

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALCIENE ALMEIDA SIQUEIRA

**EFEITO DO TRATAMENTO PADRÃO COM ATROPINA E  
PRALIDOXIMA NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS APÓS INTOXICAÇÃO  
AGUDA PELO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS**

VITÓRIA

2016

ALCIENE ALMEIDA SIQUEIRA

**EFEITO DO TRATAMENTO PADRÃO COM ATROPINA E  
PRALIDOXIMA NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS APÓS INTOXICAÇÃO  
AGUDA PELO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Karla Nívea Sampaio

VITÓRIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S619e Siqueira, Alciene Almeida, 1985 -  
Efeito do tratamento padrão com atropina e pralidoxima na  
prevenção das alterações comportamentais e bioquímicas após  
intoxicação aguda pelo organofosforado clorpirifós / Alciene  
Almeida Siqueira – 2016.  
82 f. : il.

Orientador: Vanessa Beijamini Harres.  
Coorientador: Karla Nívea Sampaio.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde.

1. Clorpirifós. 2. Depressão. 3. Atropina. 4. Compostos de  
Pralidoxima. 5. Colinesterases. I. Harres, Vanessa Beijamini.  
II. Sampaio, Karla Nívea. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615

---

**Alciene Almeida Siqueira**

**EFEITO DO TRATAMENTO PADRÃO COM ATROPINA E  
PRALIDOXIMA NA PREVENÇÃO DAS ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS APÓS INTOXICAÇÃO  
AGUDA PELO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS**

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

Aprovada em 31 de março de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres  
Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFES  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires  
Departamento de Ciências Fisiológicas – UFES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ionara Rodrigues Siqueira  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS

Dedico este trabalho aos meus pais, que trabalharam incansavelmente para proporcionar a mim e aos meus irmãos o estudo que eles não puderam ter.

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Beijamini Harres, pela orientação, pela experiência, competência e profissionalismo, pela paciência comigo bem logo no início, quando tudo parecia impossível para mim. Obrigada por confiar na minha capacidade de iniciar e concluir este trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karla Nívea Sampaio, por sua co-orientação, por ter cedido o seu laboratório para a maioria dos experimentos necessários para a conclusão deste trabalho. Obrigada por compartilhar experiências, por estar sempre disponível a ajudar, pelas orientações acadêmicas e pelas orientações para a vida.

Às professoras que compuseram a banca de avaliação deste trabalho, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rita Gomes Wanderley Pires e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ionara Rodrigues Siqueira, pela disponibilidade e contribuição para melhoria deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM), por viabilizar a realização das dosagens bioquímicas deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, por contribuírem expressivamente na minha formação profissional.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Martins e Silva, pela disponibilidade em ensinar as técnicas de dissecação cerebral empregadas neste trabalho.

Às alunas de mestrado Tamara Andrea Alarcón e Gabriela Pandini Silote, e à Dr.<sup>a</sup> Luciana Passamani, por dividirem suas experiências e conhecimentos.

Ao Thallis, na época aluno de Iniciação Científica, que me ensinou pacientemente a trabalhar com ratos. Nunca esquecerei que você foi o responsável por espalhar para o Departamento de Farmácia inteiro que eu chorei desesperadamente ao guilhotinar um rato!

Ao Vitor, aluno de Iniciação Científica, que além de me ajudar em vários finais de semana, achava graça das minhas piadas sem graça e sem dúvida, tornou-se um grande amigo.

Ao Otalíbio, um grande amigo, antes estagiário na drogaria em que eu era responsável técnica e posteriormente colega de mestrado, por me fazer acreditar que eu era capaz de ir muito mais além, por me convencer a me inscrever no processo seletivo, por perder inúmeras tardes estudando comigo para que o título de mestre deixasse de ser sonho e se transformasse em realidade. Sem dúvidas, sem a sua insistência eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

Às amigadas maravilhosas que foram construídas ao longo destes dois anos. Em ordem cronológica: Flávia, Juliana, Graziany e Letícia. Obrigada pelos momentos de futilidade, de alegria e de descontração, pelo apoio e pelas palavras renovadoras nas horas de desânimo e de tristeza, pela ajuda nos experimentos e pelos conselhos sensatos. Vocês são verdadeiras amigas que ficarão para sempre!

Ao Eduardo, por ser responsável pelo preparo dos cafés pós-prandiais ultra, mega, hiper concentrados, pelos dramas, “churumelas” e lamúrias compartilhadas. Obrigada por ser meu psicólogo particular. Acho que foi recíproco!

Às minhas irmãs, Mara e Ceny, meus sobrinhos Vívian e Kevin e ao meu marido, Murilo, por terem sido meus “alunos de Iniciação Científica por livre e espontânea pressão”. Vocês estiveram disponíveis quando eu não tinha a mais ninguém que eu poderia recorrer.

Aos meus pais, Humberto e Aldenir, por terem investido na minha educação, colocando-a como prioridade. Por terem me ensinado que o conhecimento não ocupa espaço e que a educação é o melhor investimento. Tudo o que eu sou, o que conquistei e tudo o que ainda vou conquistar, devo a vocês. Agradeço os valores que vocês me ensinaram. Eternamente!

À minha família, principalmente ao Murilo, que compreendeu a minha ausência, a minha falta de paciência, o meu estresse e a minha chatice durante todo o tempo do mestrado. Muito obrigada. Amo vocês.

E, a Deus, quem me permitiu todas essas vivências, quem me escolheu e me capacitou.

E a todos aqueles que acreditaram no meu potencial. Muito grata.

*“Quanto mais aumenta o nosso conhecimento, mais evidente fica a nossa ignorância”.*

John F. Kennedy

## Sumário

### LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 ORGANOFOSFORADOS .....	17
1.2 INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS .....	18
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS.....	19
1.4 TRATAMENTO PADRÃO DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS .....	24
1.5 ORGANOFOSFORADOS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS .	27
1.6 CLORPIRIFÓS .....	28
1.7 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO CPF.....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
2.1 OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 ANIMAIS .....	35
3.2 DROGAS.....	35
<b>3.2.1 Preparo da solução de clorpirifós</b> .....	35
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS .....	36
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	38
<b>3.4.1 Avaliação da toxicidade aguda</b> .....	38
<b>3.4.2 Teste do Nado Forçado (TNF)</b> .....	39
3.5 DOSAGENS ENZIMÁTICAS .....	40
<b>3.5.1 Atividade da colinesterase plasmática</b> .....	40

<b>3.5.2</b>	<b>Preparo da amostra para determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral</b> .....	42
<b>3.5.3</b>	<b>Atividade da acetilcolinesterase cerebral</b> .....	42
3.5.3.1	Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford.....	44
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	46
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
4.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA .....	48
4.2	TESTE DO NADO FORÇADO .....	51
4.3	ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA.....	53
4.4	ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL.....	55
4.4.1	<b>Atividade da acetilcolinesterase no hipocampo</b> .....	55
4.4.2	<b>Atividade da acetilcolinesterase no estriado</b> .....	57
4.4.3	<b>Atividade da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal</b> .....	59
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	82
8.1	ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	82

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico.....	17
<b>Figura 2</b> - Estrutura química geral dos compostos organofosforados.....	18
<b>Figura 3</b> - Figura esquemática da neurotransmissão colinérgica.....	21
<b>Figura 4</b> - Hidrólise de ACh em colina e acetato por ação da AChE.....	21
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de ação dos organofosforados.....	23
<b>Figura 6</b> - Estrutura química da atropina.....	25
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da pralidoxima.....	25
<b>Figura 8</b> - Hipótese do equilíbrio adrenérgico-colinérgico.....	28
<b>Figura 9</b> - Fórmula estrutural do clorpirifós e do metabólito ativo clorpirifós-oxon....	29
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática do protocolo geral.....	37
<b>Figura 11</b> - Teste do nado forçado.....	40
<b>Figura 12</b> - Representação esquemática da determinação da atividade da colinesterase plasmática.....	41
<b>Figura 13</b> - Representação esquemática da determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral.....	43
<b>Figura 14</b> - Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre o desempenho de ratos expostos ao TNF 24 horas e 30 dias a intoxicação aguda.....	52
<b>Figura 15</b> - Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da ChE plasmática 24 horas e dias após a intoxicação aguda.....	54
<b>Figura 16</b> - Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE no hipocampo 24 horas e 30 dias após a intoxicação aguda.....	56
<b>Figura 17</b> - Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE no estriado 24 horas e 30 dias após a intoxicação aguda.....	58

**Figura 18** - Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE no córtex pré-frontal 24 horas e 30 dias após a intoxicação aguda.....60

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

2-PAM – Pralidoxima

5-HT – Serotonina

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ACTh – Acetiltiocolina

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR – Atropina

BuChE - Butirilcolinesterase

CA – Campo aberto

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Ch – Colina

ChAT – Colina Acetiltransferase

ChT – Transportador de Colina

ChE – Colinesterase

CoA – Coenzima A

CBB G-250 – Coomassie Brilliant Blue G-250

CPF – Clorpirifós

CPF-oxon – Clorpirifós-oxon

CYP450 – Citocromo P450

DA – Dopamina

DPF – Diisopropilfluorofosfato

DTNB - 5,5-dithiobis-(Ácido 2-Nitrobenzóico)

FLX – Fluoxetina

Glu – Glutamato

i.m. – Intramuscular

i.p. – Intraperitoneal

KO – Knockout

LCE – Labirinto em cruz elevado

LTE – Labirinto em T elevado

mAChR – Receptor muscarínico

M<sub>1</sub>-KO – Ratos knockout sem os receptores muscarínicos M<sub>1</sub>

M<sub>2</sub>-KO - Ratos knockout sem os receptores muscarínicos M<sub>2</sub>

nAChR – Receptor nicotínico

NA – Noradrenalina

NDR – Núcleo dorsal da rafe

OF – Organofosforado

OMS – Organização Mundial de Saúde

P2S – Metanosulfonato de 2-piridina

P – Fósforo

SAL – Salina

s.c. – Subcutâneo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF – Teste do nado forçado

TOXCEN - Centro Toxicológico do Espírito Santo

VAcHT – Transportador vesicular de acetilcolina

## RESUMO

Os inseticidas organofosforados (OF), utilizados na agricultura em todo o mundo, exercem sua toxicidade ao inibir a atividade das colinesterases centrais e periféricas, levando ao acúmulo de acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas. Estudos clínicos mostram que a exposição crônica a OF sob baixas doses pode induzir desordens afetivas como a depressão. Nosso grupo de pesquisa verificou que até mesmo a exposição aguda a um desses agentes, o clorpirifós (CPF) 20 mg/kg, induziu um comportamento tipo-depressivo em ratos Wistar adultos no Teste do Nado Forçado (TNF). O tratamento padrão da intoxicação aguda por OF envolve o uso da atropina (ATR), um antagonista muscarínico, para tratar os sintomas da síndrome colinérgica e um reativador das colinesterases, como a pralidoxima (2-PAM), para reestabelecer a atividade enzimática periférica. Assim, nosso objetivo foi avaliar se estas drogas reverteriam as alterações comportamentais no TNF e bioquímicas no plasma, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal de ratos 24 horas ou 30 dias após a exposição aguda ao CPF. Os animais foram submetidos à pré-exposição no TNF e imediatamente após receberam injeção intraperitoneal de CPF ou salina (SAL). Uma hora mais tarde, os animais foram avaliados quanto aos parâmetros de toxicidade aguda e então tratados com SAL, ATR 10 mg/kg, 2-PAM 40mg/kg ou ATR+2-PAM. A toxicidade aguda continuou a ser avaliada de hora em hora por até 4 horas após a injeção de CPF ou SAL. Vinte e quatro horas após a intoxicação, parte dos animais foi decapitada para coleta de sangue para determinação da colinesterase (ChE) plasmática e coleta das estruturas encefálicas para determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) referente a este tempo. A outra parte dos animais foi submetida às sessões teste (24 horas) e reteste (30 dias após a intoxicação) do TNF, sendo medido o tempo de imobilidade (em segundos) por 5 minutos em ambas as sessões. Após o reteste, os animais foram decapitados e as amostras coletadas para determinação da atividade das colinesterases 30 dias após a intoxicação. O CPF induziu o surgimento de sinais de toxicidade aguda e reduziu a atividade da ChE no plasma. O CPF aumentou o tempo de imobilidade na sessão teste, mas não na sessão reteste (30 dias). A ATR reverteu parcialmente o efeito depressivo do CPF. A 2-PAM reativou a AChE no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo e no estriado 24 horas após a intoxicação. Trinta dias depois, o efeito tipo-depressivo e as alterações bioquímicas foram

ausentes. Os resultados indicam que: (1) as alterações comportamentais e bioquímicas do CPF foram transitórias e parcialmente revertidas pelo tratamento com ATR e 2-PAM; (2) o possível acúmulo da ACh através da inibição da AChE hipocampal parece estar relacionado com o aumento do tempo de imobilidade no TNF. Este estudo sugere que mesmo a intoxicação aguda em curto prazo pode trazer prejuízo para a saúde mental de indivíduos expostos a estes agentes. Sugere também que o tratamento padrão da intoxicação empregado na clínica parece ser insuficiente para reverter todas as alterações causadas pela exposição aos OF.

Palavras-chave: Clorpirifós. Depressão. Atropina. Pralidoxima. Teste do Nado Forçado, Colinesterases.

## **ABSTRACT**

Organophosphorus insecticides (OP), used in agriculture in many countries worldwide, exert their toxicity by inhibiting the activity of both central and peripheral cholinesterases, leading to the accumulation of acetylcholine at cholinergic synapses. Clinical studies have shown that chronic exposure to OP at low doses can induce affective disorders such as depression. Our research group verified that acute poisoning by one of those agents, chlorpyrifos (CPF) 20mg/kg, induced a depressive-like behaviour in adults male Wistar rats on the Forced Swimming Test (FST). Standard treatment for OP poisoning involves the use of atropine (ATR), a muscarinic antagonist, to treat the symptoms of cholinergic syndrome and a reactivator of cholinesterases, such as pralidoxime (2-PAM), to restore the peripheral enzymatic activity. Thus, our aim was to assess if standard treatment would attenuate or reverse behavioral and biochemical changes in the FST, plasma, hippocampus, striatum and prefrontal cortex of rats 24 hours and 30 days after acute exposure to CPF. Animals were submitted to pre-exposure in the FST and immediately after they received intraperitoneal injections of CPF or saline (SAL). One hour later, animals were evaluated with regards to acute toxicity and then they were treated with SAL, ATR 10 mg/kg, 2-PAM 40mg/kg or ATR+2-PAM. Acute toxicity evaluation was carried out hour to hour for up to 4 hours after CPF or SAL injections. Twenty-four hours post-poisoning, half of the animals were decapitated in order to collect blood for determination of plasma cholinesterase (ChE) activity and the brain were dissected for determination of acetylcholinesterase (AChE) activity related to this time. The other half of animals was submitted to the sessions test (24 hours) and re-test (30 days after poisoning) in the FST, in which was measured the immobility time (in seconds) for 5 minutes. After the re-test session, the animals were decapitated and samples were collect for determination of cholinesterase activity 30 days after acute poisoning. CPF induced signs of acute toxicity and decreased plasma ChE activity .CPF increased immobility time in the test session (a depressive-like effect), but not in the re-test (30 days). ATR attenuated the depressive-like effect of CPF. 2-PAM reactivated AChE in the prefrontal cortex but not in the hippocampus and striatum 24 hours after poisoning. Thirty days later, behavioral and biochemical changes were absent. These results show that: (1) Behavioral and biochemical changes induced by CPF were transient and partially reversed by treatment with ATR

and 2-PAM; (2) The possible accumulation of ACh by hippocampal AChE inhibition seems to be related to increased immobility time on the FST. This study suggests that even acute poisoning within a short period of time may impair mental health of subjects exposed to OP. It also suggests that the standard treatment for OP poisoning seems to be insufficient to reverse all of the changes caused by the OP exposure.

Key words: Chlorpyrifos. Depression. Atropine. Pralidoxime. Forced Swimming Test. Cholinesterases.

