças são mais vulneráveis a doses menores que as necessárias para produzir o mesmo efeito em adultos (BARR et al., 2005; MINK; KIMMEL; LI, 2012).

Esse perfil também ocorre em modelos animais. Alguns trabalhos demonstraram que ratos neonatos e jovens são mais sensíveis a efeitos neurotóxicos de OF do que adultos, embora a recuperação dos mais jovens seja mais rápida que dos animais adultos (JUREWICZ; HANKE, 2008; LASSITER et al., 1998; MINK; KIMMEL; LI, 2012). Acker e colaboradores (2011) também demonstraram que filhotes de rato expostos ao OF malation apresentaram diminuição na coordenação motora, função vestibular, força e coordenação muscular e que esses efeitos estão associados a atividade da AChE.

Karant e Pope (2003) demonstraram que o clorpirifós apresentou efeitos diferentes relacionados a ACh em animais dependendo da idade. O clorpirifós não teve efeito sobre a síntese de ACh em neonatos, aumentou a síntese em animais jovens e diminuiu a síntese em adultos. Em contrapartida, o mesmo trabalho demonstrou que para o paration, a síntese de ACh foi aumentada em neonatos e reduzida em jovens e adultos.

Já Cole e colaboradores (2012) demonstraram que ratos adultos possuem alta expressão da enzima paraoxonase 1 (PON-1), a qual hidrolisa o clorpirifós-oxon, o metabólito ativo do clorpirifós, reduzindo sua toxicidade. Em animais jovens, os níveis

plasmáticos dessa enzima estão reduzidos, o que os torna mais suscetíveis à intoxicação.

O trabalho realizado por Singh e Rishi (SINGH; RISHI, 2005), por sua vez, demonstrou que animais jovens são mais sensíveis à intoxicação por triazofós. Nele, foi observado que animais considerados jovens (20 dias pós-natal) apresentam níveis de toxicidade com metade da dose administrada aos animais adultos (90 dias pós-natal).

Para determinar quando um animal é adulto, é importante revisar os estágios de desenvolvimento pelos quais o animal progride até atingir a idade adulta. Ratos e camundongos apresentam um perfil de desenvolvimento semelhante. No 21º dia pós-natal (PN), os roedores são desmamados e é nesse ponto que começam a sofrer a maturação sexual (SISK; ZEHR, 2005). É quando esse processo termina que os animais passam a ser considerados adultos. A idade média de maturação sexual varia de animal para animal, mas em média ocorre por volta do PN 32-34 em ratos fêmeas e PN 45-48 em machos (LEWIS et al., 2002).

A fase entre o início da maturação sexual e o desenvolvimento completo dos animais pode ser comparada à adolescência em humanos. Animais adolescentes tendem a apresentar níveis elevados de hormônios esteroides gonadais. Esses hormônios esculpem circuitos neurais e promovem uma reconfiguração do sistema nervoso (SISK; ZEHR, 2005). Dessa forma, é importante avaliar se a intoxicação pode ser significativa nesses animais, principalmente quando comparados a animais que apresentam o sistema nervoso completamente desenvolvido.

## 2. HIPÓTESE

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a exposição aguda a doses subletais de OF induzem sinais de neurotoxicidade e são capazes de promover alterações comportamentais tipo-depressivas (SIQUEIRA et al., 2019), bem como prejuízo da extinção de memória aversiva (RODRIGUES et al., 2020). Em ambos os casos, a atividade da AChE se encontrava reduzida no hipocampo e no córtex pré-frontal, estruturas envolvidas na modulação de comportamentos associados à depressão e à ansiedade.

Entendendo que animais de diferentes faixas etárias apresentam níveis diferentes de desenvolvimento e maturação do sistema nervoso, é possível que o impacto da intoxicação aguda com doses subletais de OF sobre os comportamentos seja diferente em cada fase de desenvolvimento.

Considerando que o triazofós é um agrotóxico OF quimicamente semelhante ao clorpirifós e que, até o presente momento, foi pouco estudado a respeito de seus efeitos comportamentais, nossa hipótese é de que a exposição aguda a doses subletais do triazofós induziria diferentes padrões de alterações comportamentais em animais adultos e jovens em testes experimentais de triagem para efeito depressivo e para efeito ansiogênico.

# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar se a exposição aguda a doses subletais de triazofós induz diferentes alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas à ansiedade e depressão em animais adultos e jovens.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a administração aguda de doses subletais de triazofós:

- altera a atividade locomotora e ansiedade de animais jovens e adultos no teste do campo aberto (CA).
- aumenta a ansiedade de animais jovens e adultos no LCE
- induz efeito tipo-depressivo de animais jovens e adultos no TNF 24 h, 8, 15 e 22 dias após a intoxicação.
- inibe a atividade da BChE de animais jovens e adultos 24 horas e 22 dias após a intoxicação.
- inibe a atividade da AChE de animais jovens e adultos 24 horas e 22 dias após a intoxicação.

# MÉTODOS

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos Wistar e jovens (28 dias – PN28) e adultos (8 semanas – PN60) provenientes do Biotério Central da UFES, divididos em grupos de quatro animais por caixa, à temperatura de  $24 \pm 2$  °C, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e ração. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFES através do certificado nº 29/2017. Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal (Anexo 1).

A idade dos animais jovens foi definida baseada no trabalho realizado por Chen e colaboradores (CHEN et al., 2014), que avaliaram o efeito da exposição ao clorpirifós sobre comportamentos relacionados à ansiedade e depressão em animais adolescentes no PN27.

### 4.2 DROGA

Foi utilizado o Triazofós [O,O-dietil O-1-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-il fosforotioato], proveniente de uma solução comercial de Hostathion 400 BR, 40% m/v (Bayer CropScience Ltda, Rio de Janeiro), diluído em solução salina 0,9%. As doses utilizadas foram baseadas nos valores de dose máxima tolerada estabelecidas por Singh e Rishi (SINGH; RISHI, 2005) que anteriormente determinou a dose máxima tolerada tanto por animais com jovens com 20 dias quanto para animais adultos de aproximadamente 90 dias. Dessa forma, foram definidas três doses para os animais jovens (3,75, 7,5, 15 mg/kg) e três doses para os animais adultos (7,5, 15, 30 mg/kg).

#### 4.2.1 Preparo das soluções

O triazofós é um produto bastante volátil que se exposto por muito tempo acaba perdendo sua concentração. Para garantir que as doses administradas efetivamente são as estudadas, antes do início dos experimentos foi realizada uma análise por cromatografia do agrotóxico para confirmar a concentração do produto na solução comercial testada e ajustar o cálculo das doses. Esse processo foi repetido algumas vezes com o passar do tempo para manter sempre atualizada essa concentração.

Para evitar variações nas doses administradas nos animais por possível evaporação da droga, as soluções administradas no tratamento foram preparadas sempre no dia

da intoxicação dos animais. Todo preparo foi feito em capela de exaustão e trajando os equipamentos de proteção individual adequados, a fim de evitar qualquer intoxicação acidental por inalação de vapores.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS

Os protocolos experimentais foram criados com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição aguda (uma única dose subletal) ao triazofós sobre comportamentos relacionados à ansiedade e depressão e as diferenças entre essa intoxicação nas diferentes fases de vida. Para tanto, foram utilizados dois grupos de animais em idades diferentes e esses foram denominados como animais jovens (28 dias ~130 g) e animais adultos (8 semanas ~265 g). Assim, foram realizados cronologicamente quatro protocolos experimentais sendo os dois primeiros realizados com os animais adultos e os dois últimos com os animais jovens.

Para o **protocolo 1**, os animais adultos (n = 46) foram divididos em 4 subgrupos, três deles foram tratados com o triazofós nas doses definidas (7,5, 15, 30 mg/kg) e o quarto tratado com salina 0,9 %. Foi realizada uma injeção intraperitoneal e o volume administrado foi correspondente a 1 ml/kg. Após a administração, os animais foram acompanhados por quatro horas para serem verificados os sinais de intoxicação apresentados por eles. Vinte e quatro horas após o tratamento, os animais foram testados no LCE e logo em seguida no CA. Ao final dos testes comportamentais os animais foram imediatamente decapitados e coletado sangue e estruturas cerebrais para a determinação da atividade enzimática.

No **protocolo 2**, os animais adultos (n = 35) primeiramente passaram por uma pré-exposição ao TNF e, em seguida, foram tratados da mesma maneira que os animais do protocolo 1. Foi realizada a avaliação toxicológica aguda anotando os sinais apresentados por cada um deles durante 4 h. Vinte e quatro horas depois do tratamento, os animais foram testados no TNF, sendo as sessões repetidas no 8º, 15º e 22º dias (3 semanas consecutivas). Após o último teste (22 dias após a intoxicação), os animais foram imediatamente decapitados foi coletado sangue e estruturas cerebrais para a determinação da atividade enzimática. De acordo com Mezdri e colaboradores (2011), a sessão teste do TNF pode ser repetida sem prejuízo da detecção do efeito antidepressivo e de forma a utilizar um menor número de animais.

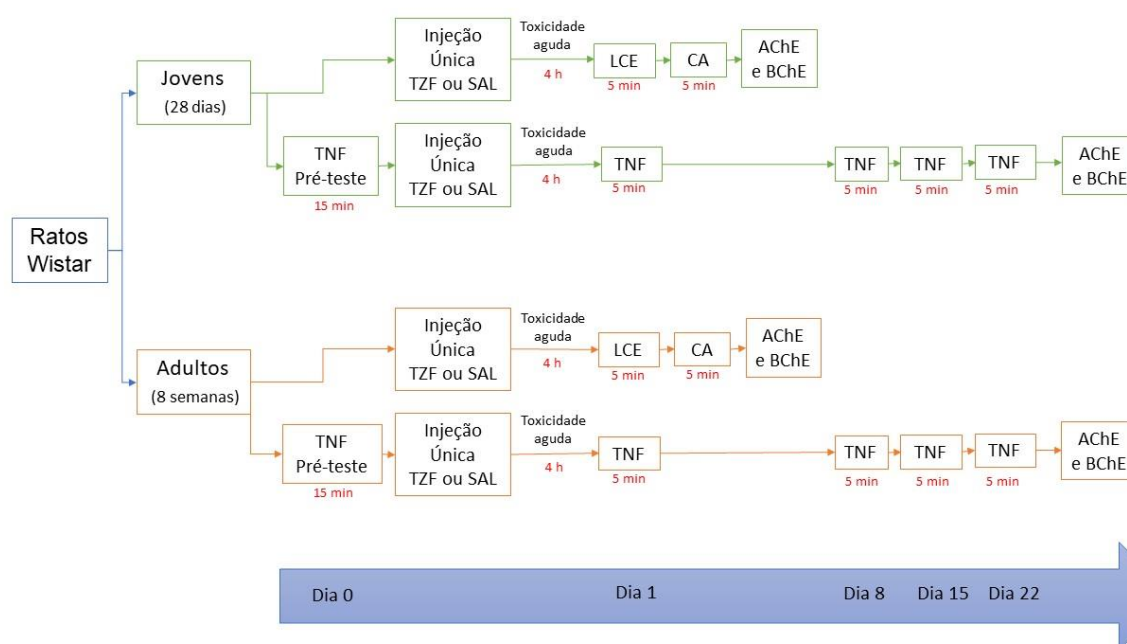
Para o **protocolo 3**, os animais jovens (n = 41) foram divididos em 4 subgrupos, três deles foram tratados com o triazofós nas doses definidas (3,75, 7,5, 15 mg/kg) e o quarto tratado com salina 0,9 %. Em seguida os animais foram intoxicados e testados seguindo os mesmos passos do protocolo 1.

Os animais jovens (n = 48) do **protocolo 4**, por sua vez foram testados seguindo os passos do protocolo 2 e tratados de acordo com o protocolo 3.

Cada protocolo foi realizado em 4 experimentos com grupos de no máximo 12 animais por dia de teste. Os animais foram randomizados por planilha de Excel onde a quantidade de animais pré-definido para cada grupo para o dia de experimento foi aleatoriamente designado para uma das caixas que seria testada. Os 4 grupos experimentais foram testados em todos os experimentos.

Todos os testes foram realizados em dupla, de forma que um dos experimentadores intoxicava e o outro, cego ao tratamento, realizava os testes comportamentais. Para a análise dos comportamentos, os vídeos foram codificados para que a experimentadora que avaliou os comportamentos não soubesse qual era o tratamento dos animais analisados.

O protocolo geral empregado neste estudo foi realizado conforme o esquema da figura 8.



**Figura 8:** Representação esquemática do desenho experimental (SAL: Salina, TZF: triazofós, TNF Teste do Nado Forçado, LCE: Labirinto em Cruz elevado, CA: Campo Aberto, AChE: Acetilcolinesterase, BChE: Butirilcolinesterase). Elaborada pela autora

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA

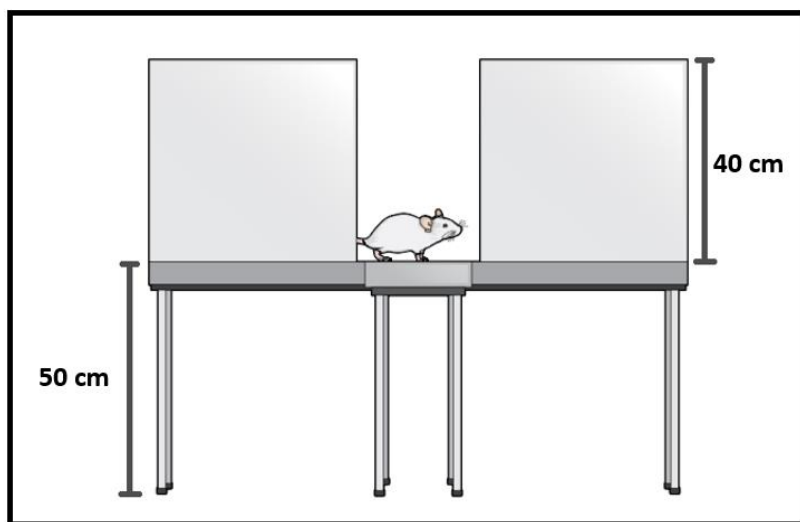
Para avaliar a toxicidade aguda, foi adotado o protocolo baseado no definido por MCDONOUGH (1989). Foram selecionados alguns sinais característicos da intoxicação induzida por OF que se observa nos animais intoxicados e o nível de intoxicação foi determinado pela severidade dos sinais apresentados.