# ***INTRODUÇÃO***

---

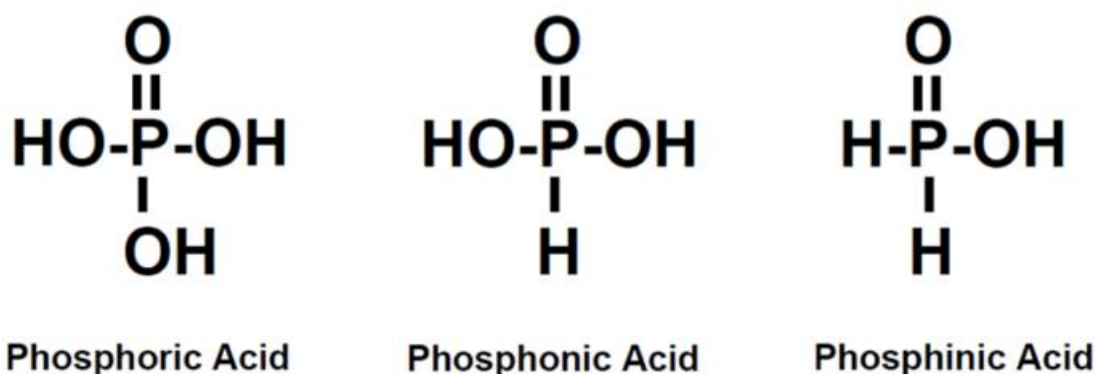
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ORGANOFOSFORADOS

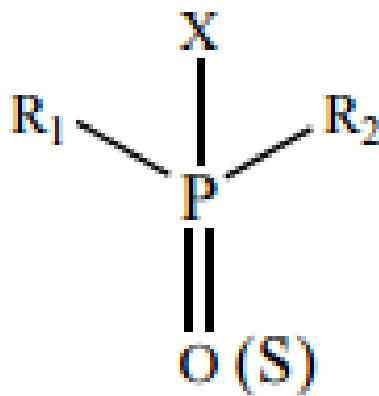
Os organofosforados (OF) constituem uma ampla classe química de substâncias, sendo que alguns são conhecidos como agentes de guerra (BAJGAR *et al.*, 2007), enquanto outros são utilizados como agrotóxicos organofosforados na horticultura, na medicina veterinária e principalmente na agricultura (SÁNCHEZ-AMATE *et al.*, 2001; MARRS, 1993).

Os OF surgiram pela primeira vez em meados da década de 40 e desde então, um vasto número deles tem sido sintetizado (GERSHON; SHAW, 1961). Schrader, a partir de 1952, sintetizou aproximadamente 2000 OF, que desde então vêm sendo utilizados como inseticidas (SCHRADER, 1952 apud JOUBERT; JOUBERT, 1988). Entretanto, foi a partir da década de 80 que os OF passaram a ser a principal classe de substâncias empregada no controle de pragas em lavouras em todo o mundo (STEPHENS *et al.*, 1995).

Genericamente, o termo OF é empregado para designar agentes químicos derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico (TERRY, 2012). As estruturas químicas destes ácidos estão representadas na figura 1. A estrutura básica dos OF está representada na figura 2.



**Figura 1.** Estrutura química dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosfínico. Fonte: TERRY, 2012.



**Figura 2.** Estrutura química geral dos compostos organofosforados. Fonte: COLOVIĆ, 2013.

## 1.2 INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

Mundialmente, a intoxicação aguda por OF é um problema frequente, seja pela exposição ocupacional na agricultura, seja nas situações de tentativas de suicídio e nas exposições acidentais a estes agentes, como nos acidentes domésticos (COLOVIĆ *et al.*, 2013). A probabilidade de morte é bem acentuada, principalmente por paralisia dos músculos intercostais e do diafragma, depressão do centro respiratório cerebral e secreção brônquica exacerbada (JOKANOVIĆ, 2001).

O suicídio é tido empiricamente como a razão central de intoxicação por OF (LONDON *et al.*, 2005). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem recebido um número consideravelmente alto de notificações de tentativas de suicídio pela ingestão de OF em vários países da Ásia e das Américas Central e do Sul, incluindo o Brasil (BERTOLOTE *et al.*, 2006).

Conforme os dados disponibilizados pelo Centro Toxicológico do Espírito Santo (Centro Toxicológico do Espírito Santo - TOXCEN) foram registrados, em 2012, 857 casos de intoxicações por inseticidas de uso agrícola no Espírito Santo, o que representa a segunda maior causa de mortes (2,33%) por agentes causadores de intoxicação no estado (Tabela 1). Estes compostos também foram o segundo maior grupo de agentes utilizados em tentativas de suicídio, totalizando 404 casos (TOXCEN, 2012).

**Tabela 1.** Casos, óbitos e letalidade de intoxicação humana por agente. Fonte: TOXCEN, 2012.

<b>Agente</b>	<b>Total nº</b>	<b>Óbito nº</b>	<b>Letalidade %</b>
Medicamentos	4967	11	0,22
Agrotóxicos/uso agrícola	857	20	2,33
Produtos Veterinários	81	2	2,46
Raticidas	115	1	0,87
Domissanitários	958	1	0,10
Produtos Químicos Industriais	562	1	0,18
Drogas de abuso	1873	3	0,16
Animais peçonhentos/Escorpiões	2424	3	0,12
Outros animais peçonhentos	1248	1	0,08
<b>Total</b>	<b>12501</b>	<b>43</b>	<b>0,34</b>

Devido ao alto índice de tentativas de suicídio ao redor do mundo utilizando-se destes compostos, é importante a formulação de estratégias que restrinjam a população de ter fácil acesso a estes produtos, bem como promover a capacitação dos sistemas de saúde para, de forma eficaz, tratar indivíduos expostos a estes agentes (GUNNELL *et al.*, 2007).

### 1.3 MECANISMO DE AÇÃO DOS ORGANOFOSFORADOS

Os OF são muito lipofílicos, principalmente os fosforotioatos (VALE, 1998). Desse modo, são rapidamente absorvidos pela pele, pelo sistema respiratório e pelo trato gastrointestinal (VALE, 1998). Ao serem biotransformados a compostos mais polares, oferecem elevado potencial de formação de metabólitos de toxicidade significativamente aumentada (JOKANOVIĆ, 2001).

O mecanismo de ação primário dos OF é a inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), enzima envolvida na hidrólise da acetilcolina (ACh), neurotransmissor do sistema colinérgico (MILESON *et al.*, 1998).

A AChE, pertencente à família das colinesterases, ao catalisar a hidrólise da ACh em colina (Ch) e ácido acético, permite a restauração da atividade neuronal colinérgica (POHANKA, 2011).

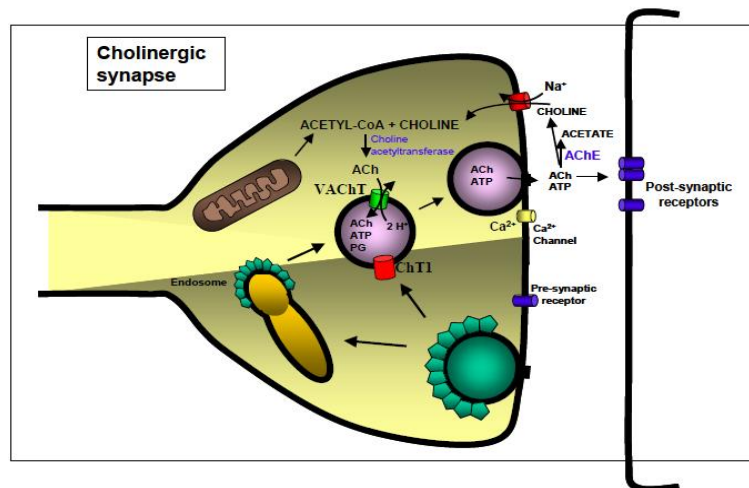
Nas situações de intoxicação pelos OF, a inibição enzimática leva ao acúmulo de ACh, que primeiramente estimula e posteriormente, paralisa a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas (NAMBA *et al.*, 1971).

O sistema colinérgico é constituído de diversas áreas com alta densidade de projeções de neurônios secretores de ACh e regiões expressando os diferentes receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) para a ACh (DEIANA *et al.*, 2011).

A ACh foi o primeiro componente identificado e proposto 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).

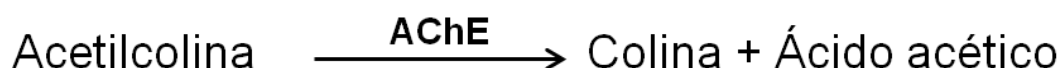
Uma molécula de ACh é formada a partir de metabolismo oxidativo, a partir de colina (Ch), capturada pelo neurônio colinérgico através do sistema de captação colina sódio-dependente, e de um grupamento acetil, proveniente da acetil coenzima-A (VAN DER ZEE; LUITEN, 1999).

Como mostra o esquema da figura 3, a síntese de ACh é viabilizada a partir da ligação de uma molécula de acetil coenzima-A e uma de Ch, por ação da enzima colina acetiltransferase (ChAT), presente no citoplasma de terminais pré-sinápticos colinérgicos. Após sua síntese, a ACh é armazenada em vesículas sinápticas pela ação do transportador de ACh (VAChT), impulsionado pelo gradiente transvesicular de prótons ligado a uma enzima com atividade de ATPase (PARSONS, 2000; DEIANA *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Figura esquemática da neurotransmissão colinérgica. Fonte: MARTINS-SILVA, 2008

A AChE, presente nos eritrócitos e nas terminações nervosas (POHANKA, 2011), tem como principal função biológica finalizar a neurotransmissão nas sinapses colinérgicas centrais e periféricas (COLOVIĆ *et al.*, 2013), como mostra a figura 4, de forma que a ACh ative os receptores colinérgicos transitoriamente (MILESON *et al.*, 1998).



**Figura 4.** Hidrólise de ACh em colina e ácido acético por ação da AChE.

As sinapses colinérgicas estão presentes nas terminações nervosas da musculatura esquelética, nos gânglios autonômicos, nas fibras pós-ganglionares parassimpáticas, em algumas terminações nervosas simpáticas (glândulas sudoríparas, por exemplo) e no SNC (NAMBA *et al.*, 1971; VALE, 1998). Os neurônios colinérgicos estão amplamente distribuídos ao longo do cérebro, liberando ACh no prosencéfalo, mesencéfalo e tronco encefálico (DREVER *et al.*, 2011).

A AChE é assim denominada devido à elevada afinidade pelo seu substrato natural, a ACh, ao contrário da butirilcolinesterase (BuChE), que também é conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase plasmática (ChE plasmática), possui afinidade por diversos substratos (POHANKA, 2011). Apesar de a hidrólise da ACh se dar

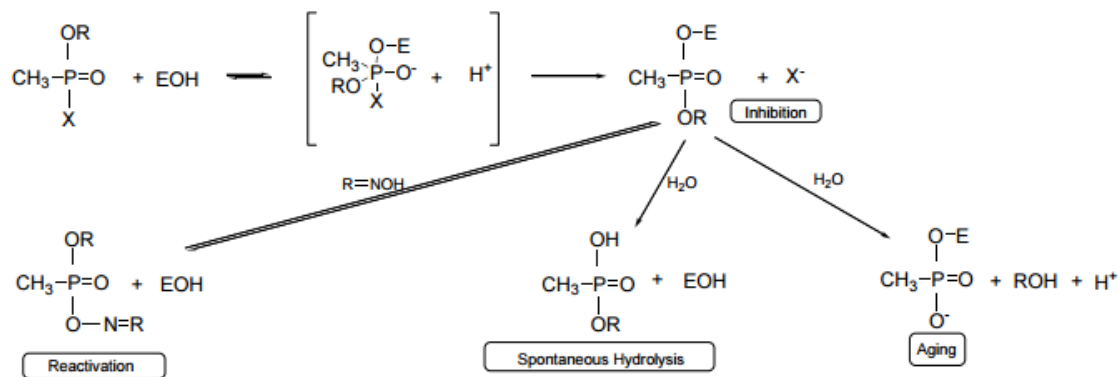
predominantemente pela ação catalítica da AChE, a hidrólise deste neurotransmissor também pode ocorrer pela ação da ChE plasmática (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989).

A BuChE é encontrada principalmente no fígado e circulante no plasma, não apresentando função fisiológica conhecida (JOKANOVIĆ, 2009; GIACOBINI, 2003 apud POHANKA, 2011). Aproximadamente 12% da atividade da colinesterase cerebral total é devida a esta enzima (LASSITER *et al.*, 2003).

Apesar de o seu papel fisiológico ser pouco conhecido, ensaios para a determinação da atividade da BuChE são bons marcadores da função hepática (POHANKA, 2011), bem como da exposição à maioria dos OF ou outros inibidores das colinesterases. Entretanto, a sua atividade não se relaciona com a gravidade da intoxicação (EDDLESTON *et al.*, 2008).

Os OF ligam-se covalentemente ao sítio ativo das colinesterases (COLOVIĆ *et al.*, 2013), com a deposição do grupamento fosforil na porção hidroxilada da serina, inativando-a (JOKANOVIĆ, 2009). A fosforilação da enzima pode persistir por horas, dias ou até mesmo semanas, dependendo do OF (POPE *et al.*, 1992). Após a intoxicação pelos OF, a enzima inibida pode passar por um processo denominado hidrólise espontânea, porém a taxa desta reativação depende da estrutura química do OF (VALE, 1998). Caso a hidrólise espontânea não ocorra, a enzima pode sofrer o envelhecimento (HOBBIGER, 1955). Aproximadamente 24 horas após a inibição das colinesterases, o grupamento fosforil dá origem a um composto de estabilidade mais elevada, impossibilitando a reativação enzimática (HOBBIGER, 1955).

A figura 5 mostra os mecanismos pelos quais a AChE sofre inibição pelos OF, bem como os processos de envelhecimento, reativação e hidrólise espontânea da enzima.



**Figura 5.** Mecanismo de ação dos organofosforados: fosforilação da AChE, reativação espontânea e envelhecimento da enzima fosforilada. **Fonte:** Adaptado de COLOVIĆ *et al.*, 2013.

É bem estabelecido na literatura que a inibição das colinesterases e o consequente acúmulo de ACh na fenda sináptica provoca a hiperestimulação dos receptores colinérgicos nos neurônios pós-sinápticos, nos gânglios autônomos, na junção neuromuscular, levando ao aparecimento de sinais relacionados à toxicidade aguda (MILESON *et al.*, 1998).

Dentre as manifestações clínicas da intoxicação aguda por OF são notáveis aquelas relacionadas à hiperestimulação dos receptores muscarínicos periféricos (diarreia, micção, miose, bradicardia, broncorreia, broncoconstricção, lacrimejamento, sudorese, salivação, êmese), à hiperestimulação dos receptores nicotínicos ganglionares e nas junções neuromusculares (midríase, taquicardia, fraqueza, hipertensão, hiperglicemia, fasciculações), e confusão, convulsão e coma, que ocorrem no SNC (MILESON *et al.*, 1998; BARELLI *et al.*, 2011; COLOVIĆ *et al.*, 2013). A ativação excessiva dos nAChRs causa períodos prolongados de despolarização neuromuscular, caracterizando contrações musculares incontroláveis, fraqueza muscular generalizada ou até mesmo disfunção da musculatura respiratória com consequente paralisia dos músculos do diafragma, resultando na morte do indivíduo devido à falência respiratória (JOKANOVIĆ; KOSANOVIĆ, 2010).

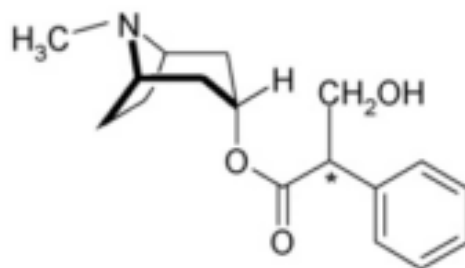
A indução de transtornos neuropsiquiátricos devido a exposição crônica aos OF sob baixas doses pode ser considerada como consequência do acúmulo de ACh nas sinapses nicotínicas e muscarínicas (BARELLI *et al.*, 2011). Além dos distúrbios desencadeados pela ativação excessiva da neurotransmissão colinérgica como consequência da inibição das colinesterases, vale destacar o aparecimento de

distúrbios tardios devido à inibição de esterases neuronais específicas, denominadas *neuropathy target esterases* (esterases alvo), o que caracteriza a neuropatia tardia (JOHNSON, 1969; KARALLIEDDE; SENANAYAKE, 1989). A neuropatia tardia pode surgir após a exposição crônica aos OF e também alguns dias ou semanas após a exposição aguda a estes agentes (CLARK, 2006). Após a fosforilação da esterase alvo, seguido de envelhecimento do complexo formado entre o OF e a enzima, há o favorecimento de degeneração neuronal, levando ao surgimento dos sintomas característicos deste distúrbio (YANG *et al.*, 2000; CLARK, 2006). Adicionalmente, suspeita-se que os OF podem afetar o desenvolvimento normal do SNC, majoritariamente pela inibição da AChE durante as fases iniciais da formação cerebral (BRAQUENIER *et al.*, 2010).