Verificar os sinais de toxicidade aguda juntamente com a atividade da colinesterase plasmática foi o parâmetro utilizado para comprovar a efetividade da intoxicação aguda pelo triazofós (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989). Os dados de toxicidade aguda foram incluídos como apêndice 1 desse documento.

## 4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.5.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE é um aparato de madeira, formado por dois braços fechados, circundados por paredes de 40 cm de altura, e dois braços abertos, formando uma cruz, e elevados 50 cm do solo (Figura 9).



**Figura 9:** Representação esquemática do Labirinto em cruz elevado. Elaborada pela autora.

O animal foi colocado no aparelho, voltado ao braço aberto, para assim poder explorar o aparelho livremente por cinco minutos e seu comportamento foi registrado por uma câmera de vídeo (webcam) acoplada a um microcomputador. Posteriormente, foi quantificado o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e braços fechados manualmente pela experimentadora. A partir desses dados, foram calculados a porcentagem de entradas (razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas) e de tempo nos braços abertos (razão entre o tempo nos braços abertos e o tempo total). O modelo comportamental foi validado devido sua utilidade para detectar efeitos ansiolíticos e ansiogênicos (PELLOW et al., 1985). Os mesmos índices de ansiedade podem ser utilizados em ratos jovens (DOREMUS; VARLINSKAYA; SPEAR, 2006).

### 4.5.2 Campo Aberto (CA)

Para a realização do teste de CA foi utilizada uma caixa quadrada de madeira com piso preto de 1 m<sup>2</sup> de área, delimitada por 4 paredes de 30 cm de altura o que impede a fuga do animal (Figura 10).

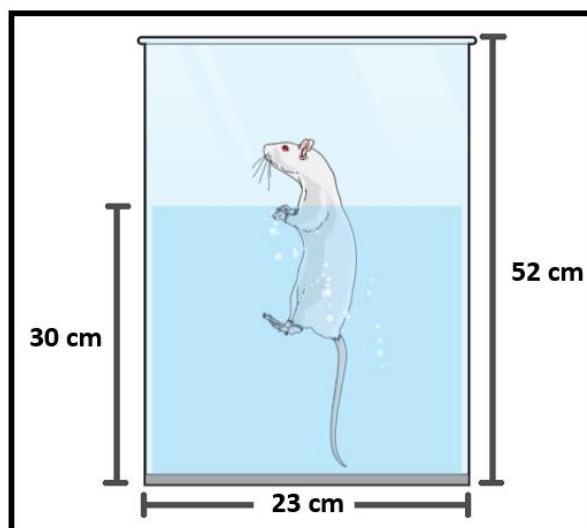


**Figura 10:** Representação esquemática do Teste do Campo Aberto. Elaborada pela autora.

Neste teste, o animal é colocado no centro da caixa e pode explorá-lo livremente por 5 minutos (SILOTE et al., 2013). O comportamento é registrado por meio de uma câmera (webcam) conectada a um microcomputador. Posteriormente, utilizando o software ANY-maze™ (Stoelting, Wheat Lane, EUA), foi medida a distância total percorrida (em metros) pelo animal, além da distância percorrida no centro e o número de entradas no centro (região central da caixa com área de aproximadamente 40 cm<sup>2</sup>).

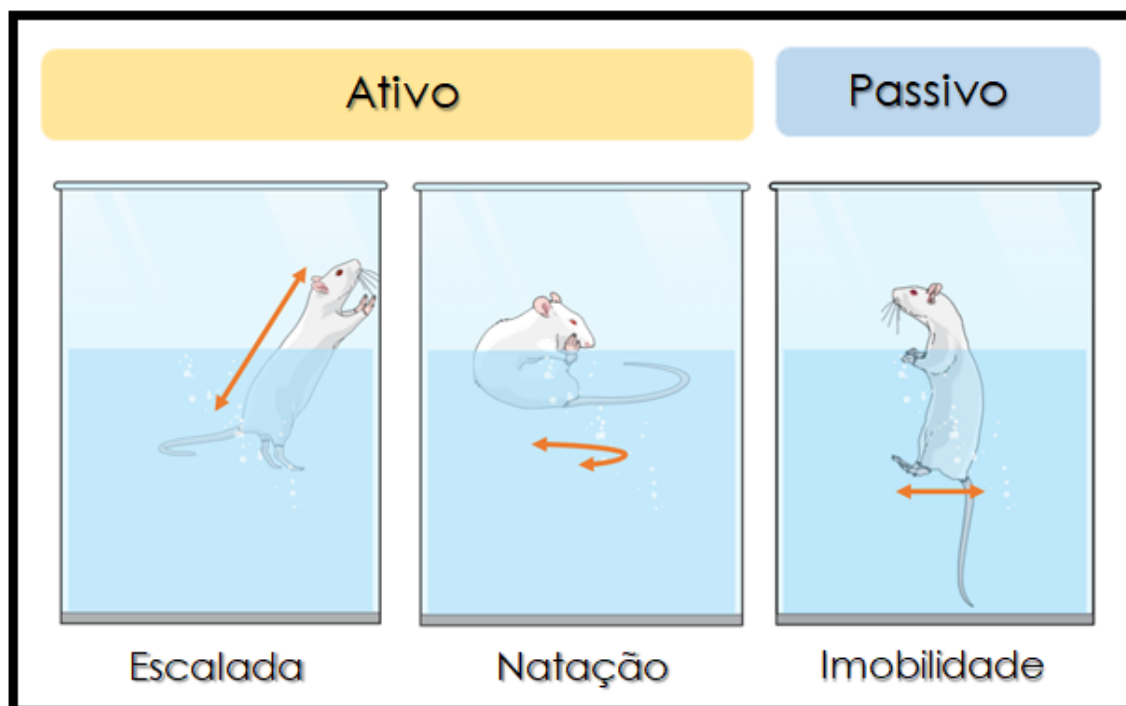
#### 4.5.3 Teste do Nado Forçado (TNF)

O TNF foi executado em duas etapas, conforme o protocolo de Detke e colaboradores (1995). Para tanto, foi utilizado um cilindro opaco branco (23 cm de diâmetro e 52 cm de altura), contendo água (profundidade 30 cm) com temperatura variando de 22 a 24°C (Figura 11).



**Figura 11:** Representação esquemática do Teste do Nado Forçado. Elaborada pela autora.

A profundidade da água em um nível de 30 cm impede que o animal alcance o fundo do recipiente com as patas traseiras e cauda, assim como a borda superior com as patas dianteiras. O teste apresenta duas etapas. Primeiramente é realizada uma pré-exposição (sessão pré-teste), na qual o animal é colocado no cilindro para nadar por 15 minutos. Vinte e quatro horas depois, os animais são novamente colocados para nadar durante 5 minutos (sessão teste) para avaliar os comportamentos de imobilidade, escalada e natação (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). A frequência de cada comportamento foi determinada manualmente pela experimentadora identificando o comportamento que o animal apresenta a cada 5 segundos (figura 12). Animais que são submetidos ao estresse de uma situação de nado forçado da qual não tem a possibilidade de escapar tendem a permanecer imóveis depois de certo tempo, mantendo apenas a cabeça para fora da água.



**Figura 12:** Representação esquemática dos comportamentos ativos e passivo no Teste do Nado Forçado. Elaborada pela autora.

A imobilidade refere-se a um estado passivo do animal, no qual este não está realizando nenhum esforço por sair do cilindro. Esse comportamento tende a diminuir quando o animal recebe um tratamento com algum antidepressivo (PORSOLT et al., 1978). Já a natação e a escalada são dois comportamentos ativos do animal, no qual se percebe um esforço por parte do mesmo para escapar daquele ambiente. A natação por sua vez, refere-se a tentativa de fuga contornando repetidamente o cilindro (DETKE; RICKELS; LUCKI, 1995). Dessa forma, pressupõe-se que quanto maior for a imobilidade de um animal intoxicado e menor sua atividade de natação e/ou escalada quando comparado com um animal controle, maior o comportamento depressivo apresentado pelo mesmo. A idade parece não afetar o comportamento dos ratos no TNF (DESIKAN; WILLS; EHLERS, 2014; ULLOA et al., 2014).

#### 4.6 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

##### 4.6.1 Atividade da Colinesterase Plasmática (BChE)

Ao final dos testes comportamentais os animais foram imediatamente (máximo de uma hora entre a realização do teste comportamental e a coleta) a eutanásia. Sangue retirado do tronco dos animais foi coletado em microtubos previamente heparinizados

e levado para centrifugação por 10 minutos a 4.000 RPM (Mikro 120, Hettich). O plasma obtido foi armazenado em ultracongelador a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem.

A atividade da BChE foi mensurada pela ação catalítica da colinesterase sobre o substrato butiriltiocolina, que é hidrolisada em tiocolina e butirato. A tiocolina tem a capacidade de reduzir o hexacianoferrato (III), um composto amarelo, em hexacianoferrato (II) que é incolor. A absorvância é medida a 405 nm.

As amostras foram testadas em duplicata utilizando o kit para determinação de colinesterase da marca Bioclin (Colinesterase – K094® Quibasa química básica LTDA., Minas Gerais, Brasil) no analisador bioquímico semi-automático (Bio Plus®, BIO-2000 IL, Brasil). O kit preconiza que para cada 20  $\mu\text{l}$  de amostra testada deve ser acrescido 1000  $\mu\text{L}$  de um tampão reagente. A mistura é levada a incubação por 3 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida são adicionados 250  $\mu\text{l}$  de substrato contendo a butirilcolina e incubada por exatos 2 minutos antes da leitura da absorvância.

A atividade da enzima foi expressa em UI/L, no qual uma unidade de BChE corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de substrato/minuto/L de plasma, a  $37^{\circ}\text{C}$ ). A inibição na atividade dessa enzima, juntamente com a quantificação da atividade da AChE cerebral, permitirá a avaliação da eficácia da intoxicação por triazofós.

#### **4.6.2 Preparo da amostra para determinação da atividade da colinesterase cerebral**

A quantificação de AChE cerebral foi realizada a partir do hipocampo e córtex pré-frontal extraído dos animais sacrificados. As amostras foram coletadas em microtubos e armazenadas em ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do processamento.

A atividade da AChE foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Ellman e colaboradores (ELLMAN et al., 1961) e modificado por Lassiter e colaboradores (LASSITER et al., 2003). As amostras foram previamente homogeneizadas em tampão fosfato 1% de Triton em um macerador de tecido Potter-Elvehjem. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas 5 minutos a 7800G em centrífuga refrigerada a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (Centrifuge 5804R – Eppendorf AG.

Hamburgo, Alemanha) e, por fim, os sobrenadantes utilizados para quantificação da atividade enzimática.

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da AChE sobre a acetiltiocolina, a qual é hidrolisada em tiocolina e acetato. A tiocolina reage com o DTNB liberando um composto de cor amarela. A análise foi feita pelo método cinético e lida no comprimento de onda de 412 nm em espectrofotômetro (EPOCH2, BioTek, Winooski, EUA). A atividade da AChE foi expressa em  $\mu$ mol de acetilcolina hidrolisados por hora por mg de proteína. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (LCE), analisados com o programa de estatística SPSS para Windows® (Versão 20.0) e os gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism (versão 5.01). As análises do TNF foram realizadas por ANOVA de duas vias com medida repetida, tendo como fator independente o tratamento e como medida repetida o tempo. As medidas dos testes comportamentais (LCE, CA) e bioquímicos (BChE e AChE) foram analisadas por ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett quando apropriado para comparações com o grupo controle. O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