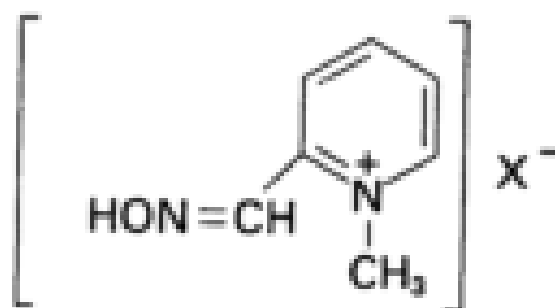
#### 1.4 TRATAMENTO PADRÃO DA INTOXICAÇÃO POR ORGANOFOSFORADOS

A partir da década de 50 (JOKANOVIĆ, 2009), o tratamento padrão utilizado nas intoxicações causadas por OF consistiu no emprego de antídotos capazes de: (1) contrapor a ativação excessiva periférica e central dos mAChRs devido ao acúmulo de ACh a nível pós-sináptico através da inibição da AChE; (2) reativar a atividade da AChE fosforilada pelos OF e; (3) prevenir ou reverter convulsões induzidas pela intoxicação, que podem desempenhar um papel fundamental na sobrevivência dos indivíduos expostos a vários OF (VOICU *et al.*, 2010).

Desse modo, um antagonista de receptores muscarínicos (mAChRs), geralmente a atropina (ATR) (figura 6), sob a forma de sulfato, associada a uma oxima, como por exemplo, a pralidoxima (2-PAM) (figura 7), são rotineiramente utilizados no tratamento da intoxicação por OF. Ainda, em determinados casos, o diazepam, ou outro benzodiazepínico, tal qual o midazolam, são empregados para diminuir a agitação, a fasciculação muscular e ainda para prevenir ou cessar convulsões, assim como a fenitoína (MARRS, 1993).



**Figura 6.** Estrutura química da atropina. Fonte: Adaptado de BITAR; HOLZGRABE, 2007



**Figura 7.** Estrutura química da pralidoxima. Fonte: Adaptado de WOREK *et al.*, 1996

A ATR atua sobre os mAChRs, aliviando apenas os efeitos tóxicos característicos da síndrome colinérgica (JOKANOVIĆ, 2009). O emprego de altas doses de ATR no envenenamento por OF está bem estabelecido (BUCKLEY *et al.*, 2014). Rotineiramente, o paciente intoxicado é atropinizado, ato este que consiste na administração da dose recomendada de 2 mg (i.v.) a cada 5 ou 10 minutos até o desaparecimento dos sintomas relacionados à síndrome colinérgica. Dependendo da gravidade da intoxicação e da lipossolubilidade do OF, sugere-se a administração intravenosa de doses elevadas de ATR até que haja a reversão da sintomatologia tóxica (VALE; MEREDITH; HEATH, 1990).

As oximas, consideradas potentes agentes nucleofílicos, são capazes de reestabelecer a atividade catalítica das colinesterases ao promoverem a remoção do grupamento fosforil depositado pelo OF no sítio ativo destas enzimas (HOBBIGER, 1955; BUCKLEY *et al.*, 2014). Essa capacidade reativadora das oximas é devido à presença de um amônio quaternário em sua estrutura química (BERENDS *et al.*, 1959). Por isso, as oximas apresentam baixa lipossolubilidade e dificilmente atravessam a barreira hematoencefálica. Deste modo, agem principalmente

reativando a atividade colinesterásica periférica, reestabelecendo a neurotransmissão na junção neuromuscular (BUCKLEY *et al.*, 2014; EDDLESTON *et al.*, 2002). Entretanto, há evidências de que o transporte de 2-PAM para estruturas encefálicas como o estriado parece ser mediado por transporte ativo dependente de  $\text{Na}^+$  (SAKURADA *et al.*, 2003). Já as oximas desenvolvidas para serem mais facilmente capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, na maioria dos casos, produzem efeitos neurotóxicos (VOICU *et al.*, 2010).

A velocidade e o grau de reestabelecimento da atividade enzimática dependem tanto da concentração e do tipo do OF quanto da do agente nucleofílico, bem como do tempo de contato entre a enzima e o OF (HOBBIGER, 1955; DE BLEECKER *et al.*, 1992; WOREK *et al.*, 1996, JOHNSON *et al.*, 2000). Nesse mesmo sentido, a capacidade reativadora dos agentes nucleofílicos vai diminuindo à medida que o tempo de interação com o OF vai aumentando, principalmente se o OF for constituído estruturalmente por um grupo dietilfosfato (HOBBIGER, 1955).

Além disso, a enzima, após ser inibida pelo OF, pode passar por um processo de desalquilação chamado envelhecimento, que leva à formação de um complexo de estabilidade mais elevada do que a fosforilação do sítio ativo das colinesterases, impossibilitando sua reativação (HOBBIGER, 1955; COLOVIĆ *et al.*, 2013). Por esta razão, é muito importante que o tratamento da intoxicação com agentes reativadores das colinesterases seja feito imediatamente ou o mais rápido possível após a exposição ao OF (WOREK *et al.*, 2007) e em doses superiores a 30 mg/kg *in bolus*, seguido de infusão venosa superior a 8 mg/kg/h (EDDLESTON *et al.*, 2002).

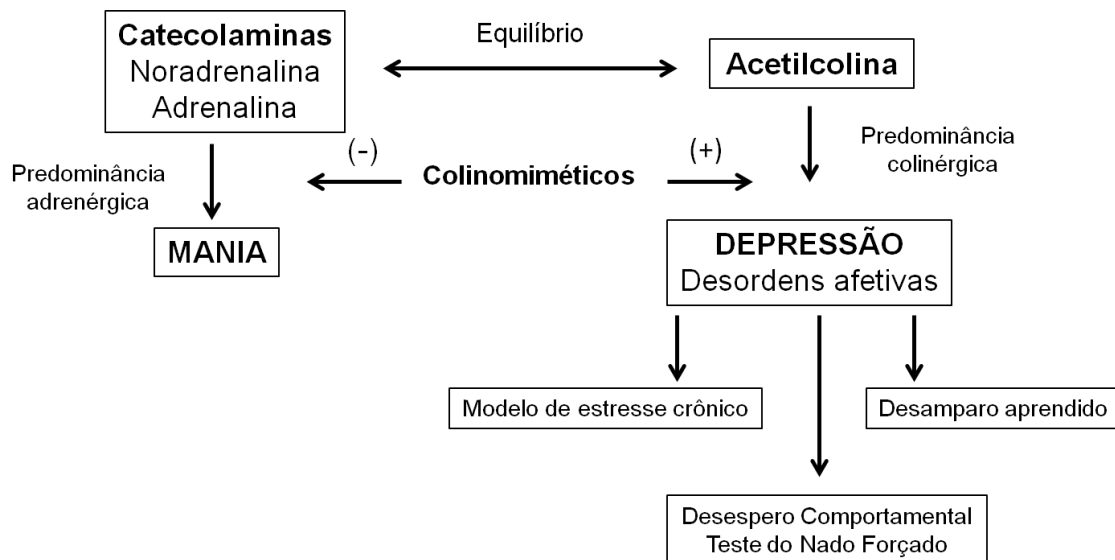
Apenas um estudo em animais indica que o tratamento com ATR, quando associado às oximas, apresenta um efeito sinérgico na proteção da intoxicação por OF (ASKEW, 1957). Desde então, tanto a ATR quanto as oximas foram introduzidas na prática clínica sob a ausência de ensaios clínicos controlados e de qualidade. Como consequência, pouco se sabe sobre a conduta farmacológica ideal a ser empregada nos casos de intoxicação induzida por OF (JOKANOVIĆ, 2009; WRIGHT *et al.*, 2010). De fato, estudos clínicos controlados sobre o protocolo de atropinização ainda não foram publicados (JOKANOVIĆ, 2009). O uso de oximas também é controverso, uma vez que as evidências encontradas até o momento são insuficientes para indicar prejuízo ou benefício nos casos de envenenamento por OF

(BUCKLEY *et al.*, 2014). Por outro lado, altas doses de metilsulfato de pralidoxima parecem ser seguras, não desencadeando reações adversas significativas em seres humanos (BALALI-MOOD; SHARIAT, 1998).

## 1.5 ORGANOFOSFORADOS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Alguns estudos clínicos observaram que a exposição a inseticidas OF ou a outros inibidores da AChE é capaz de desencadear diversas alterações comportamentais, tais como depressão e tentativas de suicídio (DAVIES, 2000; JAGA; DHARMANI, 2007). Há uma estreita relação entre a exposição aos OF e a alta incidência de tentativas de suicídio em todo o mundo, principalmente devido à indução de distúrbios afetivos (JAGA; DHARMANI, 2007; LONDON *et al.*, 2005). Além disso, ansiedade, distúrbios na memória e vigilância, irritabilidade, nervosismo e agressividade também predominam em populações susceptíveis a intoxicações decorrentes da exposição constante aos OF, sobretudo trabalhadores rurais e agricultores (JOUBERT; JOUBERT, 1988; LONDON *et al.*, 2005; ROHLMAN *et al.*, 2007; STEENLAND *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2016).

As alterações comportamentais observadas nos indivíduos expostos se relacionam, na maioria dos casos, à exposição crônica. Gershon e Shaw (1961) avaliaram cronicamente os efeitos da exposição a diferentes OF em 16 indivíduos. Este estudo mostrou que, ao longo dos anos, sete apresentaram depressão severa. Observou-se também que as manifestações tóxicas eram tipo-muscarínicas e tipo-nicotínicas, porém os distúrbios psiquiátricos ainda não tinham sido absolutamente elucidados. Alguns anos mais tarde, como pode ser visto na figura 8, Janowsky *et al.* (1972) propuseram que a existência de um desequilíbrio adrenérgico-colinérgico poderia estar relacionada com o surgimento de desordens afetivas em seres humanos, sobretudo a depressão. Este desequilíbrio seria responsável pela manifestação de mania, naquelas situações em que havia predominância da neurotransmissão adrenérgica, e depressão, através do aumento excessivo da neurotransmissão colinérgica.



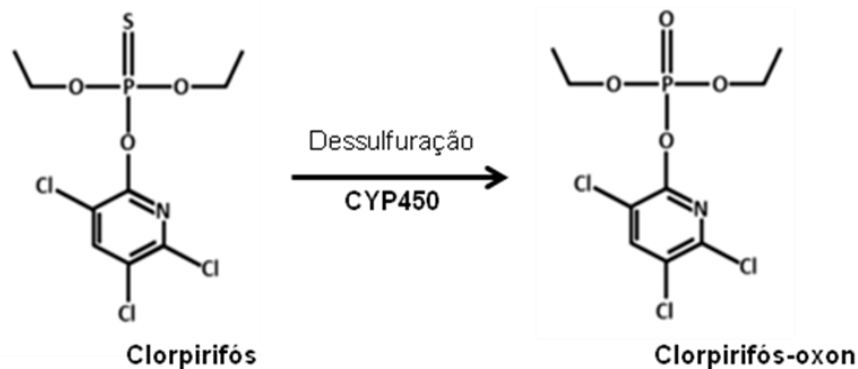
**Figura 8.** Hipótese do equilíbrio adrenérgico-colinérgico proposta por Janowsky *et al.* (1972): O desequilíbrio entre as neurotransmissões leva ao aparecimento de distúrbios psiquiátricos. Fonte: Adaptado de STALLONES; BESELER (2016).

Realmente, indivíduos expostos ao metilfenidato, um psicoestimulante, e à fisostigmina, um fármaco anticolinesterásico de ação central, apresentaram sintomas relacionados à mania e depressão, respectivamente (JANOWSKY, EL-YOUSEF, DAVIS, 1973).

## 1.6 CLORPIRIFÓS

Dentre os vários representantes da classe dos OF amplamente empregados, há o 0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato (clorpirifós – CPF), um fosforotioato. Desde a sua síntese, em 1965, o CPF vem sendo amplamente utilizado (SÁNCHEZ-AMATE *et al.*, 2001; EATON *et al.*, 2008).

O CPF apresenta em sua estrutura um fósforo pentavalente ligado a três átomos de oxigênio e a um átomo de enxofre em ligação dupla. No fígado, o CPF é ativado por dessulfuração oxidativa mediada por isoformas do citocromo P450 (CYP450), formando o CPF-oxon (figura 9), principal metabólito ativo do CPF (CHAMBERS; CHAMBERS, 1989; MILESON *et al.*, 1998). O CPF-oxon inibe as colinesterases e, conseqüentemente, impede a degradação da ACh (TAIT *et al.*, 2009).



**Figura 9.** Fórmula estrutural do clorpirifós e do seu metabólito ativo clorpirifós-oxon. Formação a partir de reação de dessulfuração pelas isoformas da CYP450. **Fonte:** Adaptado de IYER; IKEN; LEON, 2015.

Por seu relativo baixo custo e elevada eficácia contra uma grande variedade de insetos, o CPF é extensivamente usado (CHEN *et al.*, 2014), não ficando restrito apenas ao uso agrícola, onde ele é, sobretudo, empregado como inseticida nas lavouras de algodão, cana-de-açúcar, abacaxi e bananas em áreas rurais, por exemplo, mas também na manutenção de grama em campos de golfe na Austrália e no âmbito doméstico (PABLO *et al.*, 2008). O uso doméstico de CPF foi erradicado nos Estados Unidos da América em 2001 e está em fase de suspensão na União Europeia, apesar de ainda ser utilizado em outros países (EATON *et al.*, 2008). No Brasil, em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) suspendeu a industrialização, produção, distribuição, comercialização e entrega de inseticidas de uso doméstico e em ambientes coletivos contendo o CPF como princípio ativo (ANVISA, 2004).

## 1.7 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS PELO CPF

Estudos com ratos e camundongos evidenciam principalmente o aparecimento de distúrbios comportamentais após exposição crônica ao CPF. Ingestões repetidas (BRAQUENIER *et al.* 2010) e injeções subcutâneas diárias de diferentes doses de CPF (SÁNCHEZ-AMATE *et al.*, 2001) mostraram que este OF é capaz de induzir um efeito tipo ansiogênico em um modelo animal de ansiedade, o Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Contrariamente, outro estudo mostra que o CPF também pode

aumentar a atividade exploratória de ratos expostos ao LCE, sugerindo um efeito tipo ansiolítico (LÓPEZ-CRESPO *et al.*, 2009).

Alterações comportamentais relacionadas a depressão também podem ser evidenciadas principalmente após exposição repetida ao CPF. Ratos adolescentes tratados diariamente com doses variadas de CPF (s.c.) apresentaram aumento do tempo de imobilidade no TNF sob a dose de 10 mg/kg, enquanto que sob a dose de 160 mg/kg o CPF promoveu redução significativa deste tempo (CHEN, *et al.*, 2011). CHEN *et al.* (2014) também investigaram os efeitos da administração subcutânea diária de CPF em ratos durante dez dias (entre o 27º e o 36º dia após o nascimento, nas doses de 2,5, 5, 10 e 20 mg/kg). Os animais foram então submetidos a uma série de avaliações comportamentais, dentre estas, mais uma vez o TNF. Foi notado que a dose de 10 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente o tempo de imobilidade desempenhado pelo animal no teste e nenhum tipo de comprometimento na atividade locomotora no CA.

Considerando que pouco se sabe sobre os efeitos comportamentais decorrentes da intoxicação aguda ao CPF, nosso grupo de pesquisa investigou os efeitos do CPF, administrado por via intraperitoneal em dose única, em ratos adultos, 24 horas após a intoxicação. Foi observado que a intoxicação com CPF 20 mg/kg levou ao aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TNF). Esse resultado sugere efeito tipo-depressivo induzido pela exposição aguda ao CPF e apoia a hipótese de que mesmo a exposição aguda a esse pesticida pode levar ao desenvolvimento de alterações psiquiátricas (CUNHA, 2014). Uma questão que ainda tem que ser investigada é se esse efeito tipo-depressivo do CPF é persistente.

Além das alterações comportamentais, alterações bioquímicas também são evidenciadas. Sánchez-Amate *et al.* (2001) revelaram redução da atividade da AChE 48 horas após a administração de CPF. Outro estudo observou inibição de 72% da atividade de AChE cerebral no 2º dia após exposição aguda ao CPF (s.c.) e recuperação da atividade em até 55% depois de 30 dias (LÓPEZ-CRESPO *et al.*, 2007). Ratos tratados subcutaneamente com 279 mg/kg de CPF apresentaram redução significativa da atividade de AChE cerebral mesmo após uma semana depois de receberem uma única injeção do OF (POPE *et al.*, 1991). Pope *et al.* (1992) avaliou, mais uma vez, o efeito da administração aguda de CPF (279 mg/kg,

subcutâneo) e mensurou a atividade da AChE na região cortical e estriatal do cérebro duas, quatro e seis semanas após a intoxicação. Este estudo demonstrou que a atividade da enzima ainda se apresentava inibida em até 60% seis semanas após a exposição ao CPF. Já um estudo com aves demonstrou que a dose de CPF (20 mg/kg) provocou uma redução de 20% na atividade da AChE cerebral ao ser injetada nos embriões no segundo e sexto dias após a postura dos ovos (SLOTKIN *et al.*, 2008).

Diante disso, é notável que mudanças no padrão da neurotransmissão colinérgica provocadas pela intoxicação aguda por OF em áreas cerebrais diretamente relacionadas com os comportamentos emocionais podem levar a distúrbios neuropsicológicos tardios. Investigamos, então, se a exposição aguda ao CPF induziria alterações comportamentais persistentes. Ainda, investigamos se a intoxicação aguda com baixa dose de CPF alteraria a atividade da AChE em áreas cerebrais envolvidas com as emoções.

É importante ressaltar, ainda, que a condução de estudos clínicos controlados em pacientes intoxicados por OF é limitada, por se tratar de situação de emergência e risco de vida ao paciente. Como não existem estudos pré-clínicos ou clínicos que avaliem os efeitos da ATR e/ou 2-PAM sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela intoxicação aguda ao CPF, testamos a hipótese de que esse tratamento reverteria essas alterações comportamentais e bioquímicas. E por fim, analisamos se a 2-PAM seria capaz de reverter a inibição da atividade da ChE plasmática induzida por CPF, mas não da AChE cerebral, já que distribuição dessa oxima para o SNC é limitada.

Portanto, este estudo servirá como ferramenta para ampliar o conhecimento sobre a eficácia do tratamento padrão das intoxicações agudas por OF no que se refere às alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas com a depressão.

## ***OBJETIVOS***

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o efeito depressivo e as alterações bioquímicas desencadeadas pela exposição aguda ao clorpirifós são persistentes, bem como se o tratamento com atropina e pralidoxima é capaz de reverter essas alterações.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a administração aguda de uma dose baixa de clorpirifós desencadearia sinais de toxicidade aguda.
- Investigar se os sinais de toxicidade aguda induzidos por clorpirifós seriam revertidos com atropina e/ou pralidoxima.
- Avaliar se a administração aguda de clorpirifós inibiria a atividade da colinesterase plasmática 24 horas ou 30 dias após a intoxicação.
- Examinar se a administração aguda de clorpirifós inibiria a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal 24 horas ou 30 dias após a intoxicação.
- Avaliar se a atropina, mas não a pralidoxima, reverteria o efeito tipo-depressivo induzido por clorpirifós em ratos expostos ao Teste do nado forçado 24 horas ou 30 dias após a intoxicação.
- Investigar se a associação de atropina e pralidoxima reverteria o efeito tipo-depressivo induzido por clorpirifós em ratos expostos ao Teste do nado forçado 24 horas e 30 dias após a intoxicação.
- Avaliar se o tratamento com pralidoxima reverteria a inibição da atividade da colinesterase plasmática, mas não da acetilcolinesterase no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal 24 horas ou 30 dias após a intoxicação.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, de 3 meses de idade, com peso variando entre 300 e 380 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram alocados em caixas de polietileno (5 por grupo) em ambiente com temperatura controlada (21-24°C), sob ciclo claro-escuro de 12 x 12 horas (ciclo claro às 7:00 da manhã) e livre acesso a água e comida. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob o número 047/2014.

#### 3.2 DROGAS

- Clorpirifós (CPF) [0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato], proveniente de uma solução comercial de Lorsban 480 BR<sup>®</sup>, 48% m/v, (Dow Agrosciences Industrial Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) diluído em solução salina 0,9%. A dose administrada foi de 20 mg/kg, com base em dados de CUNHA (2014);
- Sulfato de Atropina (ATR) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) 10 mg/kg (dose baseada no estudo de WRIGHT *et al.*, 2010);
- Piridina-2-aldoxima metocloreto (2-PAM) (pralidoxima, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) 40 mg/kg (dose baseada no estudo de KOSE *et al.*, 2009);

##### 3.2.1 Preparo da solução de clorpirifós

O CPF é um composto químico altamente tóxico e bastante volátil. No intuito de evitar variações na concentração por possível evaporação de solventes, a solução de tratamento foi preparada e utilizada no mesmo dia. O preparo foi realizado em capela de exaustão, de modo a evitar intoxicação acidental por inalação de vapores. Tendo em vista que a intoxicação observada em humanos pelo mau uso, exposição

laboral, acidental ou intencional é oriunda de inseticidas disponíveis no mercado para comercialização, justifica-se, deste modo, o uso da solução de CPF em grau comercial.

### 3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS

Foi avaliado o efeito do pós-tratamento com ATR (10 mg/kg) e/ou com 2-PAM (40 mg/kg) sobre o comportamento de ratos intoxicados com CPF (20 mg/kg) e expostos ao TNF 24 horas e 30 dias após a injeção deste OF.

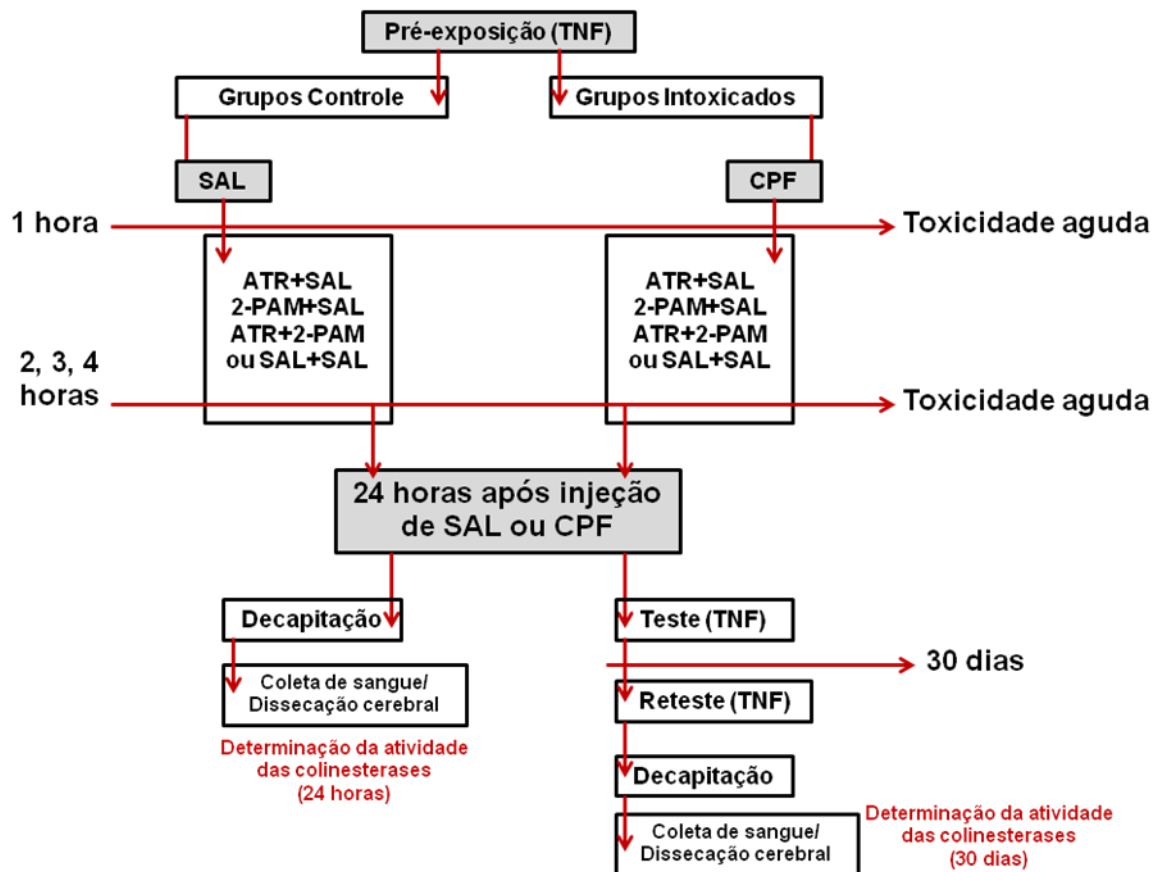
Para o grupo controle foi administrado apenas solução salina. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal. Todas as drogas, assim como a solução salina foram administradas intraperitonealmente em injeções de 1 mL/kg de peso corporal de rato.

Os ratos receberam três injeções intraperitoneais, a fim de que as mesmas condições experimentais estressantes fossem aplicadas a todos os animais testados. Os grupos experimentais foram oito, sendo quatro grupos controle – SAL (SAL+SAL+SAL); ATR (SAL+ATR+SAL); 2-PAM (SAL+2-PAM+SAL); ATR+2-PAM (SAL+ATR+2-PAM); e quatro grupos intoxicados – CPF (CPF+SAL+SAL); CPF+ATR (CPF+ATR+SAL); CPF+2-PAM (CPF+2-PAM+SAL); CPF+ATR+2-PAM (CPF+ATR+2-PAM).

Todos os animais foram submetidos à pré-exposição no TNF, que por sua vez foi realizada imediatamente antes da intoxicação com CPF ou injeção de SAL. Uma hora mais tarde, os animais foram avaliados quanto aos parâmetros de toxicidade aguda e em seguida tratados com SAL ou ATR e/ou 2-PAM. Posteriormente, na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> horas após a administração de CPF ou SAL todos os grupos de animais continuaram sendo observados quanto à presença ou ausência dos sinais clínicos característicos da intoxicação por OF. Ao final do período de observação, os animais retornaram para suas caixas. Vinte e quatro horas depois, parte dos animais foi sacrificada por decapitação para coleta de sangue, hipocampo, estriado e córtex pré-frontal para determinação da atividade das colinesterases referente à este tempo. Já a outra parte dos animais foi submetida às sessões teste (24 horas) e reteste (30 dias após a intoxicação) no TNF, e o tempo de imobilidade (em

segundos) foi medido por 5 minutos em ambas as sessões. Imediatamente após o reteste, os animais foram decapitados para a coleta do sangue e das estruturas encefálicas para a determinação da atividade das colinesterases 30 dias após a exposição ao CPF.

O protocolo geral empregado neste estudo foi realizado conforme o esquema da figura 10.



**Figura 10.** Representação esquemática do protocolo geral.

O hipocampo, o estriado e o córtex pré-frontal foram dissecados e armazenados em freezer – 80° C até a realização da atividade da AChE em cada uma das estruturas.

## 3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 3.4.1 Avaliação da toxicidade aguda

Para a avaliação dos parâmetros da toxicidade aguda, foi adotado o protocolo estabelecido por SALAZAR (2011), com modificações. Os parâmetros avaliados, ou seja, sinais característicos da intoxicação induzida por OF e suas respectivas descrições, conforme proposto por SALAZAR (2011) foram:

- Ataxia: Perda da capacidade de coordenar os movimentos durante a marcha;
- Tremor: Movimento muscular involuntário, de certa forma rítmico. Envolve movimentos oscilatórios de uma ou mais partes do corpo;
- Tetania: Hiperestimulação periférica. Síndrome que se caracteriza por manifestações neuromusculares bruscas, tais como espasmo;
- Sialorreia: Salivação abundante;
- Lacrimejamento: Presença de lágrimas;
- Micção: Presença ou não de urina;
- Diarreia: Presença de bolos fecais inconsistentes, com aspecto pastoso.

A tabela 2 mostra o modelo que foi empregado para o registro destes sinais no decorrer dos experimentos.

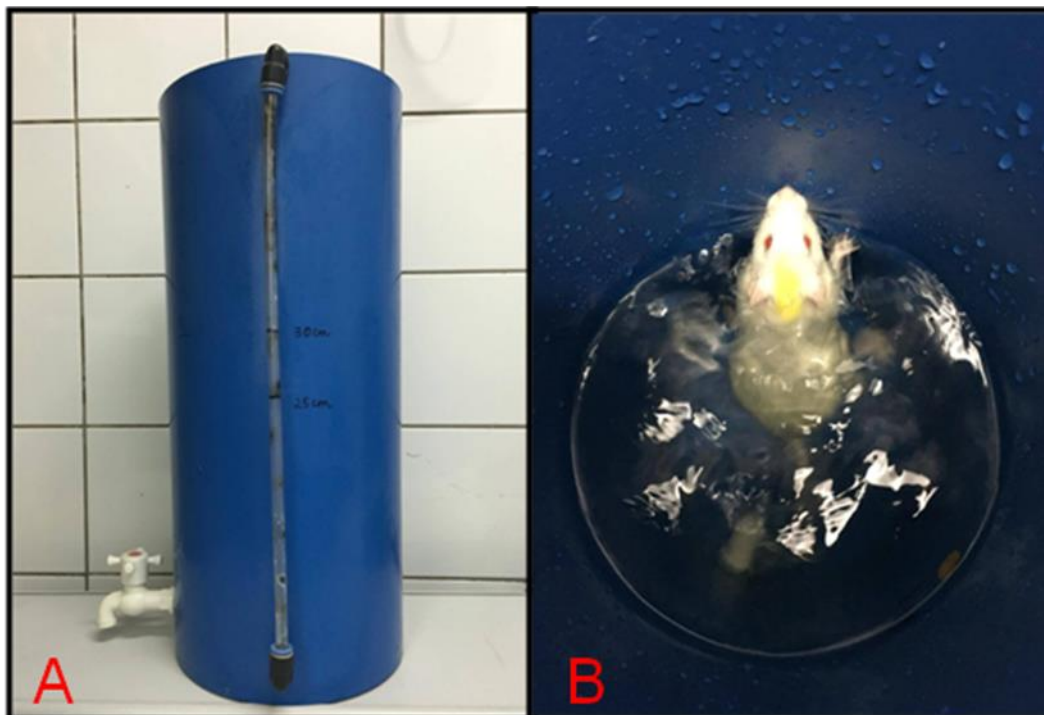
**Tabela 2.** Tabela para coleta de dados do teste de toxicidade aguda. Adaptado de SALAZAR, 2011.

<b>Parâmetros</b>	<b>1 hora</b>	<b>2 horas</b>	<b>3 horas</b>	<b>4 horas</b>
Contorção				
Ataxia				
Tremor				
Lacrimejamento				
Micção				
Diarreia				
Sialorreia				

Os resultados foram representados como presença ou ausência dos parâmetros. A verificação dos sinais de toxicidade aguda associada com a determinação da atividade da ChE plasmática colaborou para comprovar a efetividade da intoxicação por CPF (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989).

### **3.4.2 Teste do Nado Forçado (TNF)**

O aparelho usado para o teste foi um cilindro opaco (figura 11A), de 24 cm de diâmetro e 52 cm de altura, contendo água em temperatura variando entre 22 e 24°C. O nível de água utilizado foi o de 30 cm, de modo que o animal não conseguia tocar o fundo do recipiente com a cauda e nem alcançar as bordas externas com as patas dianteiras. Foi feita a pré-exposição ao teste (figura 11B) por 15 minutos e cada animal, individualmente, foi testado após 24 horas, durante 5 minutos (sessão teste) e após 30 dias (sessão reteste), conforme protocolo proposto por Mezadri *et al.* (2011).



**Figura 11.** Teste do Nado Forçado. Em A, o aparato empregado para a realização do teste. Em B, um rato submetido ao nado forçado.