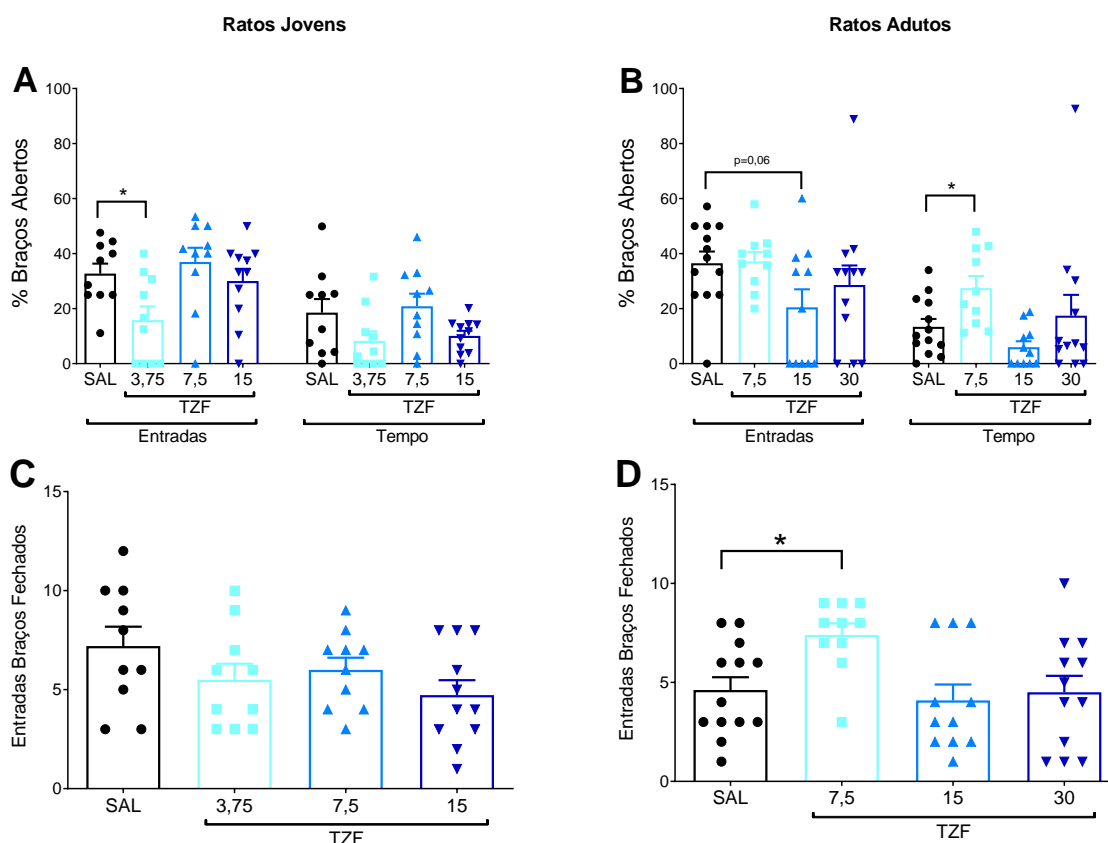
### **Toxicidade aguda dos animais adultos durante as quatro primeiras horas de intoxicação.**

Os resultados de toxicidade aguda para os animais adultos e jovens, que são dados secundários, foram acrescentados como apêndice (apêndice 1).

### **Teste do Labirinto em Cruz Elevado: O triazofós induz efeito ansiolítico ou ansiogênico dependentes da dose e da idade**

A figura 13 mostra os comportamentos apresentados pelos ratos jovens e adultos expostos ao LCE 24 h após a exposição ao triazofós. Os comportamentos apresentados pelos ratos jovens testados no LCE demonstraram que a intoxicação com triazofós reduziu a porcentagem de entradas (Figura 13A) [ $F_{(3,37)} = 4,253$ ;  $p = 0,011$ ] nos braços abertos na menor dose (3,75 mg/kg) quando comparado ao grupo controle ( $p = 0,032$ ; post hoc de Dunnett).

Além disso, para os animais adultos, a intoxicação alterou o percentual de entradas [ $F_{(3,41)} = 3,081$ ;  $p = 0,0378$ ] e tempo [ $F_{(3,41)} = 7,583$ ;  $p < 0,001$ ] em braços abertos (Figura 13B). A dose de 15 mg/kg de triazofós diminuiu a porcentagem de entradas nos braços abertos em relação ao grupo controle, embora o nível de significância tenha sido marginal ( $p = 0,066$ ) e a dose de 7,5 mg/kg tenha aumentado a porcentagem de tempo em relação ao grupo controle ( $p = 0,008$ ). Além disso, o triazofós alterou o número de entradas nos braços fechados (Figura 13D) [ $F_{(3,41)} = 3,802$ ;  $p = 0,017$ ]. A dose de 7,5 mg/kg de triazofós aumentou o número de entradas nos braços fechados em relação ao grupo controle ( $p = 0,027$ ).



**Figura 13:** Efeito de uma única injeção subletal de triazolós (TZF) sobre o comportamento de ratos adultos e jovens expostos ao Labirinto em Cruz Elevado. (A) Porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e (C) entradas nos braços fechados 24 h após injeção de SAL (n= 10) ou TZF nas doses de 3,75 (n= 10), 7,5 (n=10) ou 15 mg/kg (n=11) em ratos jovens. (B) Porcentagem de entradas e tempo nos braços abertos e (D) entradas nos braços fechados 24 h após a injeção de salina (SAL; n= 13) ou TZF em doses de 7,5 (n= 10), 15 (n=11), ou 30 mg/kg (n=12) em ratos adultos. Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

### Teste do campo aberto: Triazolós induz efeito ansiogênico em ratos jovens e adultos.

Para os ratos jovens do CA houve uma tendência de diferença estatisticamente significativa na distância total percorrida [ $F_{(3,37)} = 2,530$ ;  $p = 0,072$ ], e mudança estatisticamente significativa no percentual de entradas para o centro [ $F_{(3,37)} = 3,260$ ;  $p = 0,032$ ], mas não no percentual de distância percorrida no centro [ $F_{(3,37)} = 1,360$ ;  $p = 0,270$ ] para animais jovens intoxicados com triazolós 24 h após a administração. A dose de 15 mg/kg ( $p = 0,042$ ) diminuiu a distância total percorrida e a porcentagem de entradas ao centro ( $p = 0,048$ ) pelos animais jovens no CA quando comparados aos

animais salina.

Para ratos adultos não houve alteração na distância total percorrida [ $F_{(3,41)} = 0,621$ ;  $p = 0,605$ ], e no percentual de distância percorrida no centro [ $F_{(3,41)} = 0,621$ ;  $p = 0,605$ ], mas houve alteração no percentual de entradas para o centro [ $F_{(3,41)} = 3,831$ ;  $p = 0,008$ ] na dose mais alta para animais adultos intoxicados com triazofós 24 h após a administração ( $p = 0,01$  *post hoc* de Dunnett).

**Tabela 3:** Efeitos da intoxicação aguda por triazofós na atividade locomotora de ratos jovens e adultos no teste de campo aberto 24 h após a administração

<b>Ratos Jovens</b>			
Tratamento (n)	Distância total percorrida (m)	Distância Percorrida Centro (%)	Entradas Centro (%)
SAL (11)	21,35 ± 0,55	8,62 ± 1,08	44,38 ± 0,61
TZF 3,75 (10)	20,27 ± 1,88	8,53 ± 1,65	47,26 ± 0,84
TZF 7,5 (10)	17,87 ± 2,09	8,16 ± 0,94	43,16 ± 1,89
TZF 15 (11)	15,23* ± 1,90	5,85 ± 1,38	34,89* ± 5,44
	$F_{(3,37)} = 2,530$ ; $p = 0,072$	$F_{(3,37)} = 1,360$ ; $p = 0,270$	$F_{(3,37)} = 3,260$ ; $p = 0,032$
<b>Ratos Adultos</b>			
Tratamento (n)	Distância total percorrida (m)	Distância Percorrida Centro (%)	Entradas Centro (%)
SAL (13)	15,23 ± 1,65	9,20 ± 1,57	46,88 ± 1,41
TZF 7,5 (10)	16,70 ± 1,15	12,91 ± 1,63	47,88 ± 0,90
TZF 15 (11)	18,92 ± 2,69	10,59 ± 2,09	46,12 ± 1,44
TZF 30 (12)	16,21 ± 2,35	5,86 ± 1,80	32,05* ± 6,36
	$F_{(3,41)} = 0,621$ ; $p = 0,605$	$F_{(3,41)} = 0,621$ ; $p = 0,605$	$F_{(3,41)} = 3,831$ ; $p = 0,008$

\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (SAL)

### **Teste do Nado Forçado: Triazofós induziu efeito tipo depressivo persistente em animais jovens e adultos.**

As figuras 14 e 15 respectivamente mostram os comportamentos apresentados pelos ratos jovens e adultos expostos ao TNF.

Em ratos jovens, para a frequência de imobilidade, houve efeito da sessão [ $F_{(3,44)} = 6,007$ ;  $b$ ;  $p < 0,002$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,44)} = 6,638$ ;  $p = 0,001$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,44)} = 1,104$ ;  $p = 0,366$ ]. A análise *post hoc* para a sessão de 24 horas (Figura 14A) mostrou que todas as doses de triazofós aumentaram a frequência de imobilidade ( $p < 0,001$  para uma dose de todas as doses

em comparação com o grupo de solução salina). Para a sessão de 8 dias (Figura 14B), a dose de 7,5 mg/kg ( $p=0,015$ ) e 15mg/kg ( $p=0,001$ ) de triazofós aumentou a frequência de imobilidade em relação ao grupo controle. Para a sessão de 15 dias (Figura 14C), doses de 3,75 ( $p=0,015$ ) e 15 mg/kg de triazofós ( $p=0,016$ ) aumentaram a frequência de imobilidade em relação ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos para a sessão de 22 dias (Figura 14D).

Ainda em animais jovens, para a frequência de natação, houve efeito da sessão [ $F_{(3,44)}= 4,612$ ;  $p=0,07$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,44)}= 6,969$ ;  $p=0,001$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,44)}= 0,681$ ;  $p=0,724$ ]. A análise post hoc para a sessão de 24 horas mostrou que todas as doses de triazofós diminuíram a frequência de natação ( $p<0,001$  em relação ao grupo solução salina). Para a sessão de 8 dias, doses de 7,5 ( $p=0,026$ ) e 15 mg/kg ( $p=0,004$ ) de triazofós diminuíram a frequência de natação em relação ao grupo controle. Para a sessão de 15 dias, doses de 3,75 ( $p=0,017$ ) e 15 mg/kg de triazofós ( $p=0,016$ ) diminuíram a frequência de natação em relação ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos para a sessão de 22 dias.

Para a frequência de escalada em animais jovens, houve efeito da sessão [ $F_{(3,44)}= 5,780$ ;  $p=0,02$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,44)}= 3,389$ ;  $p=0,026$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,44)}= 1,407$ ;  $p=0,253$ ]. A análise post hoc para a sessão de 24 horas mostrou que as doses de 7,5 ( $p=0,033$ ) e 15 mg/kg ( $p=0,014$ ) de triazofós diminuíram a frequência de escalada em relação ao grupo salina. Para a sessão de 22 dias, a dose de 15 mg/kg ( $p=0,024$ ) diminuiu a frequência de escalada em relação ao grupo controle. Para as sessões de 15 e 22 dias não houve diferença entre os grupos.

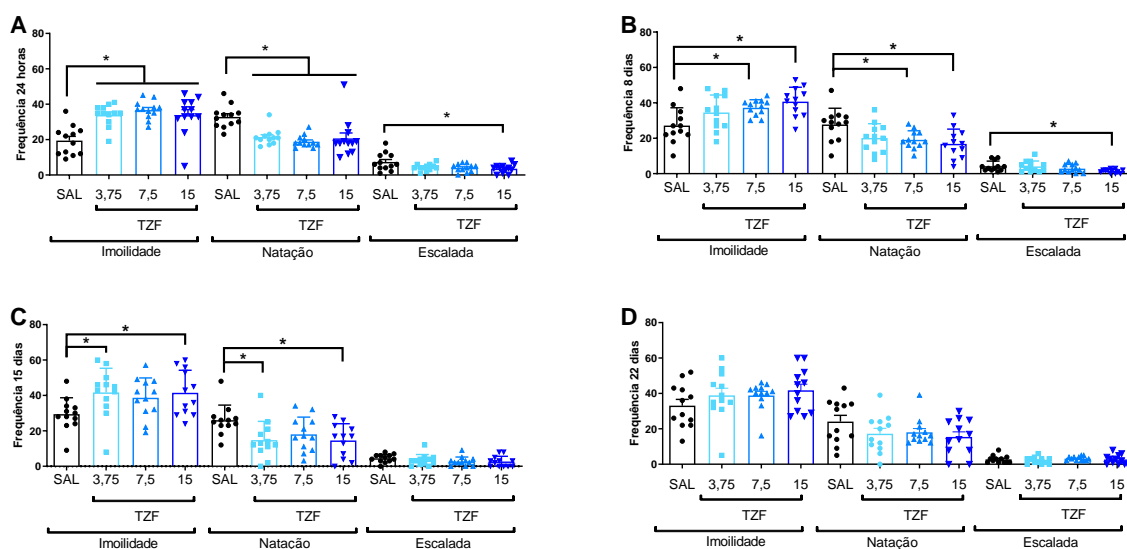
Em ratos adultos, para a frequência de imobilidade, houve efeito da sessão [ $F_{(3,31)}= 8,980$ ;  $p<0,001$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,31)}= 6,097$ ;  $p=0,002$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,31)}= 1,626$ ;  $p=0,119$ ]. A análise post hoc da sessão de 24 horas (Figura 15A) mostrou que todas as doses de triazofós aumentaram a frequência de imobilidade ( $p=0,16$  para uma dose de 7,5;  $p=0,012$  para uma dose de 15 e;  $p=0,007$  para uma dose de 30 mg/ kg em comparação com o grupo salina). Para a sessão de 8 dias (Figura 15B), a dose de 7,5 mg/kg de triazofós aumentou a frequência de imobilidade em relação ao grupo controle ( $p=0,035$ ). Não houve diferença entre os grupos para a sessão de 15 dias (Figura 15C). Por fim, para

a sessão de 22 dias (Figura 15D), doses de 7,5 ( $p<0,001$ ) e 30 mg/kg de triazofós ( $p=0,001$ ) aumentaram a frequência de imobilidade em relação ao grupo controle.