Segundo *PORSOLT et al.* (1978), animais submetidos a uma situação de nado forçado sem a possibilidade de escape, após certo período de tempo, tendem a se manter imóveis, mantendo apenas os movimentos necessários para manter a cabeça fora d'água. Esse comportamento é definido como imobilidade. A diminuição do tempo de imobilidade diante de um tratamento farmacológico indica que a droga apresenta um efeito tipo antidepressivo.

### 3.5 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

#### 3.5.1 Atividade da colinesterase plasmática

Para determinação da atividade da ChE no plasma dos animais intoxicados foi empregado o método colorimétrico descrito por *Dietz et al.* (1973), usando um kit comercial (Doles<sup>®</sup>, Goiás, Goiânia, Brasil).

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da ChE sobre o substrato propioniltiocolina, que é hidrolisado a um grupo sulfidrílico (SH) livre ao

nível de tiocolina e ácido propiônico (figura 12). O grupo SH livre reage com o DTNB, levando à formação de um composto amarelo, de absorção máxima em torno de 410nm (DIETZ *et al.*, 1973).



**Figura 12.** Representação esquemática da determinação da atividade da colinesterase plasmática. Método proposto por Dietz *et al.* (1973). Fonte: Adaptado de Dietz *et al.*, 1973.

Nesse protocolo, o sangue proveniente do tronco dos animais submetidos à decapitação 24 horas e 30 dias após a injeção única de CPF foi coletado em microtubo previamente heparinizado e levado para centrifugação (Mikro 120, Hettich) por 10 minutos a 4000 RPM. O plasma obtido foi armazenado em ultrafreezer a -80°C até o momento da dosagem.

No teste, para cada amostra, foram utilizados dois tubos de ensaio (um branco e um teste). Em ambos foram adicionados 0,5mL de substrato e 1,5mL de reagente de cor (solução de DTNB) e mantidos em banho-maria, a 37°C, durante 3 minutos. Após, adicionou-se 10µL de plasma no tubo teste, seguido de incubação por 2 minutos e 30 segundos. Após o tempo de incubação e ainda no banho-maria, adicionou-se 1,5mL de solução inibidora (sulfato de quinidina 0,5%) no tubo teste. Os tubos foram retirados do banho-maria e 1,5mL de solução inibidora e 10µL de amostra foram acrescentados ao tubo branco. Após homogeneização, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (SP-220, Bioespectro®, Curitiba, Paraná, Brasil) em 410 nm, acertando o zero com o branco (DIETZ *et al.*, 1973).

O resultado do ensaio foi determinado mediante construção da curva de calibração a partir de solução padrão do kit e cálculo do fator de calibração de acordo com a Lei de Beer. A curva de calibração é representada graficamente pela relação entre os valores de absorbâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão (DIETZ *et al.*, 1973).

A atividade da enzima foi expressa em UI/L, em que uma U de colinesterase corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de substrato/minuto/mL de plasma, a 37°C).

### **3.5.2 Preparo da amostra para determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral**

Foi feita a quantificação da atividade da AChE no hipocampo, no córtex pré-frontal e no estriado de ratos 24 horas e 30 dias após exposição ao CPF e/ou tratamento com ATR/2-PAM.

Os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina (EB-271 Insight, Insight® Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) 24 horas ou 30 dias após a intoxicação com CPF. Os encéfalos foram rapidamente removidos e mantidos em gelo. O estriado, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram imediatamente dissecados e mantidos em gelo.

As amostras dos tecidos cerebrais foram coletadas em microtubos. Antes da coleta, o microtubo foi pesado em balança analítica de precisão e, após preenchimento com o tecido, foi pesado novamente para determinação do peso do material coletado. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem da AChE cerebral e quantificação de proteínas pelo Método de Bradford.

Às estruturas cerebrais provenientes da dissecação foi acrescentada solução tampão fosfato (pH=8,0; 0,1M) com 1% de Triton (Triton X-100) (v/v), na proporção de 1 mL para cada 20 mg de tecido cerebral. O uso do Triton X-100 garantiu a determinação da atividade da AChE livre e ligada à membrana no tecido cerebral (LASSITER *et al.*, 2003).

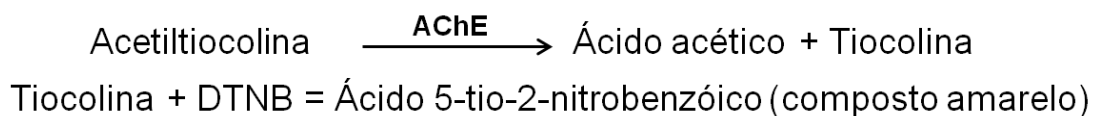
A maceração dos tecidos foi promovida em Potter-Elvehjem (TE-099, Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) com capacidade total de 5 mL e pistilo de teflon por um tempo total de 5 minutos, em períodos de 30 segundos com intervalo de 10 segundos. Finalizada esta etapa, o homogenato foi transferido para tubo Falcon de 15 mL e centrifugado por 5 minutos a 7800G em centrífuga refrigerada (Centrifuge 5804, Eppendorf) a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante obtido das amostras foi transferido para microtubos de 2 mL.

### **3.5.3 Atividade da acetilcolinesterase cerebral**

A dosagem da atividade da AChE no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal foi realizada conforme a metodologia de ELLMAN *et al.*, (1961), com adaptações

propostas por PIRES *et al.*, (2001) e LASSITER *et al.*, (2003). A atividade da enzima é medida através de um método colorimétrico cinético, onde quanto maior a intensidade da coloração amarela produzida a partir da reação da tiocolina com o íon ditiobisnitrobenzoato (DTNB), maior é a atividade enzimática. A reação é rápida e o ensaio é bastante sensível. O resultado obtido com acetiltiocolina (ACTh) como substrato é similar ao da ACh. Este método é usado para estudar a AChE humana nas hemácias e em homogenatos de cérebro, rins, pulmões e músculos de ratos (ELLMAN *et al.*, 1961).

A hidrólise de ACTh resulta na formação de tiocolina que, ao se complexar com o DTNB, produz uma coloração amarela, conforme demonstrado na representação esquemática das reações envolvidas na dosagem de atividade da AChE (figura 13).



**Figura 13.** Representação esquemática da determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral. Método proposto por Ellman *et al.*, 1961. Fonte: Adaptado de Ellman *et al.*, 1961.

No dia do ensaio, os homogenatos foram lentamente descongelados à 4°C e mantidos em caixa térmica com gelo. O homogenato do estriado foi previamente diluído na proporção de 1:5, uma vez que a neurotransmissão colinérgica é altamente expressiva nesta estrutura, se comparado com as demais analisadas neste estudo. Uma alíquota de 135 µL do homogenato de hipocampo, estriado e córtex pré-frontal foi adicionado a cubeta para espectrofotômetro contendo 35 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 5 mM e 820 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 8,0). Essa mistura foi submetida à incubação em bancada por 10 minutos a aproximadamente 23°C. Após a inserção da cubeta no interior do espectrofotômetro (Evolution 300 PC, Thermo Scientific®, Madison, Wisconsin, EUA), 10 µL do substrato para a reação, o iodeto de acetiltiocolina (ACTh) 75 mM, foi acrescentado. A leitura da absorbância foi executada por 2 minutos em intervalos de 10 segundos, sob o comprimento de onda de 412 nm. O valor da absorbância obtido para o estriado ao final do ensaio foi multiplicado por 5. A atividade da AChE foi expressa em µmols de ACTh hidrolisados por hora por mg de proteína.

### 3.5.3.1 Quantificação de proteínas pelo Método de Bradford

Para determinar a quantidade de proteína nas amostras de hipocampo, estriado e córtex pré-frontal previamente dissecadas e submetidas à avaliação da atividade de AChE nestas estruturas cerebrais, o Método de Bradford foi empregado.

O método é altamente reprodutível e rápido, com baixa ou nenhuma interferência de cátions como  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ . A quantificação de proteínas em uma amostra é determinada com o emprego do Reagente de Bradford. Este reagente, que é capaz de ligar-se às proteínas, é constituído principalmente pelo corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) em solução ácida. O CBB G-250 liga-se completamente às proteínas da amostra dentro de aproximadamente 2 minutos, sendo que a estabilidade colorimétrica do complexo formado é constante por uma hora. Esta interação com a proteína estabiliza a forma iônica do corante, alterando o máximo de absorção do corante de 465nm para 595nm. A alteração é visivelmente observada através da mudança de cor do CBB G-250, que é inicialmente castanho na ausência de proteínas para diferentes tons de azul, de acordo com a concentração de proteína presente na amostra (BRADFORD, 1976).

Primeiramente, foi construída uma curva de calibração (tabela 3) a partir de uma solução de albumina sérica bovina a  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) nos volumes de  $1\mu\text{L}$ ,  $3\mu\text{L}$ ,  $5\mu\text{L}$ ,  $7\mu\text{L}$  e  $10\mu\text{L}$  (em duplicata). Visando melhorar a precisão dos resultados obtidos, a solução padrão de albumina foi diluída em 10 vezes.

Para cada um dos pontos da curva de calibração, foram adicionados água destilada, reagente de Bradford (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) e 10, 30, 50, 70 e  $100\mu\text{L}$  de albumina em 190, 170, 150, 130 e  $100\mu\text{L}$  de água destilada. A tabela 3 mostra o volume dos reagentes para cada um dos pontos constituintes da curva de calibração.

**Tabela 3.** Reagentes e os respectivos volumes necessários para a construção da curva de calibração para a quantificação de proteínas nas amostras dissecadas de hipocampo, estriado e córtex pré-frontal.

Ponto da curva de calibração	Concentração de albumina	Água destilada	Albumina sérica bovina
1	1 µg	1190 µL	10 µL
3	3 µg	1170 µL	30 µL
5	5 µg	1150 µL	50 µL
7	7 µg	1130 µL	70 µL
10	10 µg	1100 µL	100 µL
Branco	-	1200 µL	-

Após a adição de todos os reagentes, a solução foi homogeneizada em agitador vórtex (AP-59, Phoenix®, Araraquara, São Paulo, Brasil). No espectrofotômetro, o aparelho foi zerado a partir do branco, contendo apenas 1200 µL de água destilada e 300 µL de reagente de Bradford.

Os homogenatos do hipocampo e do córtex pré-frontal foram diluídos em 10 vezes, assim como a solução padrão de albumina. Já os homogenatos do estriado foram diluídos em 50 vezes. O valor de absorbância obtido para esta estrutura foi multiplicado por 5 ao final do ensaio.

Para a determinação da quantidade de proteínas nas amostras, foram acrescentados em cubetas para espectrofotômetro 10 µL do homogenato diluídos em 190 µL de água destilada, 1190 µL de água destilada e 300 µL de reagente de Bradford. As absorbâncias foram obtidas sob o comprimento de onda de 595 nm.

A cada cinco amostras lidas no espectrofotômetro, fez-se necessário o preparo de outro branco, uma vez que o reagente de Bradford é altamente precipitável. A quantificação de proteínas nas amostras de hipocampo, estriado e córtex pré-frontal, bem como a leitura de cada um dos pontos da curva de calibração foram realizados em duplicata.

A comparação dos resultados obtidos para a amostra e para a curva padrão construída a partir das diferentes concentrações conhecidas de albumina permitiu determinar a concentração da proteína nas estruturas cerebrais.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 para Windows (IBM SPSS Statistics®, Chicago, IL, EUA). Apenas o teste de Marascuilo, empregado na análise dos dados de toxicidade aguda, foi usado empregando o software R®.

Para os dados da toxicidade aguda foi feita análise de correlação entre o tratamento e a frequência da resposta usando o Teste do Qui-Quadrado de Pearson, seguido de teste de Marascuilo quando apropriado.

O tempo de imobilidade do TNF foi avaliado por análise de variância (ANOVA) de 2 vias com medidas repetidas, sendo o tempo de imobilidade a medida repetida e o tratamento o fator independente. No caso de efeito do tratamento ou interação entre o tratamento e o tempo, foi realizada ANOVA de uma via seguido por teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado.

A atividade da ChE plasmática ou AChE cerebral de 24 horas ou de 30 dias foi analisada por ANOVA de uma via seguida por teste *post-hoc* de Duncan quando apropriado.

A construção dos gráficos foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software®, San Diego, California, EUA).

Os tempo de imobilidade no TNF, a atividade da ChE plasmática e da AChE no hipocampo, no estriado e no córtex pré-frontal, de 24 horas e de 30 dias, foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

O nível de significância considerado para todas as análises foi o de  $p < 0,05$ .

# ***RESULTADOS***

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Ao final da primeira hora após a administração de SAL ou CPF (Tabela 4), os animais foram avaliados quanto à manifestação ou ausência dos sinais característicos da toxicidade aguda e, em seguida, receberam as injeções de ATR, 2-PAM, ATR+2-PAM ou SAL, sendo, portanto, subdivididos em 8 diferentes grupos. A análise da toxicidade aguda ocorreu, novamente, 2 (Tabela 5), 3 (Tabela 6) ou 4 (Tabela 7) horas depois da primeira injeção (SAL ou CPF).

O teste do Qui-Quadrado mostrou que houve aumento estatisticamente significativo dos sinais de toxicidade ataxia ( $X^2(1)=9,646$ ;  $p=0,002$ ), tremor ( $X^2(1)=65,479$ ;  $p=0,000$ ), tetania ( $X^2(1)=23,703$ ;  $p=0,000$ ), lacrimejamento ( $X^2(1)=7,297$ ;  $p=0,007$ ), sialorreia ( $X^2(1)=8,455$ ;  $p=0,004$ ) e diarreia ( $X^2(1)=12,131$ ;  $p=0,000$ ) na primeira hora após a intoxicação com CPF em comparação com o grupo SAL. A micção não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos avaliados (dados não mostrados). Na segunda hora também houve aumento estatisticamente significativo do tremor ( $X^2(7)=29,300$ ;  $p=0,000$ ) e da tetania ( $X^2(7)=17,778$ ;  $p=0,013$ ) entre todos os grupos avaliados. Nenhum dos animais avaliados exibiu contorção ou morreu dentro do período de 4 horas.

O Teste de Marascuilo mostrou que para um dos parâmetros avaliados (tremor) o grupo CPF+2-PAM foi estatisticamente diferente dos grupos SAL, SAL+ATR, SAL+2-PAM, SAL+ATR+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM.

**Tabela 4.** Percentual de animais (por grupo) que apresentaram sinais de toxicidade aguda 1 hora após a injeção única de clorpirifós (CPF) 20 mg/kg ou SAL.

Grupos	1 hora					
	Porcentagem de animais que apresentaram sinais de toxicidade aguda					
	Ataxia	Tremor	Tetania	Lacrimej.	Sialorreia	Diarreia
SAL (n=39)	0	0	0	0	0	0
CPF (n=41)	22*	90,2*	46,3*	17,1*	19,5*	26,8*

\* $p<0,05$  comparado ao grupo SAL (Teste do Qui-Quadrado)

**Tabela 5.** Percentual de animais (por grupo) que apresentaram sinais de toxicidade aguda 2 horas após a injeção única de clorpirifós (CPF) 20 mg/kg ou SAL e o posterior tratamento com atropina (ATR) 10 mg/kg, pralidoxima (2-PAM) 40 mg/kg e a associação de ambas as drogas.

2 horas						
Porcentagem de animais que manifestaram sinais de toxicidade aguda						
Grupos	Ataxia	Tremor*	Tetania*	Lacrimej.	Sialorreia	Diarreia
SAL (n=12)	0	0	0	0	0	0
CPF (n=13)	15,4	7,7	0	7,7	0	7,7
SAL+ATR (n=9)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR (n=9)	0	40	20	0	20	0
SAL+2-PAM (n=10)	0	0	0	0	0	0
CPF+2-PAM (n=9)	0	56,6 <sup>A,B,C,DE</sup>	33,3	0	11,1	0
SAL+ATR+2-PAM (n=8)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR+2-PAM (n=9)	0	0	33,3	0	22,2	0

\*p<0,05 (Teste do Qui-Quadrado)

p< 0,05 quando comparado com: <sup>A</sup> SAL; <sup>B</sup> SAL+ATR; <sup>C</sup> SAL+2-PAM; <sup>D</sup> SAL+ATR+2-PAM;

<sup>E</sup> CPF+ATR+2-PAM (Teste de Marascuilo).