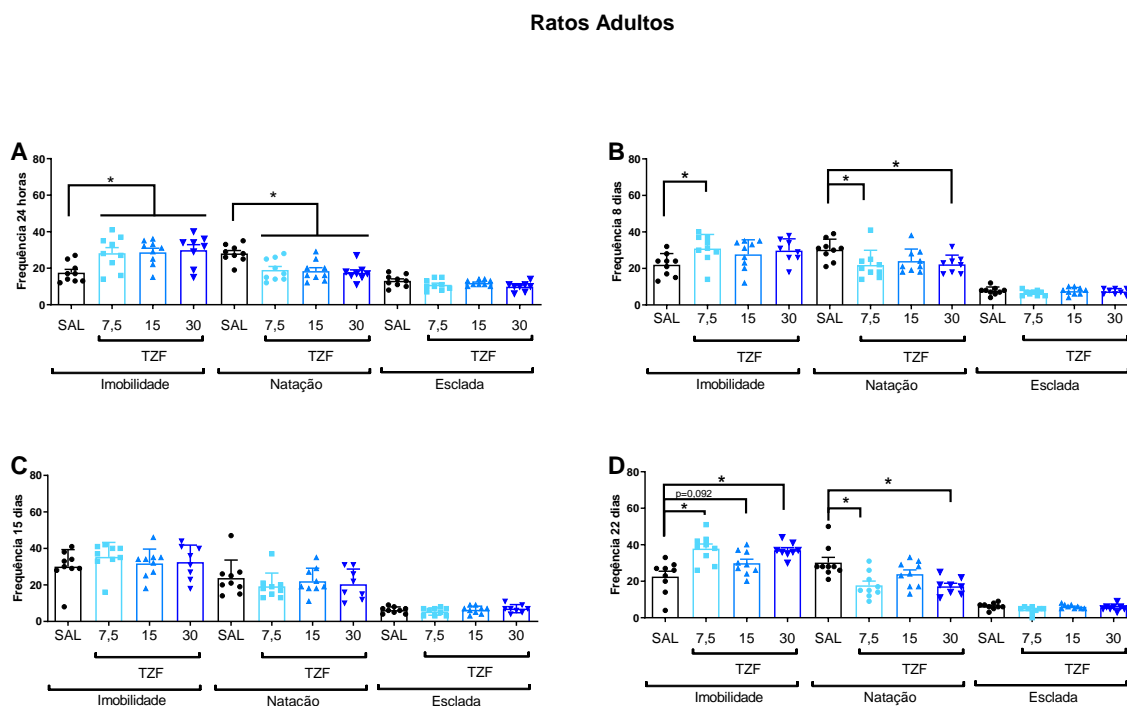
Para a frequência de natação em animais adultos, houve efeito da sessão [ $F_{(3,31)}=2,942$ ;  $p<0,046$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,31)}=6,812$ ;  $p=0,001$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,31)}=1,163$ ;  $p=0,328$ ]. A análise post hoc para a sessão de 24 horas mostrou que todas as doses de triazofós diminuíram a frequência de natação ( $p=0,03$  para uma dose de 7,5;  $p=0,001$  para uma dose de 15 e;  $p=0,001$  para uma dose de 30 mg/kg em comparação para o grupo salina). Para a sessão de 8 dias, doses de 7,5 ( $p=0,029$ ) e 30 mg/kg ( $p=0,049$ ) de triazofós diminuíram a frequência de natação em relação ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos para a sessão de 15 dias. Por fim, para a sessão de 22 dias, doses de 7,5 ( $p=0,002$ ) e 30 mg/kg de triazofós ( $p=0,002$ ) diminuíram a frequência de natação em relação ao grupo controle.

Ainda para animais adultos para a frequência de escalada, houve efeito da sessão [ $F_{(3,31)}=75,825$ ;  $p<0,001$ ], efeito do tratamento [ $F_{(3,31)}=2,105$ ;  $p=0,001$ ], mas não houve interação entre sessão e tratamento [ $F_{(3,31)}=1,410$ ;  $p=0,201$ ]. A análise post hoc para a sessão de 24 horas mostrou que a dose de 30 mg/kg diminuiu a frequência de escalada ( $p<0,001$  em relação ao grupo salina). Para as sessões de 8 e 15 dias não houve diferença entre os grupos. Por fim, para a sessão de 22 dias, a dose de 7,5 mg/kg ( $p<0,001$ ) diminuiu a frequência de escalada em relação ao grupo controle.

#### Ratos Jovens



**Figura 14:** Efeito de uma única injeção subletal de triazofós (TZF) sobre o comportamento de ratos jovens expostos ao Teste do Nado Forçado. (A) Frequência de imobilidade, natação e escalada 24 h, (B) 8 dias, (C) 15 dias e, (D) 22 dias após a injeção de SAL (n= 12) ou TZF em doses de 3,75 (n= 12), 7,5 (n=12) ou 15 mg/kg (n=12). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.



**Figura 15:** Efeito de uma única injeção subletal de triazofós (TZF) sobre o comportamento de ratos adultos expostos ao Teste do Nado Forçado. (A) Frequência de imobilidade, natação e escalada 24 h, (B) 8 dias, (C) 15 dias e, (D) 22 dias após a injeção de SAL (n= 9) ou TZF em doses de 7,5 (n= 9), 15 (n=9) ou 30 mg/kg (n=8). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

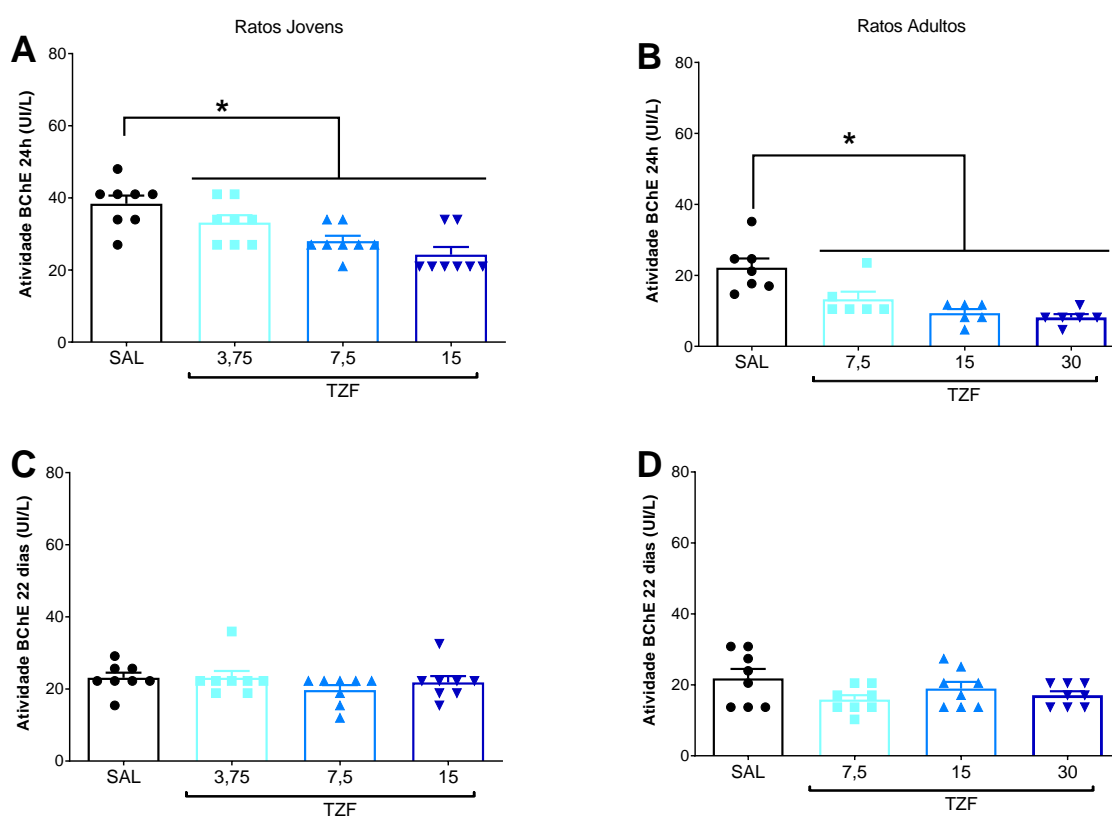
### Atividade da butirilcolinesterase plasmática em animais jovens e adultos 24 horas e 22 dias após a administração de triazofós

A figura 16 mostra a atividade da BChE plasmática 24 h e 22 dias após a administração do triazofós em animais jovens e adultos. Para animais jovens, a atividade da BChE plasmática também foi reduzida 24 horas (Figura 16A) após a intoxicação [ $F_{(3,27)} = 12,336$ ;  $p < 0,001$ ] em todas as doses testadas ( $p = 0,047$ ;  $p = 0,001$ ;  $p = 0,001$ , doses de 3,75, 7,5 e 15, respectivamente, pelo teste *post hoc* de Dunnett)

quando comparado ao grupo salina.

Em animais adultos 24 horas após a intoxicação (Figura 16B), a BChE foi significativamente reduzida [ $F_{(3,21)}= 11,470$ ;  $p<0,001$ ] em todas as doses testadas ( $p=0,009$ ;  $p = 0,001$   $p = 0,001$ , para as doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, respectivamente, pelo teste post hoc de Dunnett) quando comparado ao grupo salina.

A atividade da BChE em ratos jovens (Figura 16C) [ $F_{(3,28)} = 0,973$ ;  $p=0,419$ ] e adultos (Figur 16D) [ $F_{(3,28)} = 2,007$ ;  $p=0,136$ ] 22 dias após a intoxicação com triazofós não foi alterada.



**Figura 16:** Efeito de uma única injeção subletal de triazofós (TZF) sobre a atividade da butirilcolinesterase (BChE) em ratos adultos e jovens. (A) Atividade da BChE 24 h e (C) 22 dias após a injeção de SAL (n= 7 e 8) ou TZF nas doses de 3,75 (n= 8 e 8), 7,5 (n=8 e 8) ou 15 mg/kg (n=8 e 8) em ratos jovens. (B) atividade da BChE 24 h e (D) 22 dias após a injeção de solução salina (SAL; n= 7 e 8) ou TZF nas doses de 7,5 (n= 6 e 8), 15 (n=6 e 8), ou 30 mg/kg (n=6 e 8) em ratos adultos. Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p<0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

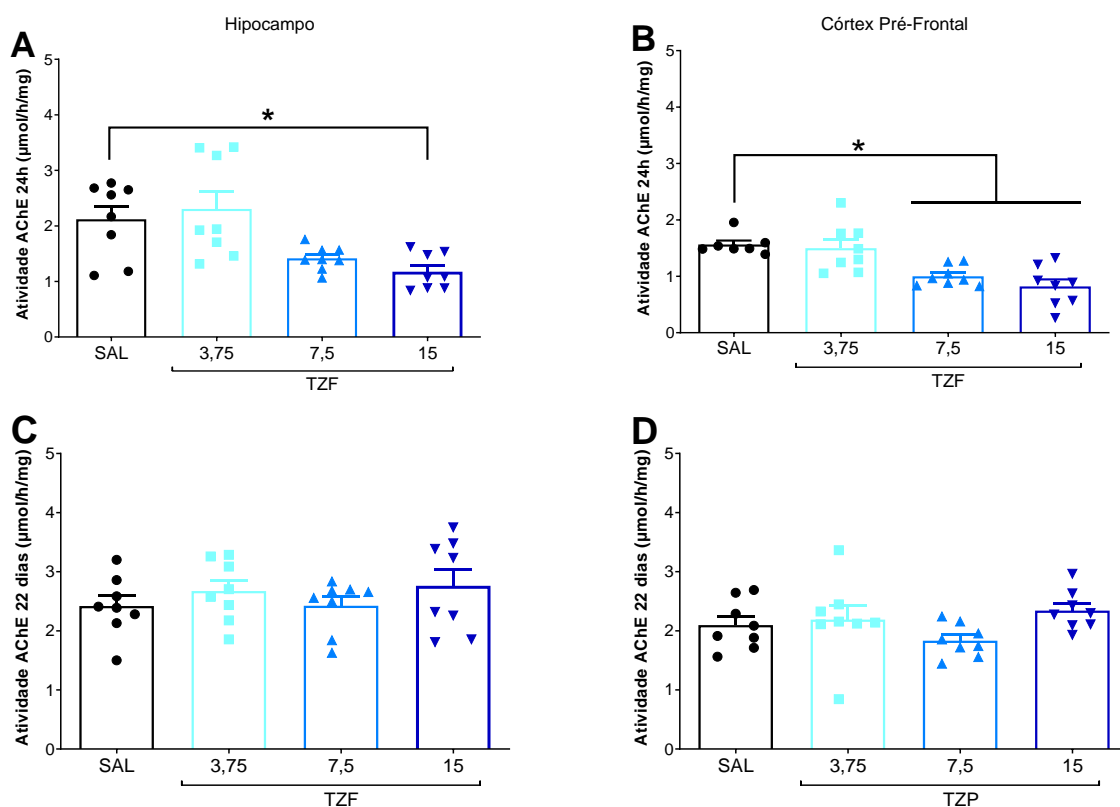
### **Atividade da acetilcolinesterase cerebral no hipocampo e no córtex pré-frontal de ratos jovens e adultos 24 horas e 22 dias após a administração de triazofós**

As figuras 17 e 18 mostram respectivamente a atividade da AChE hipocampal e cortical 24 h e 22 dias após a administração do triazofós em animais jovens e adultos.