**Tabela 6.** Percentual de animais (por grupo) que apresentaram sinais de toxicidade aguda 3 horas após a injeção única de clorpirifós (CPF) 20 mg/kg ou SAL e o posterior tratamento com atropina (ATR) 10 mg/kg, pralidoxima (2-PAM) 40 mg/kg e a associação de ambas as drogas.

3 horas						
Porcentagem de animais que manifestaram sinais de toxicidade aguda						
Grupos	Ataxia	Tremor	Tetania	Lacrimej.	Sialorreia	Diarreia
SAL (n=12)	0	0	0	0	0	0
CPF (n=13)	7,7	7,7	0	7,7	0	7,7
SAL+ATR (n=9)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR (n=9)	0	10	0	0	0	0
SAL+2-PAM (n=10)	0	0	0	0	0	0
CPF+2-PAM (n=9)	0	0	0	0	0	0
SAL+ATR+2-PAM (n=8)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR+2-PAM (n=9)	0	0	0	0	0	0

**Tabela 7.** Percentual de animais (por grupo) que apresentaram sinais de toxicidade aguda 4 horas após a injeção única de clorpirifós (CPF) 20 mg/kg ou SAL e o posterior tratamento com atropina (ATR) 10 mg/kg, pralidoxima (2-PAM) 40 mg/kg e a associação de ambas as drogas.

4 horas						
Porcentagem de animais que manifestaram sinais de toxicidade aguda						
Grupos	Ataxia	Tremor	Tetania	Lacrimej.	Sialorreia	Diarreia
SAL (n=12)	0	0	0	0	0	0
CPF (n=13)	0	0	0	0	0	0
SAL+ATR (n=9)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR (n=9)	0	0	0	0	0	0
SAL+2-PAM (n=10)	0	0	0	0	0	0
CPF+2-PAM (n=9)	0	0	0	0	0	0
SAL+ATR+2-PAM (n=8)	0	0	0	0	0	0
CPF+ATR+2-PAM (n=9)	0	0	0	0	0	0

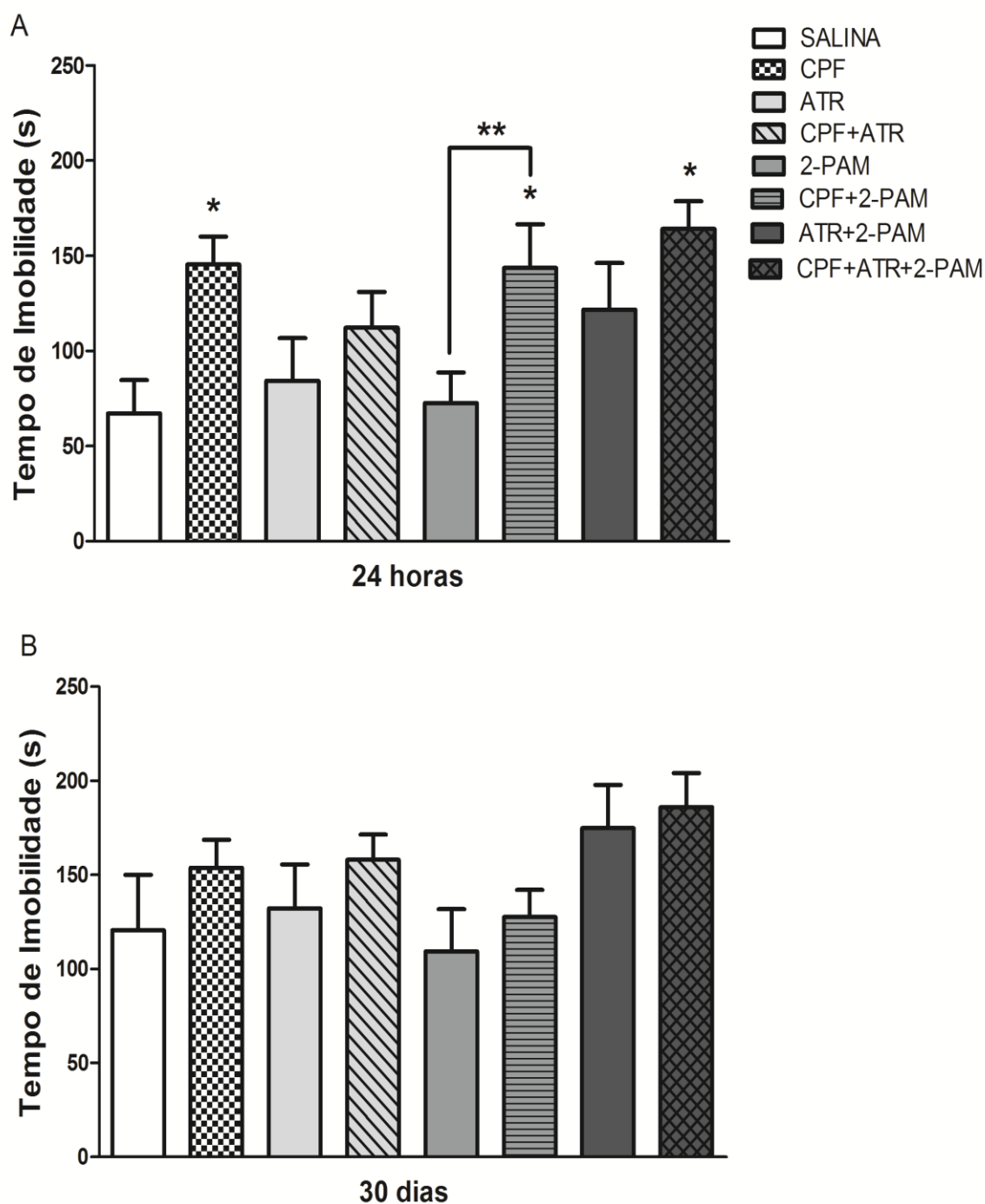
## 4.2 TESTE DO NADO FORÇADO

A figura 14 mostra o tempo de imobilidade dos ratos expostos ao TNF 24 horas e 30 dias após a pré-exposição no TNF para os grupos controle, intoxicado agudamente com CPF e tratados com ATR, 2-PAM ou a combinação de ambas as drogas.

A análise dos dados obtida através da ANOVA de medidas repetidas evidencia o efeito do tempo ( $F(1,72)=25,64$ ;  $p<0,001$ ) e do tratamento ( $F(1,72)=2,715$ ;  $p<0,05$ ), com tendência de interação entre o tempo e o tratamento ( $F(7,72)=2,025$ ;  $p=0,063$ ). A intoxicação com CPF aumentou o tempo de imobilidade na sessão teste 24 horas após a intoxicação ( $F(7,72)=3,85$ ;  $p=0,001$ ) quando comparado ao grupo SAL (*post-hoc* de Duncan  $p<0,05$ ).

Os tratamentos com 2-PAM e ATR+2-PAM não reverteram o aumento do tempo de imobilidade nos animais intoxicados com CPF. Já o tratamento com ATR (grupo CPF+ATR) reverteu parcialmente o aumento do tempo de imobilidade induzido por CPF.

Nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os grupos foi observada no 30º dia (sessão reteste) ( $F(7,72)=1,575$ ;  $p=0,157$ ).



**Figura 14.** Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre o tempo de imobilidade (em segundos) de ratos expostos ao TNF 24 horas e 30 dias após a intoxicação aguda. Ratos receberam injeção i.p. de SAL e/ou CPF e após 1 hora foram tratados com SAL, ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM. Grupos: SAL, n=12; CPF, n=13; ATR, n=9; CPF+ATR, n=10; 2-PAM, n=10; CPF+2-PAM, n=9; ATR+2-PAM, n=8 e CPF+ATR+2-PAM, n=9. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo SAL. \*\*2-PAM  $\neq$  CPF+2-PAM (ANOVA seguida de Duncan).

### 4.3 ATIVIDADE DA COLINESTERASE PLASMÁTICA

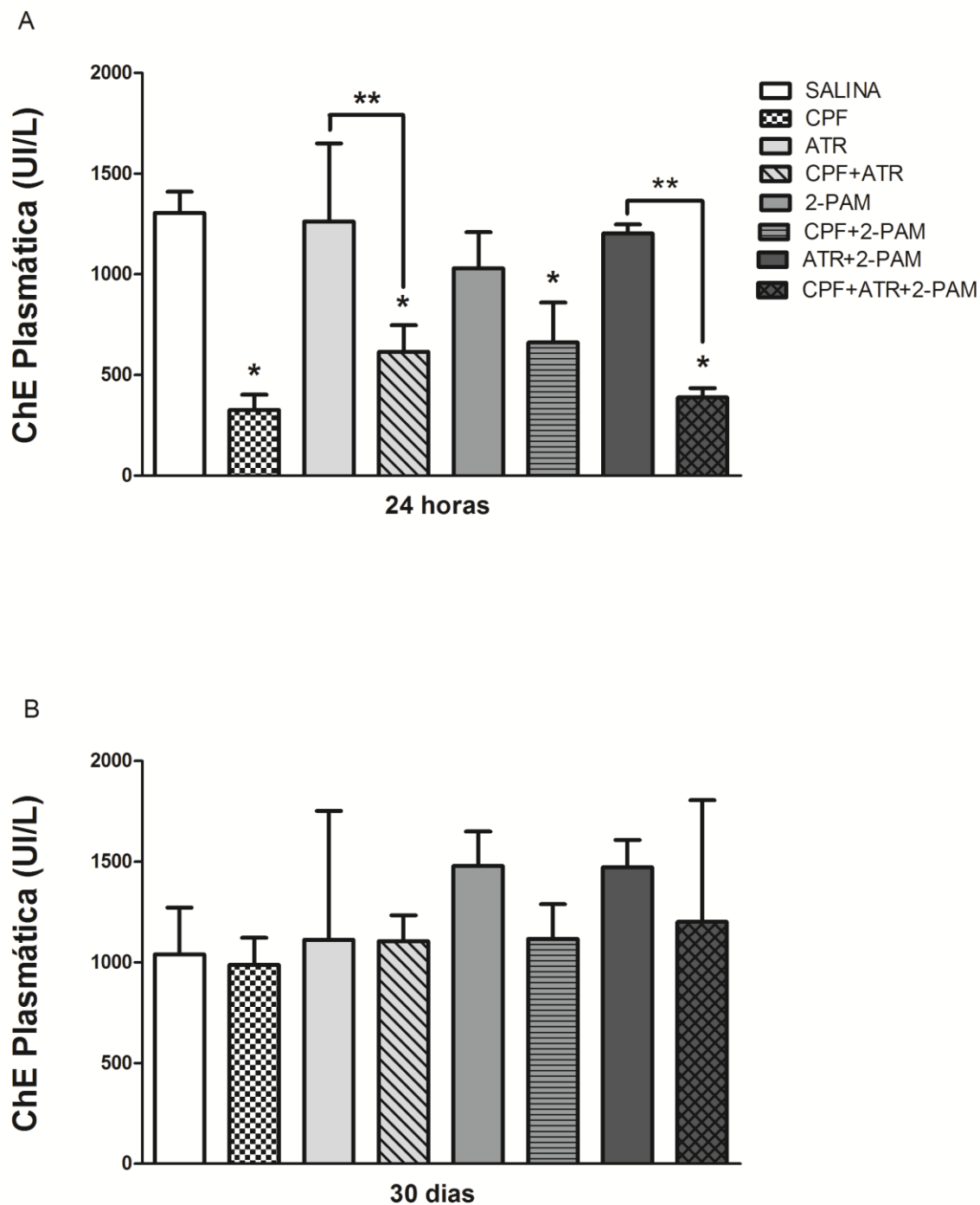
Houve redução estatisticamente significativa da atividade da ChE plasmática entre os grupos 24 horas após intoxicação com CPF ( $F(7,31)=6,154$ ;  $p<0,001$ ), como mostra a figura 15A.

Todos os grupos intoxicados com CPF (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) apresentaram redução estatisticamente significativa atividade da ChE plasmática ao serem comparados com o grupo SAL (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ).

Observou-se, ainda, diferença estatisticamente significativa entre os grupos CPF+ATR e ATR e entre os grupos CPF+ATR+2-PAM e ATR+2-PAM (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ).

Os resultados obtidos mostram que a injeção única de CPF 20 mg/kg reduziu significativamente a atividade da enzima no plasma (redução de 77,38%) quando comparado com o grupo SAL. Para os grupos CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM a redução da atividade da ChE plasmática foi de 57,41%, 54,16% e 73,13%, respectivamente.

A figura 15B mostra a atividade de ChE no 30º dia após a intoxicação com CPF e posterior tratamento com ATR, 2-PAM e a associação de ATR e 2-PAM. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados ( $F(7,34)=1,485$ ;  $p=0,206$ ).



**Figura 15.** Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da ChE plasmática (em UI/L) 24 horas (A) e 30 dias (B) após a intoxicação aguda com CPF. Ratos receberam injeção i.p. de SAL e/ou CPF e após 1 hora foram tratados com SAL, ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM. Grupos: SAL (14A n=5/ 14 B n=6); CPF (14A n=6/ 14B n=5); ATR (14A/14B n=4); CPF+ATR (14A n=6/ 14B n=5); 2-PAM (14A n=5/ 14B n=7); CPF+2-PAM (14A/ 14B n=5); ATR+2-PAM (14A/ 14B n=5) e CPF+ATR+2-PAM (14A/ 14B n=5). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo SAL. \*\*CPF+ATR+SAL  $\neq$  de ATR+SAL+SAL e CPF+ATR+2-PAM  $\neq$  de ATR+2-PAM+SAL (ANOVA seguida de Duncan).

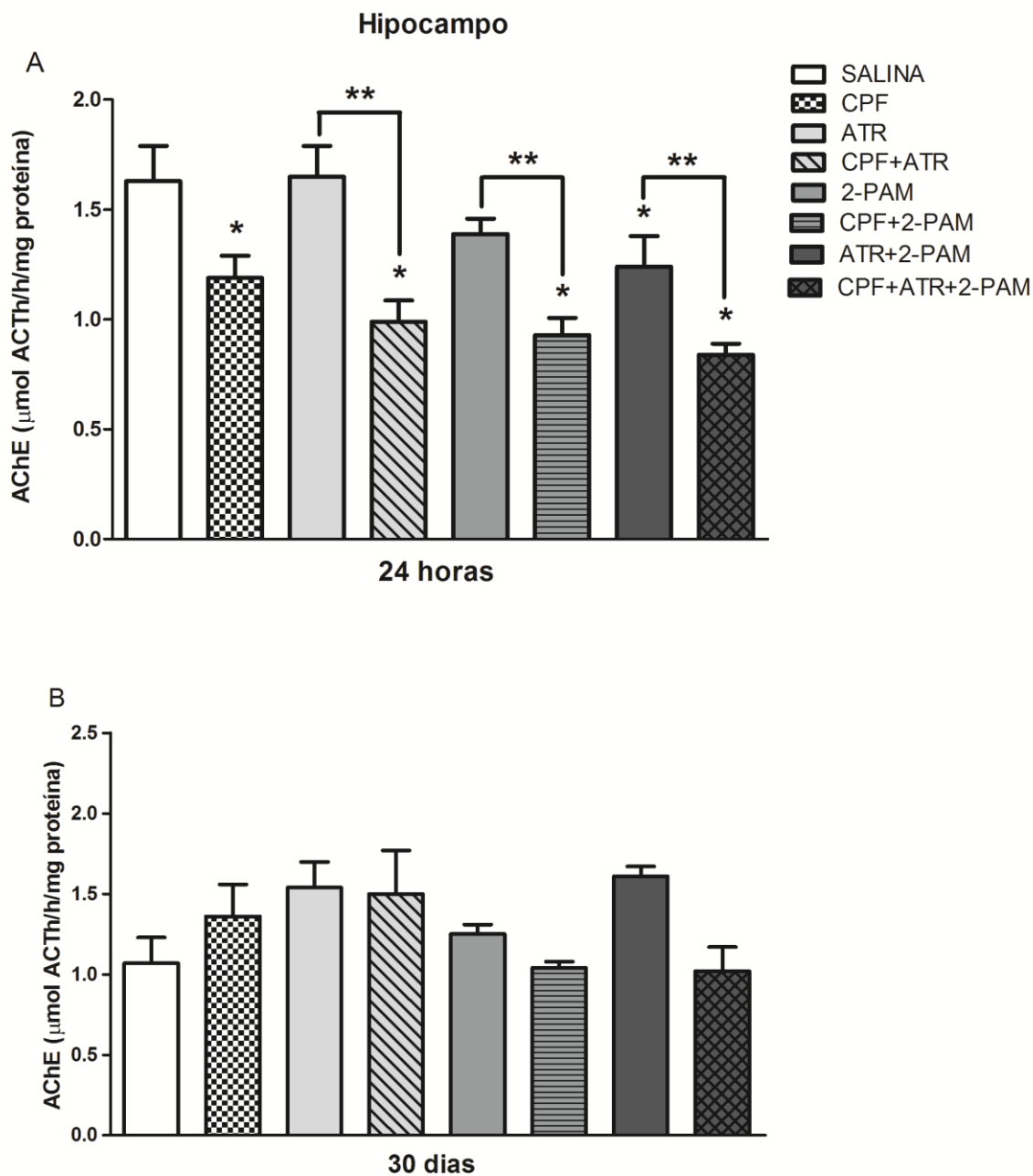
## 4.4 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL

### 4.4.1 Atividade da acetilcolinesterase no hipocampo

A figura 16 mostra a atividade da AChE no hipocampo 24 horas e 30 dias após a pré-exposição no TNF para os grupos controle, intoxicado com CPF e tratados com ATR, 2-PAM e a combinação de ambas as drogas.