Para animais jovens, a dose de 7,5 mg/kg ( $p = 0,065$ ) mostrou tendência estatística para reduzir a atividade da AChE e a dose de 15 mg/kg ( $p=0,010$ ) reduziu a atividade da AChE no hipocampo 24 h (Figura 17A) após a administração [ $F_{(3,28)} = 6,645$ ;  $p=0,002$ ;  $p =$  ]. Já a atividade da AChE no córtex pré-frontal (Figura 17B) foi reduzida pelas doses de 7,5 e 15 mg/kg de triazofós [ $F_{(3,27)} = 10,846$ ;  $p=0,001$ ;  $p = 0,004$ ,  $p = 0,001$  para as doses de 7,5 e 15 mg/kg, respectivamente, pelo teste post hoc de Dunnett]. A atividade da AChE do hipocampo (Figura 17C) [ $F_{(3,28)} = 0,735$ ;  $p=0,539$ ] e do córtex pré-frontal (Figura 17D) [ $F_{(3,28)} = 1,760$ ;  $p=0,178$ ] 22 dias após a intoxicação com triazofós não foi alterada.

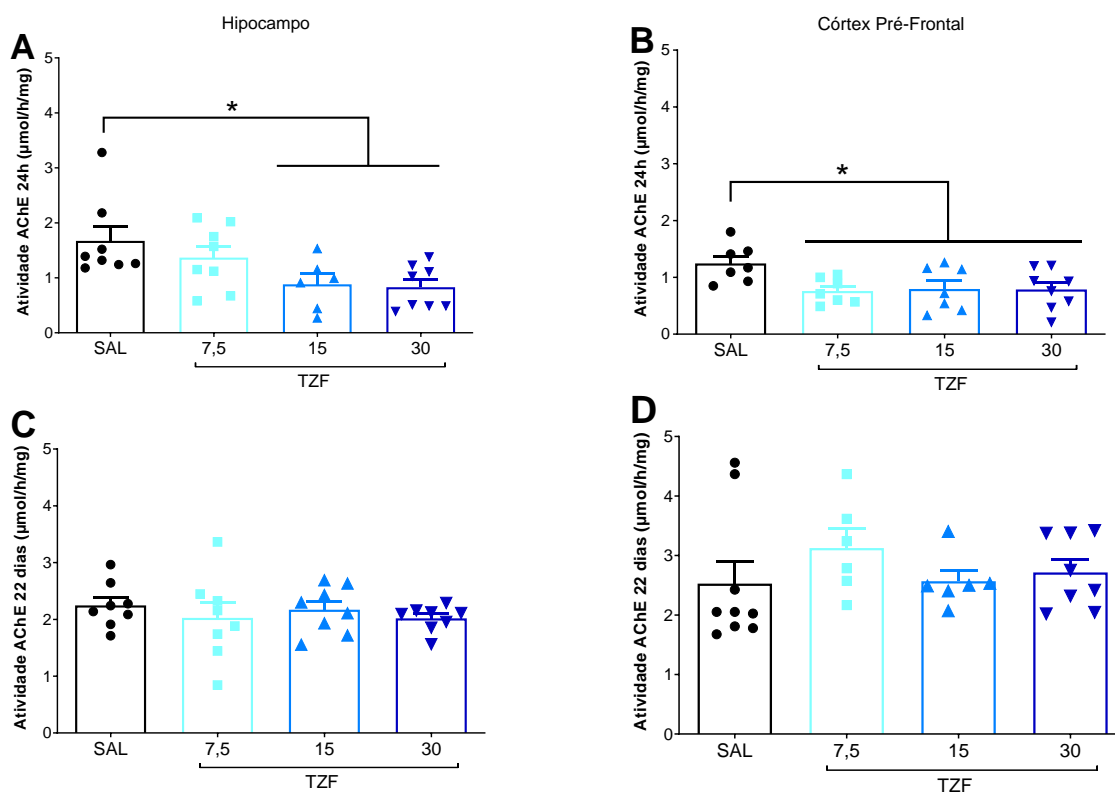
Para animais adultos, as doses de 15 e 30 mg/kg de triazofós reduziram a atividade da AChE no hipocampo 24 h (Figura 18A) após a administração [ $F_{(3,26)} = 3,908$ ;  $p=0,020$ ;  $p = 0,040$   $p = 0,016$ , respectivamente, pelo teste post hoc de Dunnett comparado ao grupo salina]. A atividade da AChE no córtex pré-frontal (Figura 18B) foi reduzida em todas as doses testadas [ $F_{(3,25)} = 3,487$ ;  $p=0,031$ ;  $p = 0,029$ ,  $p = 0,047$   $p = 0,034$ , para as doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, respectivamente, pelo teste post hoc de Dunnett comparado ao grupo salina]. A atividade da AChE do hipocampo (Figura 18C) [ $F_{(3,28)} = 0,427$ ;  $p=0,092$ ] e do córtex pré-frontal (Figura 18D) [ $F_{(3,25)} = 0,727$ ;  $p=0,545$ ] 22 dias após a intoxicação com triazofós não foi alterada.

## Ratos Jovens



**Figura 17:** Efeito de uma única injeção subletal de triazolofos (TZF) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em ratos jovens. Atividade da AChE no hipocampo (A) 24 h e (C) 22 dias após a injeção de solução salina (SAL; n= 8 e 8) ou TZF nas doses de 3,75 (n= 8 e 8), 7,5 (n=8 e 8), ou 15 mg/kg (n=8 e 8). Atividade de AChE no córtex pré-frontal (B) 24 h e (D) 22 dias após a injeção de solução salina (SAL; n= 7 e 8) ou TZF nas doses de 3,75 (n= 8 e 8), 7,5 (n=8 e 8), ou 15 mg/kg (n=8 e 8) no córtex pré-frontal. Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

## Ratos Adultos



**Figura 18:** Efeito de uma única injeção subletral de triazofos (TZF) na atividade da acetilcolinesterase (AChE) em ratos adultos. Atividade da AChE no hipocampo (A) 24 h e (C) 22 dias após a injeção de solução salina (SAL; n= 8 e 8) ou TZF nas doses de 7,5 (n= 8 e 8), 15 (n=6 e 8), ou 30 mg/kg (n=8 e 8). Atividade da AChE no córtex pré-frontal (B) 24 h e (D) 22 dias após a injeção de solução salina (SAL; n= 7 e 9) ou TZF nas doses de 7,5 (n= 7 e 6), 15 (n=7 e 6), ou 30 mg/kg (n=8 e 8). Os dados representam média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina por ANOVA seguida de teste *post hoc* de Dunnett.

# DISCUSSÃO

## 6. DISCUSSÃO

Ao observar os resultados encontrados no presente estudo é possível constatar que mesmo uma única exposição a uma formulação comercial de triazofós é capaz de alterar o comportamento de ratos, dependendo da dose utilizada e da idade dos animais. Os principais achados do nosso estudo mostraram que doses subletais de triazofós quando administradas por via intraperitoneal podem: 1) induzir comportamento tipo-ansioso no LCE em ratos jovens para doses baixas; 2) mostrar um efeito ansiolítico ou ansiogênico dependente da dose no LCE em animais adultos; 3) não alterar a atividade locomotora no CA, exceto para a maior dose em ratos jovens. 4) exibir um comportamento tipo-depressivo no TNF, de forma aguda e persistente sendo mais duradouro para ratos adultos; 5) inibir a atividade das enzimas BChE plasmática e AChE hipocampal e cortical 24 h após a intoxicação com recuperação das enzimas em 22 dias.

Sabe-se que a intoxicação aguda a produtos agrícolas é uma realidade. Essa forma de intoxicação seja por acidente ou de forma intencional geralmente ocorre a doses elevadas capazes de comprometer por completo o organismo levando inclusive à morte (BONVOISIN et al., 2020; MEW et al., 2017). Contudo, não é apenas a intoxicação letal que deve ser considerada um problema de saúde pública, uma vez que em diversos casos, os pacientes sobrevivem e acabam tendo que conviver com as consequências da intoxicação. Pensando nessas intoxicações, nossos animais receberam diferentes doses subletais de triazofós (jovens: 3,75; 7,5; 15 mg/Kg, adultos: 7,5; 15; 30 mg/Kg). Essas doses foram capazes de gerar nos animais os sinais característicos de uma intoxicação aguda por OF. A observação dos animais durante as primeiras horas pós-tratamento levou à manifestação de uma síndrome colinérgica, principalmente pelo aparecimento de sinais clássicos como: hipersalivação, exoftalmia (STORM, 2012), comprometimento da função motora, atividade locomotora e coordenação motora (MILESON et al., 1998), enquanto os animais tratados com salina não apresentaram nenhum dos sintomas mencionados. Dessa forma, esse protocolo foi capaz de simular, minimamente, a intoxicação aguda por OF observada na tentativa de suicídio ou na ingestão acidental em que o paciente sobrevive à síndrome colinérgica aguda (JEYARATNAM, 1990; LONDON et al., 2005) para avaliar qual a relevância desse processo no desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas.

Contudo, mesmo com a exibição clara de sinais clássicos de uma intoxicação colinérgica, os parâmetros de avaliação de toxicidade aguda são bastante subjetivos para confirmar se existiu realmente uma intoxicação ou não. Por esse motivo, o uso de um marcador de intoxicação acaba sendo requisitado. A inibição da BChE é considerada um marcador de intoxicação eficiente e de fácil determinação por ser uma enzima encontrada em grande quantidade no plasma. Não se sabe ao certo quais os efeitos que a inibição da BChE pode causar ao organismo, contudo, alguns estudos já demonstraram que ela está relacionada a uma diminuição na concentração do composto OF livre (DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009; EDDLESTON, 2018). Nossos resultados demonstraram que a atividade da BChE foi inibida em todas as doses tanto em animais jovens quanto em animais adultos 24 h após a intoxicação comprovando que os animais testados foram intoxicados.

Os resultados demonstraram um amplo espectro de alterações comportamentais que seguiram padrões diferentes quando comparadas as idades. Nos testes comportamentais relacionados à ansiedade, foi possível observar de forma mais concreta essas diferenças de padrões. Animais adultos apresentaram diminuição na exploração dos braços abertos do LCE para a dose de 15 mg/kg, o que pode ser interpretado como um efeito ansiogênico. Por outro lado, para a dose de 7,5 mg/kg, houve aumento da exploração dos braços abertos, o que pode ser primariamente interpretado como efeito ansiolítico.

Para explicar esses resultados conflitantes podem ser utilizados os dados secundários do próprio teste. Os animais intoxicados com a dose de 7,5 mg/kg também apresentaram aumento nas entradas nos braços fechados do LCE o que pode ser considerado um aumento na atividade locomotora. Portanto, entende-se que o efeito ansiolítico pode ser secundário ao aumento da locomoção. Por outro lado, quando avaliada a atividade locomotora no teste do CA, não foi observada alteração na distância total percorrida, o que contraria essa hipótese da interferência da locomoção no comportamento observado.

O efeito ansiolítico não é a única explicação possível para o aumento observado nos braços abertos do LCE. A maior exploração dos braços abertos pode ser um indicativo de aumento na impulsividade, a despeito da aversividade desses braços. Conforme definido por Bari e Robbins (2013), a impulsividade é a incapacidade de esperar para

realizar uma resposta, aumentando assim a probabilidade de o indivíduo realizar um comportamento de risco. Ainda nesse sentido, alguns modelos para transtorno de déficit de atenção e hiperatividade associam esse comportamento impulsivo ao aumento da exploração dos braços abertos do LCE (NIIMI; 2011; RUSSELL; 2011).

Além disso, diversos trabalhos vêm relacionando o aumento na neurotransmissão colinérgica a efeitos ansiolíticos. Esse efeito parece estar associado a atividade de receptores colinérgicos tanto nicotínicos quanto muscarínicos. Brioni e colaboradores (1994) demonstraram que um ativador colinérgico para receptores nicotínicos é capaz de induzir efeito ansiolítico em animais expostos ao LCE. De forma semelhante, Di Libreto e colaboradores (2017) demonstraram que o uso de oxotremorina, um agonista seletivo do receptor muscarínico da acetilcolina, reduz o comportamento ansioso de animais expostos a estresse crônico. Aparentemente esse efeito ansiolítico ocorre, pois a oxotremorina aumenta a neogênese em neurônios hipocampais.

Higley e Picciotto (2014) em um de seus trabalhos descreveram que aumentos na sinalização da ACh podem levar a sintomas relacionados à ansiedade e depressão. A ativação de nAChRs aumenta a liberação de glutamato de aferentes talamocorticais, enquanto a atividade de mAChR aumenta a excitabilidade dos neurônios piramidais (PNs) e reduz a liberação de GABA dos interneurônios direcionados ao soma (s-INs). Ao mesmo tempo, os mAChRs reduzem a liberação de glutamato intracortical, enquanto os nAChRs aumentam a excitabilidade dos interneurônios direcionados aos dendritos (d-INs) que regulam a integração sináptica.

Evidências anteriores também mostraram efeitos contraditórios induzidos por pesticidas OF no LCE e outros testes relacionados à ansiedade. Por exemplo, a exposição aguda a doses subcutâneas de clorpirifós induziu efeitos ansiogênicos ou ansiolíticos em ratos adultos testados no LCE, dependendo do intervalo entre a exposição e o teste (LÓPEZ-CRESPO et al., 2009; SÁNCHEZ-AMATE et al., 2001). Uma única administração intraperitoneal a altas doses de paraoxon em ratos adultos promove efeitos ansiolíticos 14 dias depois da intoxicação associado a alterações de proteínas transportadoras de glutamato no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos (ZARE et al., 2019). Em contraste, Valvassori e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição aguda ao OF malation em doses subletais não alterou o comportamento dos animais no LCE, nem apresentou diferenças significativas

relacionadas à ansiedade no CA. Este trabalho afirma que a ausência de alterações comportamentais nesses animais se deve, possivelmente, a um baixo grau de aversividade relacionado a esses testes.