Houve diferença estatisticamente significativa da atividade da AChE no hipocampo entre os grupos testados 24 horas após intoxicação com CPF ( $F(7,26)=7,273$ ;  $p<0,001$ ). Todos os grupos intoxicados com CPF (CPF, CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM) apresentaram redução da atividade da AChE no hipocampo quando comparados com o grupo SAL (*post-hoc* de Duncan  $p<0,05$ ). Além disso, o grupo tratado com ATR+2-PAM também apresentou redução da atividade da AChE ( $p<0,05$ , figura 16A). Observou-se também diferença estatisticamente significativa entre os grupos CPF+ATR e ATR, CPF+2-PAM e 2-PAM e entre CPF+ATR+2-PAM e ATR+2-PAM (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na atividade desta enzima no hipocampo no 30<sup>o</sup> dia (figura 16B) após injeção das drogas ( $F(7,29)=1,843$ ;  $p=0,117$ ).



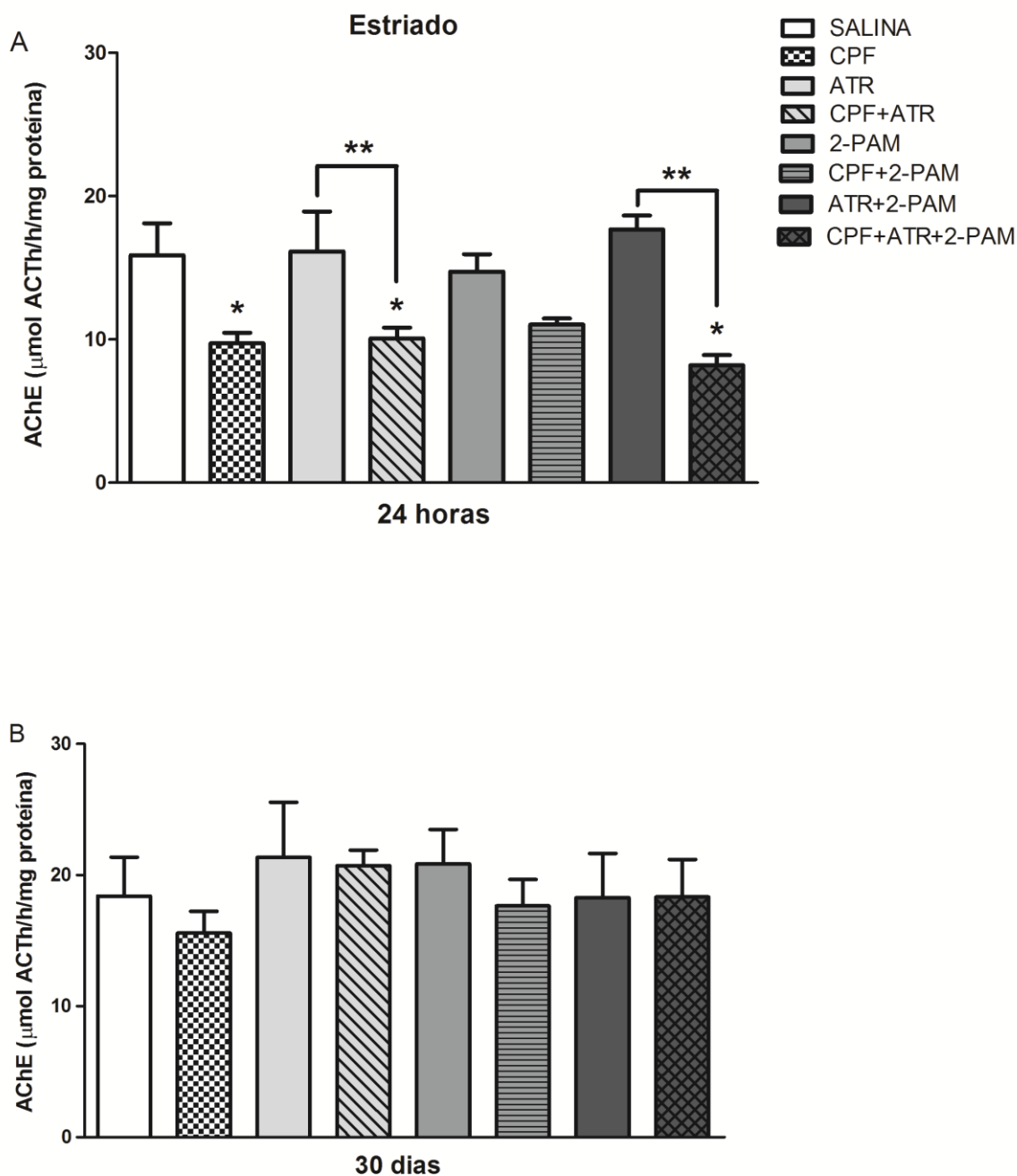
**Figura 16.** Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE (em  $\mu\text{mol}$  de ACTh hidrolisados/h/mg de proteína) no hipocampo 24 horas (A) e 30 dias (B) após a intoxicação aguda com CPF. Ratos receberam SAL e/ou CPF e após 1 hora foram tratados com SAL, ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM. Grupos: SAL (13A/ 13B n=6); CPF (13A/ 13B n=5); ATR (13A n=6/ 13B n=3); CPF+ATR (13A n=3/ 13B n=5); 2-PAM (13A n=5/ 13B n=4); CPF+2-PAM (13A n=4/ 13B n=6); ATR+2-PAM (13A n=5/ 13B n=3) e CPF+ATR+2-PAM (13A/ 13B n=5). \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo SAL. \*\* $p < 0,05$  CPF+ATR+SAL  $\neq$  SAL+ATR+SAL e CPF+2-PAM+SAL  $\neq$  SAL+2-PAM+SAL (ANOVA seguida de Duncan).

#### 4.4.2 Atividade da acetilcolinesterase no estriado

A figura 17 mostra a atividade da AChE no estriado 24 horas e 30 dias após a pré-exposição no TNF para os grupos controle, intoxicado com CPF e tratados com ATR, 2-PAM e a combinação de ambas as drogas.

Houve diferença estatisticamente significativa da atividade da AChE no estriado entre os grupos testados 24 horas após intoxicação com CPF ( $F(7,29)=3,926$ ;  $p=0,004$ ). Os grupos intoxicados com CPF (CPF, CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM) apresentaram redução da atividade da AChE no estriado quando comparados com o grupo SAL (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ). Além disso, os grupos que receberam CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM apresentaram-se estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles ATR e ATR+2-PAM (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ).

A figura 17B mostra que não houve diferença de atividade da AChE estriatal entre os grupos no 30º dia após injeção das drogas ( $F(7,30)=0,693$ ;  $p=0,677$ ).



**Figura 17.** Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE (em  $\mu\text{mol}$  de ACTh hidrolisados/h/mg de proteína) no estriado 24 horas (A) e 30 dias (B) após intoxicação aguda com CPF. Ratos receberam SAL e/ou CPF e após 1 hora foram tratados com SAL, ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM. Grupos: SAL (14A n=5/ 14B n=4); CPF (14A n=4/ 14B n=8); ATR (14A n=6/ 14B n=4); CPF+ATR (14A n=4/ 14B n=5), 2-PAM (14A n=6/ 14B n=4); CPF+2-PAM (14A/14B n=4); ATR+2-PAM (14A/ 14B n=4) e CPF+ATR+2-PAM (14A n=4/ 14B n=5). \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo SAL. \*\*CPF+ATR+SAL  $\neq$  de ATR+SAL+SAL e CPF+ATR+2-PAM  $\neq$  de ATR+2-PAM+SAL (ANOVA seguida de Duncan).

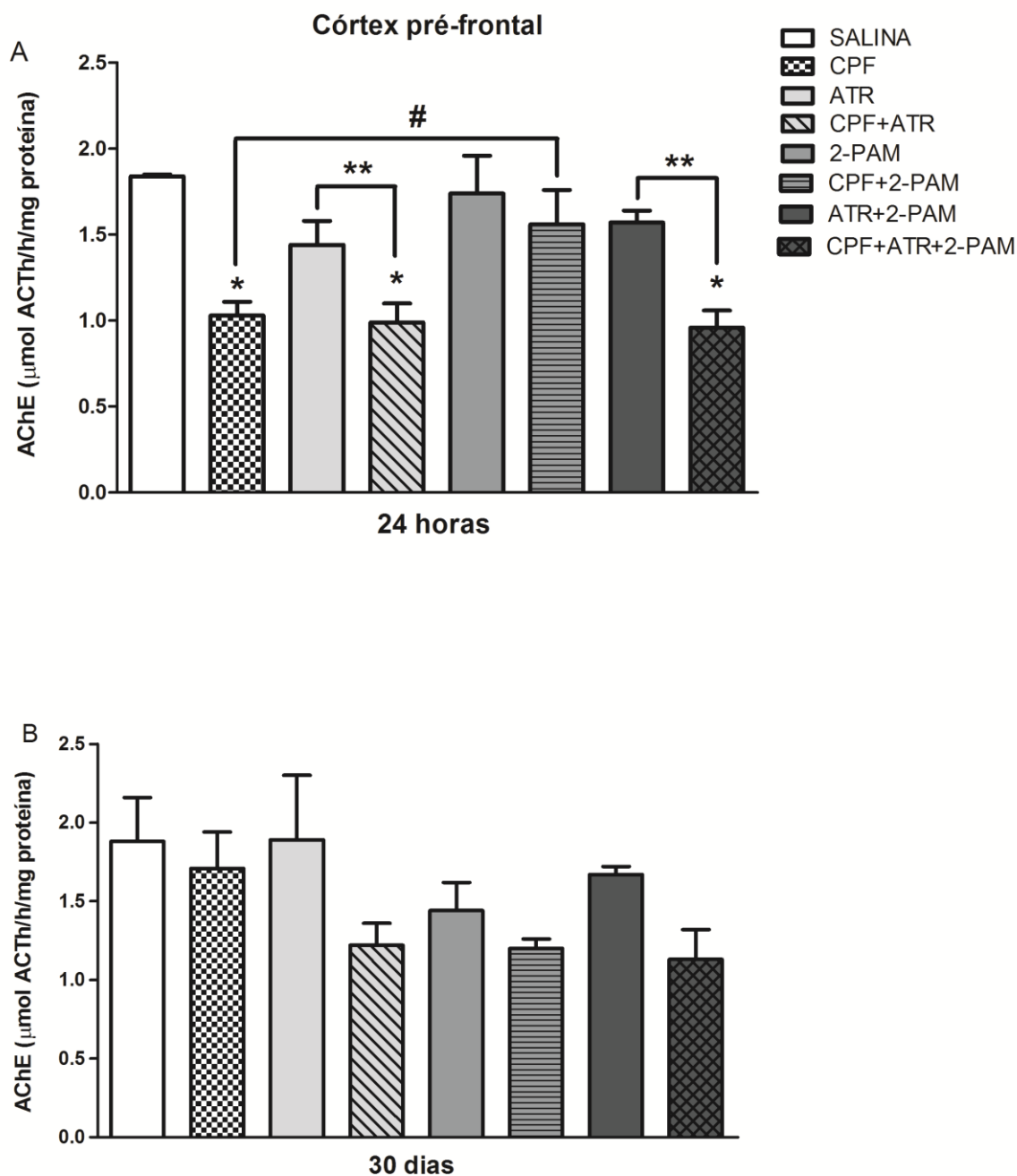
#### 4.4.3 Atividade da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal

A figura 18 mostra a atividade da AChE no córtex pré-frontal 24 horas e 30 dias após a intoxicação para os grupos controle, intoxicado com CPF e posteriormente tratados com ATR, 2-PAM e a combinação de ambas as drogas.

Houve diferença estatisticamente significativa da atividade da AChE no córtex pré-frontal entre os grupos testados 24 horas após intoxicação com CPF ( $F(7,23)=6,313$ ;  $p<0,001$ ) (figura 18A). Os grupos intoxicados com CPF (CPF, CPF+ATR e CPF+ATR+2-PAM) apresentaram redução da atividade da AChE no córtex pré-frontal quando comparados com o grupo SAL (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ ).

A análise mostrou ainda que os grupos tratados com CPF+ATR, CPF+2-PAM e CPF+ATR+2-PAM apresentaram-se estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles (ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM). O grupo CPF+2-PAM apresentou atividade da AChE maior que a do grupo que recebeu somente CPF (*post-hoc* de Duncan,  $p<0,05$ , figura 18A).

Não houve diferença de atividade da AChE nesta estrutura entre os grupos no 30º dia após injeção das drogas ( $F(7,26)=1,910$ ;  $p=0,109$ ), como mostra a figura 18B.



**Figura 18.** Efeito do CPF e do tratamento com ATR, 2-PAM e ATR+2-PAM sobre a atividade da AChE (em  $\mu\text{mol}$  de ACTh hidrolisados/h/mg de proteína) no córtex pré-frontal 24 horas (A) e 30 dias (B) após intoxicação aguda com CPF. Ratos receberam SAL e/ou CPF e após 1 hora foram tratados com SAL, ATR, 2-PAM ou ATR+2-PAM. Grupos: SAL (15A n=4/ 15B n=6); CPF (15A/ 15B n=4); ATR (15A n=4/ 15B n=5); CPF+ATR (15A n=4/ 15B n=6); 2-PAM (15A/ 15B n=4); CPF+2-PAM (15A n=4/ 15B n=6); ATR+2-PAM (15A/ 15B n=4) e CPF+ATR+2-PAM (15A n=4/ 15B n=6). \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo SAL. \*\*CPF+ATR+2-PAM  $\neq$  de ATR+2-PAM+SAL. #CPF+2-PAM+SAL  $\neq$  CPF+SAL+SAL (ANOVA seguida de Duncan).

# ***DISCUSSÃO***

---

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a exposição aguda ao CPF, em dose baixa, induziu um efeito tipo-depressivo em um modelo animal de depressão, o TNF, 24 horas após a intoxicação, que não persistiu após 30 dias. O CPF também foi capaz de desencadear sinais de toxicidade aguda, uma vez que ataxia, tremor, tetania, lacrimejamento, sialorreia e diarreia foram observados na primeira hora após a injeção intraperitoneal deste OF. A atividade da ChE plasmática, considerada um marcador da intoxicação por OF (EDDLESTON *et al.*, 2008; SINGLETON *et al.*, 2015), apresentou-se reduzida 24 horas após a intoxicação. Em conjunto, esses últimos dados confirmaram a toxicidade aguda produzida pela dose de 20mg/Kg de CPF nos animais testados. O efeito tipo-depressivo induzido pelo CPF parece ter relação com a ação central desse OF, já que houve redução da atividade da AChE no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal desses animais 24 horas, mas não 30 dias após a intoxicação.

Nosso trabalho reproduziu o aumento do tempo de imobilidade induzido por CPF já observado em outro trabalho do grupo (CUNHA, 2014). Podemos inferir que esse aumento no tempo de imobilidade não seja decorrente de redução da atividade locomotora, já que Cunha (2014) também verificou ausência de prejuízo na exploração do campo aberto em ratos intoxicados com a mesma dose do CPF.