Diferentemente do padrão observado em ratos adultos, os animais jovens quando testados no LCE apresentaram efeito ansiogênico no LCE apenas após a exposição à menor dose de triazofós, a qual não provocou inibição da AChE cortical ou hipocampal.

Há evidências de que o cérebro em desenvolvimento é particularmente vulnerável à exposição ao OF, o que é consistente com a evidência de que os efeitos do neurodesenvolvimento podem ocorrer em doses abaixo do limite para toxicidade sistêmica ou mesmo inibição da AChE (ABREU-VILLAÇA, LEVIN; 2017; RIBEIRO-CARVALHO; 2020; RICCERI; 2006). Esses dados corroboram com os nossos, uma vez que os animais apresentaram comportamento ansiogênico mesmo sem inibição hipocampal ou cortical da AChE.

A exposição repetida ao clorpirifós durante a fase perinatal provocou uma curva dose-resposta em forma de U invertido de comportamento ansioso em camundongos fêmeas adultas (BRAQUENIER et al., 2010). Em contrapartida, doses baixas repetidas de clorpirifós em ratos pré-desmame também induziram um efeito ansiolítico em animais jovens (CARR et al., 2020).

Referente aos resultados do teste do CA, para a atividade locomotora, os animais adultos não apresentam alterações na distância total percorrida, demonstrando que não houve comprometimento motor nos resultados. Ratos jovens, por outro lado, apresentaram diminuição da atividade locomotora na dose mais alta (15 mg/kg), o que também pode demonstrar como esses animais são mais suscetíveis à intoxicação do que os animais adultos.

Considerando o potencial do teste de CA para um teste de ansiedade (CRAWLEY; 1980), animais expostos a ansiolíticos exploram mais o centro, enquanto animais muito ansiosos exploram menos o centro do aparelho (PRUT; BELZUNG; 2003). Em nossos animais, houve uma redução da exploração do centro do CA nas doses mais altas de triazofós, tanto em animais jovens quanto em adultos, o que é interpretado como um comportamento ansiogênico.

Diferentemente dos resultados do LCE, para o TNF, aparentemente o padrão de alterações comportamentais apresentado se manteve semelhante tanto em animais jovens quanto em animais adultos. O triazofós aumentou a frequência de imobilidade em animais de ambas as idades, sugerindo que o OF induziu um comportamento do tipo-depressivo nos roedores intoxicados. Esse resultado é similar ao encontrado anteriormente por nosso grupo para o clorpirifós (SIQUEIRA et. al.; 2019). Considerando este mesmo trabalho, onde o efeito do tipo-depressivo desapareceu 30 dias após a intoxicação, nossa hipótese inicial era de que o efeito persistiria por um prazo inferior a 30 dias. O comportamento do tipo-depressivo induzido pelo triazofós foi persistente nas doses mais baixa e mais alta até 22 dias após a intoxicação para animais adultos, enquanto para animais jovens, o comportamento foi mantido para as duas doses mais altas por até 15 dias após a intoxicação.

É notável que animais jovens e adultos apresentam sensibilidades diferentes à intoxicação por triazofós. Conforme já descrito por Singh e Rishi (2005), ratos jovens suportam apenas metade da dose máxima tolerada por ratos adultos, apresentando sinais colinérgicos semelhantes aos observados em animais adultos na dose máxima. Essas diferenças vão além do peso e do tamanho do corpo. Triazofós tem semelhança química com outro organofosforado, clorpirifós. A enzima plasmática PON-1 hidrolisa o clorpirifós-oxon, o metabólito ativo do clorpirifós, diminuindo seus efeitos tóxicos. Animais jovens apresentam níveis plasmáticos reduzidos dessa enzima, o que os torna mais suscetíveis à intoxicação (COLE et al. 2012). Assim, é possível que o mesmo padrão de metabolismo e sensibilidade ocorra com o triazofós.

No presente estudo, também observamos que a intoxicação aguda por triazofós diminuiu a atividade da AChE 24 horas após a intoxicação no hipocampo nas duas doses mais altas e no córtex pré-frontal em todas as doses testadas para animais adultos, enquanto para animais jovens, foi observada inibição no hipocampo na dose mais alta e no córtex pré-frontal nas duas doses mais altas, indicando que os efeitos agudos observados no LCE, CA e TNF são, possivelmente, devidos à inibição enzimática da AChE nessas áreas.

A hipótese proposta por Janowsky e colaboradores (1972) determina como uma das causas da depressão um desequilíbrio entre uma neurotransmissão colinérgica e adrenérgica, em que há um aumento significativo na primeira e uma queda na

segunda. Outros estudos também confirmam essa hipótese que relaciona o aumento dos níveis de ACh com sintomas relacionados à depressão. Um exemplo é a administração periférica de fisostigmina, um inibidor da AChE que induz sintomas de ansiedade e depressão em humanos, diminuindo a degradação da ACh e aumentando seus níveis cerebrais (RISCH et al. 1980). Além disso, testes em roedores confirmam que o aumento dos níveis de ACh pode induzir comportamento semelhante à ansiedade e depressão, enquanto o tratamento crônico com o antidepressivo serotoninérgico fluoxetina aumenta os níveis de atividade da AChE, particularmente no hipocampo (MINEUR et al. 2013).

Em trabalho recente, Mineur e colaboradores (2022) relataram que níveis de acetilcolina (ACh) estão elevados em indivíduos ativamente deprimidos e que antagonista de receptor nicotínicos e muscarínicos podem ter efeito antidepressivos em humanos e diminuir o comportamento em roedores. Possivelmente, esse mecanismo está relacionado a uma resposta desadaptativa ao estresse onde os níveis de ACh e o bloqueio sistêmico da AChE provocam sintomas semelhantes à depressão em humanos e que o bloqueio seletivo da enzima no hipocampo também provoca o mesmo tipo de comportamento em roedores.

Alguns estudos têm demonstrado a interação entre a ação do OF e a atividade da AChE nessas regiões. Um estudo com o OF diazinon, administrado por via intraperitoneal a 39 mg/kg, inibiu a atividade da AChE no hipocampo e córtex pré-frontal (JUDGE et al. 2016). Nosso grupo demonstrou que a intoxicação aguda por clorpirifós reduz a atividade da AChE no hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal (SIQUEIRA et al. 2019)

No entanto, a inibição da AChE, bem como da BChE, não é mantida até o final do protocolo. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a inibição gerada pelo triazofós é mantida por pelo menos 48 horas (RODRIGUES et al. 2020), porém nossos dados atuais demonstraram que em algum momento entre 48 horas e 22 dias, ocorre recuperação da atividade enzimática. Além disso, é possível observar que, mesmo com 24 h, animais jovens expostos a menor dose de triazofós apresentam alterações comportamentais mesmo sem inibição da AChE, o que indica que além dos mecanismos colinérgicos, é muito provável que existam outros mecanismos envolvidos com as alterações comportamentais observadas nesses animais.

Tanto no LCE quanto no TNF foi observado um efeito comportamental independente da inibição da AChE. O efeito ansiolítico induzido pela menor dose de triazofós administrado em adultos não alterou a atividade da AChE no hipocampo, dando a entender que essa estrutura não se relaciona ao efeito observado por essa dose. Já para os ratos jovens, a menor dose não inibiu a atividade da AChE nem no córtex pré-frontal nem no hipocampo, dessa forma o efeito ansiogênico parece não estar associado a um mecanismo colinérgico. Para o TNF o efeito tipo-depressivo observado segue o mesmo padrão.

Nossos resultados também mostraram uma diminuição significativa na frequência de natação no TNF em animais intoxicados com triazofós quando comparados ao grupo controle. Um estudo de Detke e colaboradores (1995) relacionou os comportamentos ativos exibidos pelos animais durante a sessão do TNF com os efeitos de diferentes classes de antidepressivos. De acordo com este estudo, o comportamento de natação estaria envolvido com o sistema serotoninérgico, uma vez que drogas que atuam inibindo a recaptação de serotonina aumentam a frequência de natação em ratos. Já o comportamento de escalada estaria relacionado com o sistema noradrenérgico por ser sensível a inibidores da receptação de noradrenalina. Dessa forma, é possível que a intoxicação com triazofós, a qual reduziu a frequência de natação, tenha diminuído a neurotransmissão serotoninérgica.

Alguns trabalhos também encontraram esse mesmo padrão. Sanchez-Amate e colaboradores (2001) demonstraram mudanças comportamentais independentes de manifestações colinérgicas em animais adultos testados no LCE. Aldridge e colaboradores (2003) apontaram que dentre os efeitos causados pela exposição ao OF, um dos mais destacados é a alteração na síntese de serotonina ou na expressão de seus receptores e transportadores. Além disso, Slotkin e colaboradores (2008) demonstraram que uma única exposição ao clorpirifós em ovos de aves também reduziu a expressão dos receptores 5HT<sub>1A</sub> do cérebro dos animais após o nascimento.

Outra hipótese para explicar o porquê do comportamento tipo-depressivo induzido pelo triazofós ser persistente mesmo sem a inibição da AChE envolve neurotoxicidade de longo prazo. Alguns estudos demonstraram que a intoxicação por OF pode levar à morte neuronal progressiva e irreversível devido à excitotoxicidade colinérgica e não colinérgica no cérebro, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios

neuropsiquiátricos (CHEN, 2012; TSAI; LEIN, 2021). A neurotoxicidade e disfunção colinérgica levam à perda de integridade de vias colinérgicas específicas e, por sua vez, resulta em morte neuronal em regiões como o hipocampo e a amígdala (CHEN, 2012). De fato, estresse oxidativo, neuroinflamação e células apoptóticas foram observados em diferentes regiões do cérebro de ratos após exposição aguda ou repetida a pesticidas OF (FARKHONDEH et al., 2020; KIM et al., 1999; SUNKARIA et al., 2014).

Outro fato importante a ser avaliado nesse processo é que os animais jovens se recuperam mais rapidamente desse efeito comportamental persistente do que os animais adultos, embora esses animais sejam mais sensíveis a uma intoxicação mais letal. Trabalhos da literatura demonstraram que ratos mais jovens, mesmo sendo mais suscetíveis a efeitos letais agudos, apresentam alterações químicas e comportamentais menos persistentes do que animais adultos (ATTERBERRY et al., 1997; MOSER et al., 1998; POPE et al., 1991; VIDAIR, 2004). A rápida recuperação dos animais jovens pode ser explicada pela maior neurogênese em áreas cerebrais como o hipocampo em comparação aos adultos (EPP et al., 2009). Notavelmente, ratos jovens intoxicados com diisopropilfluorofosfato (DFP) apresentam convulsões menos graves associadas a maior neurogênese hipocampal (GONZÁLEZ et al., 2021). Os diferentes desfechos observados entre ratos jovens e adultos expostos ao triazofós podem estar relacionados à neuroplasticidade e resiliência dos animais jovens. Mais pesquisas para abordar esta hipótese são necessárias.

É válido ressaltar, ainda, que por mais que os resultados referentes ao efeito tipo-depressivo aparentem ser sólidos, foi utilizado apenas o TNF para avaliar esse tipo de alteração comportamental. Embora o TNF seja um bom modelo de *screening* para efeitos depressivo/antidepressivo, ele não é um modelo de depressão (COMMONS et al., 2017). Dessa maneira, seria interessante reproduzir o resultado encontrado no TNF em outros modelos comportamentais, como por exemplo o teste de preferência por sacarose.

Além disso, é importante reiterar que os resultados referentes ao efeito tipo-ansioso são apenas agudos devido a escolha de protocolo realizada onde apenas foi feito o teste 24 h após a intoxicação. É necessário lembrar que existem controvérsias referentes ao uso de medida repetida para esse modelo além disso, dados anteriores

do nosso laboratório não tornaram pertinentes o teste persistente para o modelo de LCE, uma vez que o efeito nesse modelo não foi observado para outros OF.

# CONCLUSÃO

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, é possível concluir que animais jovens e adultos apresentam padrões diferentes de alterações comportamentais após uma única dose do organofosforado triazofós.

Também foi observado que animais jovens são mais suscetíveis à intoxicação por triazofós, possivelmente por conta do desenvolvimento ainda incompleto, quando comparado aos adultos.

O acúmulo de ACh causado pela inibição da AChE cerebral parece estar parcialmente relacionado às alterações comportamentais relacionadas à ansiedade e depressão, mas não parece ser o mecanismo direto subjacente a persistência do comportamento tipo-depressivo, o que indica que existem outros mecanismos não colinérgicos envolvidos nos prejuízos comportamentais.

Finalmente, do ponto de vista translacional, nosso estudo sugere que mesmo a exposição aguda ao triazofós tem o potencial de gerar prejuízos a saúde mental de indivíduos intoxicados, de forma imediata e persistente. Por isso, é importante incluir avaliações sobre a saúde mental no monitoramento dos riscos à população exposta.

## 8. REFERÊNCIAS

ACKER, C. I. et al. Repeated malathion exposure induces behavioral impairment and AChE activity inhibition in brains of rat pups. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2310–2315, nov. 2011.

ANVISA. **Consulta Pública nº 262, de 10 de outubro de 2016**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2858730/CONSULTA+PÚBLICA+N+262+GGTOX.pdf/e01d7f65-5f83-482e-b1e3-685560a029fd>>.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. AChE : Uma Enzima de Interesse Farmacológico. v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016.

ARAÚJO, A. J. DE et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115–130, 2007.

ASSIS, C. R. D. et al. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure : new and forgotten insights. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–13, 2018.

BARR, D. B. et al. Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. **Environmental Research**, v. 99, n. 3, p. 314–326, 2005.

BOMBARDI, L. M. Agrotóxicos e agronegócio: arcaico e moderno se fundem no campo brasileiro. **Direitos Humanos no Brasil 2012**, p. 75–86, 2012.

BONVOISIN, T. et al. Suicide by pesticide poisoning in India: A review of pesticide regulations and their impact on suicide trends. **BMC Public Health**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2020.

BRANDÃO, M. L. et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)**, v. 25 Suppl 2, n. Supl II, p. 36–41, 2003.

BRAQUENIER, J. B. et al. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and teratology**, v. 32, n. 2, p. 234–9, 2010.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins**. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/3595038/pg-3-secao-1-diario-oficial-da-uniao-dou-de-12-071989/pdfView>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. [s.l: s.n.].

BRIONI, J. D. et al. Anxiolytic-like effects of the novel cholinergic channel activator ABT-418. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 271, n. 1, p. 353, 1 out. 1994.

- CARR, R. L. et al. Inhibition of fatty acid amide hydrolase by chlorpyrifos in juvenile rats results in altered exploratory and social behavior as adolescents. **NeuroToxicology**, v. 77, n. January, p. 127–136, 2020.
- CHA, J. et al. Abnormal hippocampal structure and function in clinical anxiety and comorbid depression. **Hippocampus**, v. 26, n. 5, p. 545–553, 1 maio 2016.
- CHANDRA, M. et al. Determination of median lethal dose of triazophos with DMSO in wistar rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 7, n. 4, p. 64–67, 2014.
- CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. REVIEW ARTICLE Comparison of butyrylcholinesterase. **The Biochemical Journal**, v. 260, n. 3, p. 625–634, 1989.
- CHEN, W. Q. W.-Q. et al. Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. **Neuroscience letters**, v. 570, p. 76–80, 6 jun. 2014.
- CLARK, R. F. Inseticides: Organic phosphorus compounds and carbamate. In: **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. 9. ed. [s.l: s.n.]. p. 1497–1512.
- COLE, T. B. et al. Neurobehavioral assessment of mice following repeated postnatal exposure to chlorpyrifos-oxon. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 3, p. 311–322, 2012.
- COMMISSION, E. REGULAMENTO (CE) N.º 2076/2002 DA COMISSÃO de 20 de Novembro de 2002. **Europeias, Jornal Oficial das Comunidades**, n. 7, 2002.
- COMMONS, K. G. et al. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-Like Behavior. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, p. 955–960, 2017.
- COSTA, L. G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 162, n. 1, p. 24–35, 2018.
- DE QUEIROZ, V. T. et al. Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 219, p. 18–27, 2018.
- DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system and spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 389–411, 10 ago. 2011.
- DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: A review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 407–428, 2009.
- DESIKAN, A.; WILLS, D. N.; EHLERS, C. L. Ontogeny and adolescent alcohol exposure in Wistar rats: Open field conflict, light/dark box and forced swim test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 122, p. 279–285, 2014.

- DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 66–72, 1995.
- DI LIBERTO, V. et al. Anxiolytic effects of muscarinic acetylcholine receptors agonist oxotremorine in chronically stressed rats and related changes in BDNF and FGF2 levels in the hippocampus and prefrontal cortex. **Psychopharmacology**, v. 234, n. 4, p. 559–573, 1 fev. 2017.
- DO NASCIMENTO, C. P. et al. Methamidophos, an Organophosphorus Insecticide, Induces Pro-aggressive Behaviour in Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 32, n. 3, p. 398–408, 2017.
- DOREMUS, T. L.; VARLINSKAYA, E. I.; SPEAR, L. P. Factor analysis of elevated plus-maze behavior in adolescent and adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 4, p. 570–577, 2006.
- DOS SANTOS, J. C. P. et al. Sociodemographic characteristics and exposure patterns of pesticide-related cases reported to a poison service center in Brazil between 2012 and 2016. **Archives of Environmental and Occupational Health**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.
- EDDLESTON, M. et al. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 597–607, 16 fev. 2008.
- EDDLESTON, M. Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 341–360, 2018.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.
- HIGLEY, M. J.; PICCIOTTO, M. R. Neuromodulation by acetylcholine: Examples from schizophrenia and depression. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 88–95, 2014.
- HOLSTEGE, C. P.; DOBMEIER, S. G.; BECHTEL, L. K. Critical Care Toxicology. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 715–739, 2008.
- IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos Boletim Anual de Comercialização de Agrotóxicos**, 2020. Disponível em: <<https://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios><https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxico>>. Acesso em: 12 abr. 2020
- JAIN, S. et al. Possible role of oxidative stress and brain derived neurotrophic factor in triazophos induced cognitive impairment in rats. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 10, p. 2136–2147, 2013.
- JOCA, S. R. L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARÃES, F. S. Estresse, depressão e hipocampo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, n. SUPPL. 2, p. 46–51, 2003.

- JOHNSON, M. K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. **The Biochemical journal**, v. 114, n. 4, p. 711–7, 1 out. 1969.
- JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, n. 3, p. 139–60, set. 2001.
- JOKANOVIĆ, M. Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. **Toxicology**, v. 410, p. 125–131, 2018.
- JUREWICZ, J.; HANKE, W. Prenatal and childhood exposure to pesticides and neurobehavioral development: Review of epidemiological studies. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 21, n. 2, p. 121–132, 2008.
- KARALLIEDDE, L.; SENANAYAKE, N. Organophosphorus insecticide poisoning. **British Journal of Anaesthesia**, v. 63, n. 6, p. 736–750, 1989.
- KARANTH, S.; POPE, C. Age-related effects of chlorpyrifos and parathion on acetylcholine synthesis in rat striatum. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 25, n. 5, p. 599–606, 2003.
- LASSITER, T. L. et al. Gestational exposure to chlorpyrifos: Apparent protection of the fetus? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 56–65, 1998.
- LASSITER, T. L. et al. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v. 186, n. 3, p. 241–253, 2003.
- LAUDER, J. M.; SCHAMBRA, U. B. Morphogenetic roles of acetylcholine. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. SUPPL. 1, p. 65–69, 1999.
- LEWIS, E. M. et al. Sexual maturation data for Crl sprague-dawley rats: Criteria and confounding factors. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 437–458, 2002.
- LIMA, C. S. et al. Exposure to methamidophos at adulthood elicits depressive-like behavior in mice. **NeuroToxicology**, v. 30, n. 3, p. 471–478, 2009.
- LÓPEZ-CRESPO, G. A. et al. Acute high dose of chlorpyrifos alters performance of rats in the elevated plus-maze and the elevated T-maze. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 6, p. 1025–9, nov. 2009.
- MCDONOUGH, J. H. et al. Atropine and/or diazepam therapy protects against soman-induced neural and cardiac pathology. **Fundamental and applied toxicology**, v. 13, p. 256–276, 1989.
- MEW, E. J. et al. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. **Journal of Affective Disorders**, v. 219, n. May, p. 93–104, 2017.
- MEZADRI, T. J. et al. Repeated rat-forced swim test: Reducing the number of animals to evaluate gradual effects of antidepressants. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 200–205, 2011.

- MILESON, B. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides,. **Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1998.
- MILESON, B. E. et al. Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1998.
- MINEUR, Y. S. et al. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3573–3578, 2013.
- MINEUR, Y. S. et al. Hippocampal acetylcholine modulates stress-related behaviors independent of specific cholinergic inputs. **Molecular Psychiatry**, 8 jan. 2022.
- MINK, P. J.; KIMMEL, C. A.; LI, A. A. Potential effects of chlorpyrifos on fetal growth outcomes: Implications for risk assessment. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 15, n. 4, p. 281–316, 2012.
- MOA CHINA. **OF, Ministry of Agriculture e 2032, The People's Republic of China Announcement**. Disponível em:  
<[http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219\\_3718683.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219_3718683.htm)>.
- MORAGAS, W.; SCHNEIDER, M. D. O.; MORAGAS, M. D. O.; SCHNEIDER, W. M. Biocidas: Suas Propriedades E Seu Histórico No Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26–40, 2003.
- MUMMADI, M. K. et al. Investigation of an acute neurological outbreak in Eluru, India, 2020. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11 November, p. 1–14, 2021.
- PARSONS, S. M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 15, p. 2423–34, dez. 2000.
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.
- PETROIANU, G. A. et al. Reversible cholinesterase inhibitors as pre-treatment for exposure to organophosphates: assessment using azinphos-methyl. **Journal of applied toxicology : JAT**, v. 35, n. 5, p. 493–499, 3 set. 2015.
- PICCIOTTO, M. R. et al. Mood and anxiety regulation by nicotinic acetylcholine receptors: A potential pathway to modulate aggression and related behavioral states. **Neuropharmacology**, v. 96, n. PB, p. 235–243, 2015.
- POHANKA, M. CHOLINESTERASES , A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY Miroslav Pohanka. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.**, v. 155, n. 3, p. 219–230, 2011.
- PORSOLT, R. D. et al. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, fev. 1978.

- RANI, S.; MADAN, V. K.; KATHPAL, T. S. Persistence and dissipation behavior of triazophos in canal water under Indian climatic conditions. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v. 50, n. 1, p. 82–84, 2001.
- RECENA, M. C. P.; PIRES, D. X.; CALDAS, E. D. Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **The Science of the total environment**, v. 357, n. 1–3, p. 88–95, 2006.
- ROBERTS T.R., HUTSON D.H., C. Organophosphorus insecticides. In: **Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides**. UK: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999. p. 187–522.
- RODRIGUES, J. V. F. et al. A single dose of the organophosphate triazophos induces fear extinction deficits accompanied by hippocampal acetylcholinesterase inhibition. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 82, n. October, p. 106929, 2020.
- ROHITRATTANA, J. et al. Organophosphate Pesticide Exposure in School-Aged Children Living in Rice and Aquacultural Farming Regions of Thailand. **Journal of Agromedicine**, v. 19, n. 4, p. 406–416, 2014.
- SÁNCHEZ-AMATE, M. C.; FLORES, P.; SÁNCHEZ-SANTED, F. Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, n. 4, p. 285–292, 2001.
- SANTOS, V. M. DOS R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.
- SEANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L. Neurotoxic Effects of Organophosphorus Insecticides. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 13, p. 761–763, 1987.
- SHARMA, D.; SANGHA, G. K. Triazophos induced oxidative stress and histomorphological changes in liver and kidney of female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 110, n. 1, p. 71–80, 2014.
- SILOTE, G. P. et al. **Investigação dos efeitos comportamentais de antagonistas NMDA em ratos expostos ao labirinto em T elevado**VIII Reunião Regional de Federação de Sociedades de Biologia Experimental- FeSBE. Guarapari: [s.n.].
- SILVA, J. G. et al. Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy. **Neuroscience Letters**, v. 641, p. 94–100, 2017.
- SINGH, M.; RISHI, S. Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 471–476, maio 2005.
- SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Disponível em: <<https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>>.
- SIQUEIRA, A. A. et al. Atropine counteracts the depressive-like behaviour elicited by acute exposure to commercial chlorpyrifos in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 71, p. 6–15, 2019.

SISK, C. L.; ZEHR, J. L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 26, n. 3–4, p. 163–174, 2005.

SOUZA, J. P. DE et al. Atividade colinesterásica cerebral e comportamento de ratos após exposição perinatal ao diclorvós. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 501–508, 2006.

STEPHENS, R. et al. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. **The Lancet**, v. 345, n. 8958, p. 1135–1139, maio 1995.

STORM, J. E. Organophosphorus Pesticides. v. 4, n. 4, 2012.

SUAREZ-LOPEZ, J. R. et al. Associations of acetylcholinesterase activity with depression and anxiety symptoms among adolescents growing up near pesticide spray sites. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 222, n. 7, p. 981–990, 2019.

Triazofos monografia ANVISA. p. 210890, 2016.

TSAI, Y. H.; LEIN, P. J. **Mechanisms of organophosphate neurotoxicity**. [s.l.] Elsevier B.V., 2021. v. 26

ULLOA, R. E. et al. Age differences in the impact of forced swimming test on serotonin transporter levels in lateral septum and dorsal raphe. **Behavioral and Brain Functions**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2014.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. **Toxicology Letters**, v. 102–103, p. 649–652, 1998.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: A review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 5, p. 409–471, 1999.

VAN WENDEL DE JOODE, B. et al. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. **Cortex**, v. 85, p. 137–150, 2016.

WU, J. et al. Biological mechanisms associated with triazophos (TAP) removal by horizontal subsurface flow constructed wetlands (HSFCW). **Science of the Total Environment**, v. 553, p. 13–19, 2016.

YANG, C. et al. Identification of the biochemical degradation pathway of triazophos and its intermediate in *Diaphorobacter* sp. TPD-1. **Current Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1294–1301, 2011.

YANG, F. W. et al. Organophosphorus pesticide triazophos: A new endocrine disruptor chemical of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 159, n. March, p. 91–97, 2019.

ZARE, Z. et al. Anxiolytic activity of paraoxon is associated with alterations in rat brain glutamatergic system. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 71, p. 32–40, 2019

## ANEXOS 1

## CERTIFICADO CEUA



**Universidade Federal  
do Espírito Santo**



## CERTIFICADO

**Certificamos que a proposta intitulada** **Investigação de possíveis alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo organofosforado triazofos**

Registrada sob o n.º **29/2017** sob a responsabilidade de **VANESSA BEIJAMINI HARRIS**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 167.6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **10 de agosto de 2018**

**Vigência da autorização:** agosto/17 a julho/21 **Finalidade:** Pesquisa

**Espécie(s):** Camundongo (Mus musculus) e Rato (Rattus norvegicus)

**Linhagem(ns)/raça(s):** Swiss (camundongos) e Wistar (ratos)

**Peso:** 25 a 55 gramas (camundongos); 45 a 300 gramas (ratos) **Idade:** 21 dias a 3 meses **Sexo:** Macho

**Número de animais:** 110 camundongos; 650 ratos (350 adultos e 300 jovens)

**Origem:** Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo

  
**Breno Souza Salgado**  
 Coordenador da CEUA-Ufes

Vitória-ES, **31 de agosto de 2018**

\*Este certificado revoga o previamente emitido aprovado na reunião Extraordinária de 21 de julho de 2017  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA  
 Avenida Marechal Campos, 1468 - Marilupe - Vitória/ES - CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 - ceua@ufes.br - www.ceua.ufes.br

## APÊNDICE 1

### TOXICIDADE AGUDA

**Tabela 1:** Tabela para coleta de dados do teste de toxicidade aguda. Adaptado de MCDONOUGH, 1989

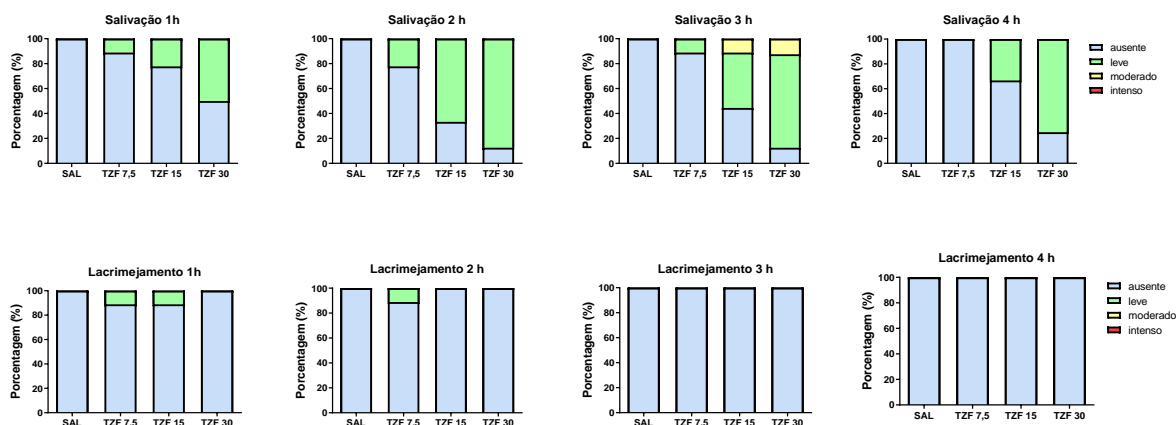
Sinais	1h	2h	3h	4h
<b>Salivação</b>				
<b>Lacrimejamento</b>				
<b>Exoftalmia</b>				
<b>Coordenação Motora</b>				
<b>Atividade Exploratória</b>				
<b>Prejuízo Motor</b>				

**Tabela 2:** Medidas de intoxicação aguda. Adaptado de MCDONOUGH, 1989

Sinal	Severidade	Nota
<b>Salivação</b>	I. Normal	0
	II. Lamber e mastigar	1
	III. Molhado em volta da boca	2
	IV. Saliva escorrendo pela Boca	3
<b>Lacrimejamento</b>	I. Normal	0
	II. Umidade nos olhos	1
	III. Lágrimas	2
	VI. Lágrimas de Sangue	3
<b>Exoftalmia</b>	I. Normal	0
	II. Leve	1
	III. Moderado	2
	IV. Intenso	3
<b>Coordenação Motora</b>	I. Normal, alerta	0
	II. Hipoativo responsivo	1
	III. Hipoativo	2
	IV. Prostrado	3
<b>Atividade Exploratória</b>	I. Normal	0
	II. Desconcertante	1
	III. Reflexo postural prejudicado	2
	IV. Perda do reflexo postural	3
<b>Prejuízo Motor</b>	I. Normal	0
	II. Fasciculação	1
	III. Tremor	2
	IV. Convulsão	3

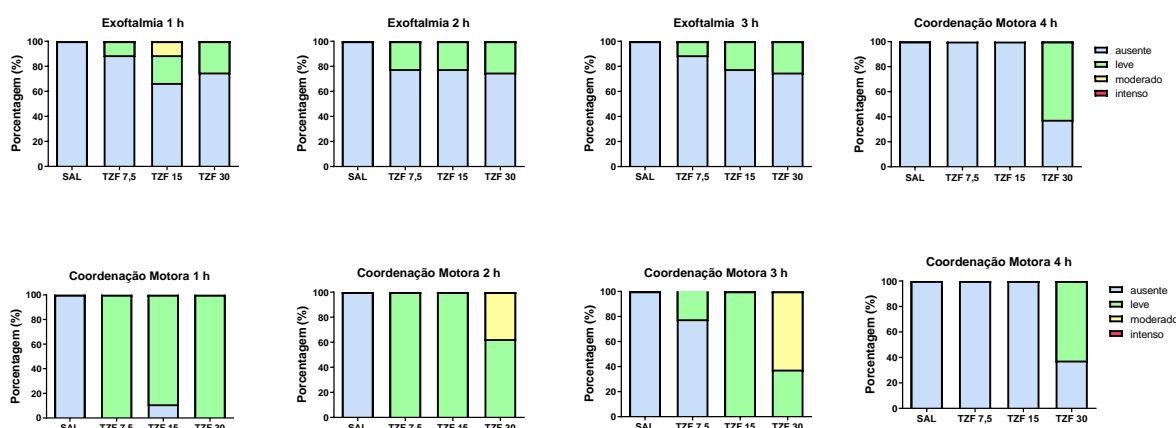
Resultados da Toxicidade Aguda induzida pela administração de uma única dose de triazofós nas 4 primeiras horas após a administração em ratos adultos e jovens.

#### Ratos Adultos



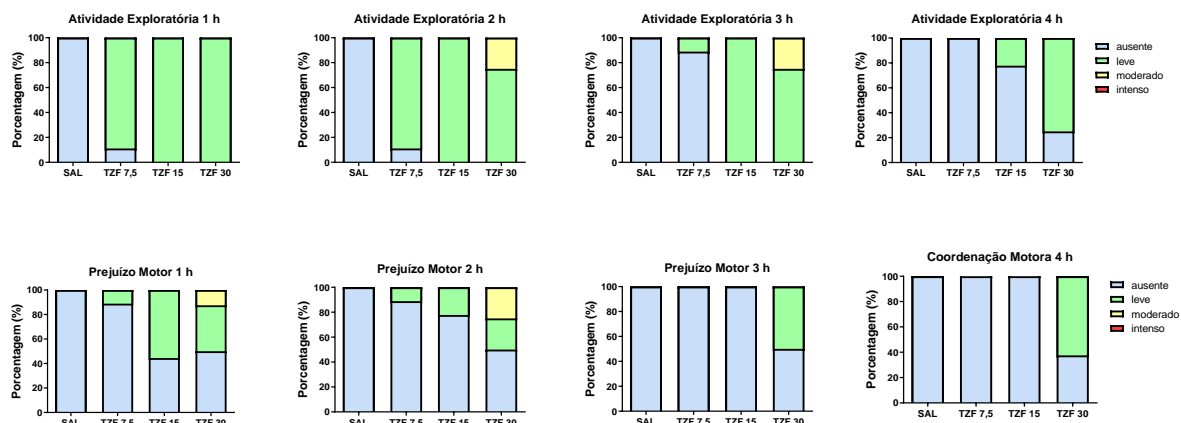
**Figura 1:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos adultos por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam salivação ou lacrimejamento ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZF = triazofós.

#### Ratos Adultos



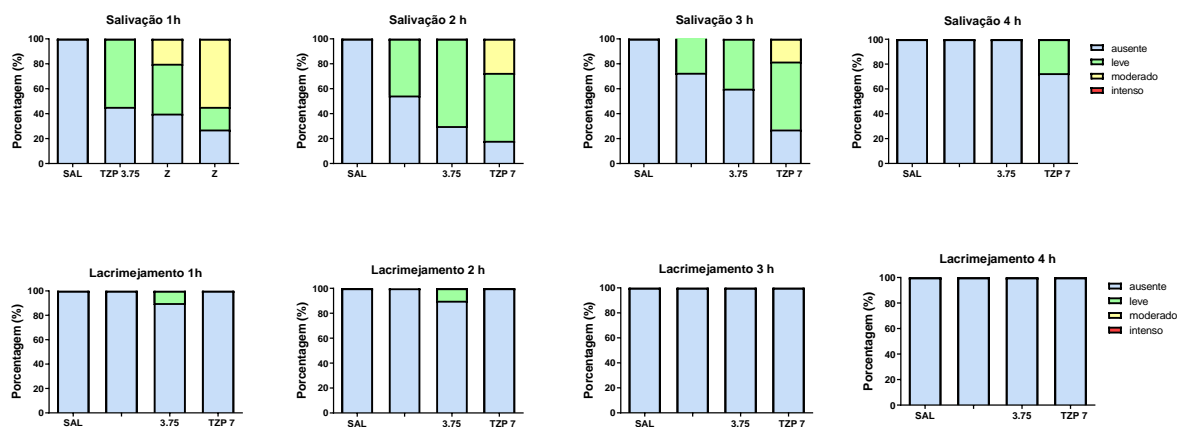
**Figura 2:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos adultos por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam exoftalmia ou coordenação motora ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZF = triazofós.

## Ratos Adultos



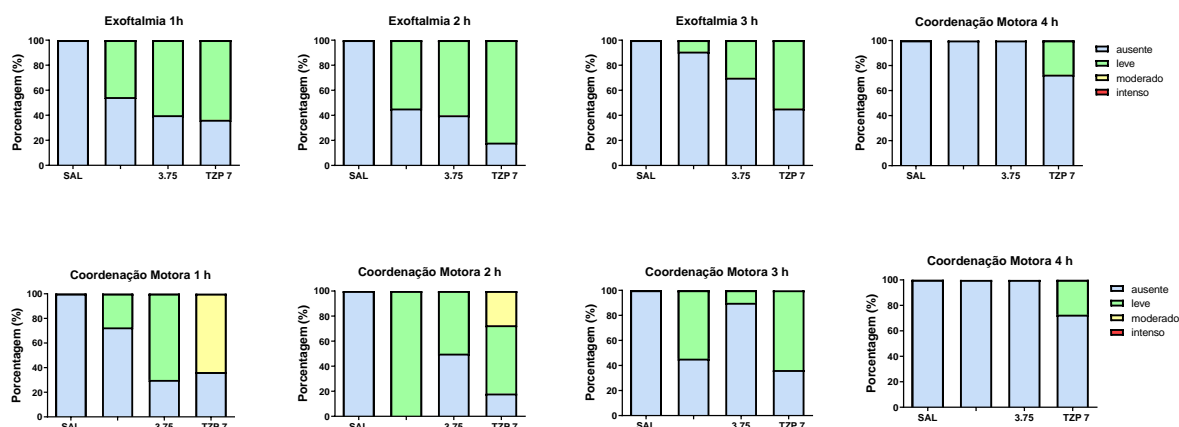
**Figura 3:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos adultos por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam atividade exploratória ou prejuízo motor ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZF = triazofós.

## Ratos Jovens



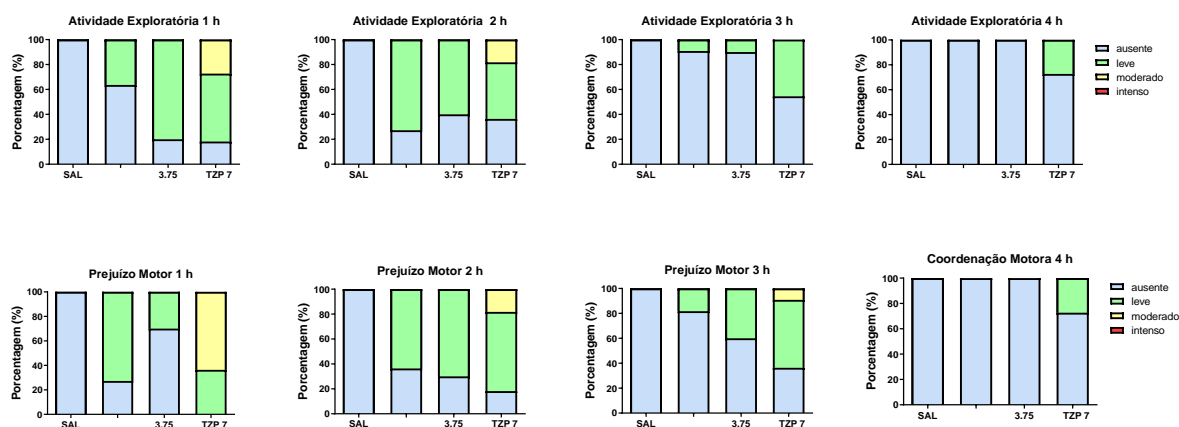
**Figura 4:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos jovens por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam salivação ou lacrimamento ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZP = triazofós.

## Ratos Jovens



**Figura 5:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos jovens por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam exoftalmia ou coordenação motora ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZF = triazofós.

## Ratos Jovens



**Figura 6:** Sinais de toxicidade aguda induzida por triazofós em ratos jovens por até 4 h. Os dados representam a porcentagem de animais que apresentam atividade exploratória ou prejuízo motor ao final de cada hora de observação. SAL = solução salina; TZF = triazofós.