A ATR atenuou o efeito tipo-depressivo induzido pela exposição aguda ao CPF 24 horas após a intoxicação, ao reduzir o tempo de imobilidade no TNF. O tratamento com 2-PAM não alterou o comportamento observado no TNF e recuperou parcialmente a atividade da AChE no córtex pré-frontal e discretamente reativou a AChE estriatal, não apresentando eficácia sobre a reativação da AChE hipocampal 24 horas após a intoxicação com CPF. O tratamento com ATR+2-PAM não apresentou nenhum efeito sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela exposição aguda ao CPF 24 horas após a intoxicação.

Deste modo, ao relacionarmos as alterações comportamentais com as bioquímicas, é provável que o hipocampo seja a principal estrutura encefálica envolvida com o surgimento do efeito tipo-depressivo observado no TNF em ratos 24 horas após a exposição aguda ao CPF. No mesmo sentido, a exposição crônica ao malation, um

outro OF, aumentou o tempo de imobilidade dos ratos expostos ao TNF ao mesmo tempo que inibiu a atividade da AChE hipocampal em todas as doses testadas (RAMOS *et al.*, 2006). Já um estudo recente mostrou que outro OF, o diazinon (39 mg/kg, i.p.), inibiu a atividade da AChE no hipocampo (oito horas após a intoxicação) e no córtex pré-frontal (quatro e oito horas após) (JUDGE *et al.*, 2016).

No nosso estudo, a ATR, um antagonista de mAChRs não seletivo, foi capaz de atenuar o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo CPF 24 horas depois da intoxicação. Em um protocolo similar ao o que foi empregado no nosso estudo, Wright *et al.* (2010) observaram que a injeção única de ATR 16 mg/kg (i.p.) não reduziu significativamente o tempo de imobilidade de ratos no TNF 8 dias após a exposição aguda ao diisopropilfluorofosfato (DPF), embora esse efeito tenha sido observado no reteste no TNF após 29 dias.

O efeito tipo-depressivo do CPF e a atenuação deste efeito através do tratamento com ATR observados no nosso estudo fortalecem a hipótese proposta em 1972 por Janowsky e colaboradores. Essa hipótese supõe que, em seres humanos, os sinais e sintomas de depressão são manifestados em situações de desequilíbrio entre a neurotransmissão adrenérgica e colinérgica, com predominância de níveis reduzidos de DA, 5-HT e noradrenalina (NA), com intensa atividade colinérgica no SNC. Assim, o CPF, por se tratar de um OF inibidor da AChE, poderia levar ao acúmulo de ACh nas sinapses dos animais testados, aumentando excessivamente a neurotransmissão colinérgica em estruturas encefálicas envolvidas com as emoções, como o hipocampo. E a ATR, ao bloquear os mAChRs, reestabeleceria o reequilíbrio entre as neurotransmissões colinérgica e adrenérgica, atenuando o efeito tipo-depressivo observado no TNF.

Outros estudos apoiam a hipótese de que o aumento da disponibilidade de ACh no SNC está relacionado com o surgimento de sintomas relacionados à depressão. Janowsky *et al.* (1986) demonstraram que a escopolamina, outro antagonista muscarínico, bloqueou o efeito depressivo induzido pela fisostigmina, um inibidor da AChE, em pacientes com transtornos psiquiátricos. Já a metaescopolamina, uma antagonista muscarínico de ação periférica, foi ineficaz em melhorar os sintomas depressivos nesses pacientes (JANOWSKY *et al.*, 1986). Da mesma forma, um estudo com roedores mostrou que o aumento das concentrações de ACh após a

injeção intra-hipocampal de fisostigmina contribuiu para o surgimento de comportamentos tipo-depressivos, enquanto o tratamento crônico com fluoxetina (FLX), um antidepressivo, aumentou tanto o nível quanto a atividade da AChE no hipocampo (MINEUR *et al.*, 2013).

A ATR, em dose maior que a que utilizamos (25 mg/kg) e escopolamina (1,5 mg/kg) administradas 24 horas e 30 minutos antes do teste reduziram o tempo de imobilidade em ratos no TNF (MANCINELLI *et al.*, 1988). Ainda, a escopolamina agiu de modo sinérgico com a desipramina administrada subcronicamente no mesmo teste (MANCINELLI *et al.*, 1988). Recentemente, Witkin *et al.* (2014) mostraram que as propriedades antidepressivas da escopolamina parecem ser mediadas pelos mAChRs M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub>, já que o efeito antidepressivo desse antagonista muscarínico no TNF não foi observado nos animais M<sub>1</sub>-KO e M<sub>2</sub>-KO. Em humanos, a escopolamina parece induzir efeito antidepressivo rápido após a primeira administração intravenosa de 4 mg/kg (DREVETS *et al.*, 2013).

Considerando que a ATR reverteu parcialmente o efeito tipo-depressivo do CPF, é possível que ativação excessiva dos nAChRs no hipocampo também tenha contribuído para esse efeito. Essa hipótese é apoiada por estudo que mostrou que a mecamilamina, um antagonista nAChRs bloqueou o efeito tipo-depressivo induzido pela administração intra-hipocampal de fisostigmina em camundongos no teste de suspensão da cauda (MINEUR *et al.*, 2013).

Também não podemos descartar a possibilidade de que outros mecanismos além da exacerbação da atividade colinérgica estejam envolvidos na toxicidade desse OF (ALDRIDGE *et al.*, 2003; MORENO *et al.*, 2008; TERRY, 2012) e na sua reversão parcial pela ATR. A intoxicação subclínica pelos OF pode desencadear estresse oxidativo e neuroinflamação, bem como alterar inúmeras funções enzimáticas e de proteínas (TERRY, 2012). A escopolamina parece exercer uma ação neuroprotetora ao prevenir a degeneração de células hipocampais de ratos em cultura após lesão excitotóxica induzida por glutamato (GLU) (RAMI *et al.*, 1997). Já a ATR mostrou-se eficaz contra os efeitos neurotóxicos induzidos por soman (MCDONOUGH *et al.*, 1989). Considerando a existência de propriedades farmacológicas semelhantes entre ATR e escopolamina, pode-se sugerir que no nosso estudo a ATR, além de antagonizar diretamente os mAChRs, possa ter exercido algum efeito neuroprotetor que contribuiu para atenuar o efeito tipo-depressivo do CPF no TNF.

Outra possibilidade é que a dose de ATR (10 mg/kg) aqui empregada tenha sido insuficiente para reverter completamente o aumento do tempo de imobilidade induzido pelo CPF no TNF, uma vez que os animais não foram atropinizados. Nos pacientes intoxicados com OF é feita a atropinização, que consiste na administração da dose recomendada de 2 mg (i.v.) a cada 5 ou 10 minutos até o desaparecimento dos sintomas relacionados à síndrome colinérgica. Dependendo da gravidade da intoxicação e da lipossolubilidade do OF, sugere-se a administração intravenosa de doses elevadas de ATR até que haja a reversão da sintomatologia tóxica (VALE; MEREDITH; HEATH, 1990). Por exemplo, em um relato de caso de intoxicação por ingestão de malation, um total de 3369 mg (i.v.) foi administrado para atropinização do paciente (AFZAAL; RABBANI, 1990).

Em contrapartida, a administração de 2-PAM não reverteu o aumento do tempo de imobilidade no TNF induzido pela intoxicação aguda com CPF, assim como não reativou a AChE no hipocampo. Do mesmo modo, o tratamento com cloreto de pralidoxima não foi capaz de reativar a AChE hipocampal de camundongos expostos ao sarin (CLEMENT, 1992).

É provável que a 2-PAM, por se tratar de um composto quaternário de monopiridina (KARADE *et al.*, 2014), não tenha atravessado a barreira hematoencefálica efetivamente para alcançar todas as estruturas encefálicas, o que explicaria, até certo ponto, a ausência de reativação da AChE hipocampal. De fato, a literatura aponta que as oximas, devido à baixa lipossolubilidade e baixo potencial para atravessar a barreira hematoencefálica, agem majoritariamente no SNP, reestabelecendo as sinapses nicotínicas na junção neuromuscular (BUCKLEY *et al.*, 2011). Porém, ao comparar biperidinas com monopiridinas, um estudo mostrou que estas últimas atravessam mais facilmente a barreira hematoencefálica (KARASOVA *et al.*, 2010).

Todavia, a atividade da AChE foi parcialmente reestabelecida após o tratamento com 2-PAM no córtex pré-frontal (em 25,49%) e, em menor grau, no estriado (em 8,25%). Porém, apesar de uma discreta reativação da AChE no estriado, não podemos considerar que a eficácia desta oxima tenha sido significativa nesta estrutura.

Conforme o estudo de Sakurada *et al.* (2003), a 2-PAM (sob a forma de sal de iodo) atravessa a barreira hematoencefálica e alcança o estriado em relação dose-dependente. Com isso, podemos inferir que o aumento da atividade da AChE no estriado e no córtex pré-frontal deve-se à ação central de 2-PAM, que pode ter atravessado a barreira hematoencefálica e alcançado essas estruturas encefálicas. Possivelmente, o transporte de 2-PAM para o estriado acontece por meio de transporte ativo dependente de Na<sup>+</sup> (SAKURADA *et al.*, 2003).

Vale mencionar, também, que a eficácia das oximas no SNC não é uniforme para todas as estruturas encefálicas. Nossos achados vão no mesmo sentido dos resultados obtidos por Clement (1992), que confirmou a variação do grau de reativação da AChE pela HI-6, outra oxima, em algumas regiões cerebrais, ao mostrar que a HI-6 não reativou a AChE no hipocampo e reativou parcialmente no córtex (em 6%) (CLEMENT, 1992).

É possível que no nosso estudo, o tratamento com 2-PAM não se mostrou eficaz sobre a atividade da AChE especificamente no hipocampo devido às diferentes formas isoméricas da AChE globular no SNC. A AChE globular apresenta-se como uma montagem homomérica de subunidades catalíticas, que pode ser monômeros (G1), dímeros (G2) ou tetrâmeros (G4) (MASSOULIÉ *et al.*, 1993). A forma globular G4, solúvel em detergentes como o Triton X-100, é a mais abundante no tecido nervoso, apresentando-se ligada à membrana (DAS *et al.*, 2001). Das *et al.* (2001) verificaram que em ratos adultos a proporção de isoforma G4 em relação a isoforma G1 é maior no estriado e no córtex pré-frontal do que no hipocampo. Em nosso procedimento de quantificação da atividade da AChE, utilizamos o Triton X-100, de forma que a atividade das duas isoformas foi medida. Os resultados de Bajgar e colaboradores (1995) sugerem que os OF podem afetar mais a atividade da isoforma G4, assim como o tratamento com uma oxima parece reverter a atividade especificamente dessa isoforma (BAJGAR *et al.*, 1995). Essas diferenças, em conjunto, poderiam explicar porque a 2-PAM reverteu parcialmente a atividade da AChE no córtex e no estriado, mas não no hipocampo.

Além disso, é possível que o CPF tenha alterado a permeabilidade da barreira hematoencefálica, favorecendo a entrada de drogas que normalmente não seriam capazes de atravessá-la, como por exemplo, a 2-PAM. Realmente, um estudo *in*

*vitro* confirma que o CPF e seus metabólitos, principalmente o CPF-oxon, alteram a integridade da barreira hematoencefálica 24 horas após a exposição (PARRAN *et al.*, 2005). Outro OF, o paraoxon, também comprometeu a permeabilidade desta barreira em ratos jovens (de até 30 dias de vida), mesmo em doses incapazes de induzir sinais de toxicidade colinérgica (SONG *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo mostrou que a formulação intranasal de obidoxima atravessa a barreira hematoencefálica mais eficientemente do que ATR e 2-PAM (i.m.) e protege contra a neurodegeneração induzida por paraoxon em ratos (KRISHNAN *et al.*, 2016).

Por outro lado, a atividade da ChE plasmática não foi reativada após o tratamento com 2-PAM 24 horas depois da intoxicação. A ineficácia da 2-PAM pode ser explicada devido ao seu tempo de meia-vida curto (no máximo duas horas) (VOICU, *et al.*, 2010b). Além disso, o CPF, por ser um fosforotioato, é bastante lipofílico (VALE, 1998) e devido à sua estrutura química (presença de um grupo dietil ligado ao átomo de P), mantém a inibição da ChE plasmática por vários dias após a exposição (HOBBIER, 1955). Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa mostraram que a injeção única de 2-PAM 40 mg/kg uma hora após a intoxicação com CPF 30 mg/kg (i.p.) foi eficaz sobre a reativação da atividade da ChE plasmática somente até 1 hora após a administração deste antídoto (MARQUES, 2016). Esses achados, confrontados com dados da literatura, fortalecem a hipótese da administração contínua deste antídoto, com o intuito de sustentar concentrações plasmáticas adequadas para o alcance de um efeito terapêutico satisfatório no tratamento da intoxicação por OF como o CPF (VALE; MEREDITH; HEATH, 1990).

Nas intoxicações agudas por OF, a inibição das colinesterases e o conseqüente aumento de ACh disponível para ligar-se aos nAChRs causa períodos prolongados de despolarização neuromuscular, caracterizando contrações musculares incontroláveis, fraqueza muscular generalizada ou até mesmo disfunção da musculatura respiratória com subseqüente paralisia dos músculos do diafragma, levando a vítima a óbito por falência respiratória (JOKANOVIĆ; KOSANOVIĆ, 2010). Cavaliere e colaboradores (1996) verificaram que a 2-PAM em doses baixas diárias por 4 dias mostrou-se eficaz na intoxicação induzida por este OF, devido efeito mioprotetor sobre as fibras musculares do diafragma em ratos expostos ao paraoxon (CAVALIERE *et al.*, 1996). Adicionalmente, a probabilidade de reativação espontânea das colinesterases após a intoxicação por um dietilfosfato (como é o

caso do CPF) é praticamente nula caso não haja o emprego de uma oxima (VALE, 1998). Por esses fatores, as oximas devem ser empregadas no tratamento padrão da intoxicação.

Apesar das evidências indicarem que o tratamento com ATR, quando associado às oximas, apresentar um efeito sinérgico na proteção da intoxicação por OF (ASKEW, 1957), no nosso estudo a injeção concomitante de ATR e 2-PAM não exerceu nenhum efeito sobre os parâmetros avaliados. Uma possibilidade é que as injeções intraperitoneais simultâneas de ATR e 2-PAM, apesar de terem sido administradas bilateralmente, possam ter favorecido algum tipo de interação desfavorável no interior cavidade da peritoneal. Adicionalmente, a ausência de efeito sobre a reativação da AChE cerebral após a injeção de ATR+2-PAM pode ser explicado através do aparente efeito anti-inflamatório da ATR, mediado pelo bloqueio dos mAChRs (PROFITA *et al.*, 2005). Por normalmente atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seu efeito terapêutico no SNC, a ATR, possivelmente, reestabeleceu a integridade da barreira hematoencefálica, dificultando a passagem de 2-PAM através desta estrutura.

Apesar de termos confirmado a toxicidade aguda do CPF através do surgimento de sinais como ataxia, tremor, tetania, lacrimejamento, sialorreia e diarreia na primeira hora após a intoxicação e redução da atividade da ChE plasmática 24 horas após a injeção do OF, não conseguimos demonstrar a reversão dos sinais de toxicidade aguda com o tratamento padrão da intoxicação (ATR e/ou 2-PAM). Uma possível explicação para esse dado foi o emprego uma dose baixa de CPF, de maneira que os sinais de toxicidade ficaram pouco visíveis no momento da administração do tratamento. A escolha de uma dose baixa foi baseada nos resultados obtidos por Cunha (2014) que mostrou que dentre as três doses de CPF avaliadas (20, 25 e 30 mg/kg), somente a dose de 20 mg/kg induziu um efeito tipo-depressivo no TNF.

Nossos resultados também apontam para uma recuperação da atividade da ChE plasmática e da AChE no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal no 30<sup>o</sup> dia após a intoxicação aguda com CPF, em concordância com a ausência de alteração no tempo de imobilidade desses animais no TNF no mesmo período. Esses dados sugerem que as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela intoxicação aguda por CPF são transitórias.

Diferentemente dos nossos resultados, estudos evidenciam que a inibição da AChE cerebral pode ser persistente após exposição aguda a altas doses de CPF (POPE *et al.*, 1992; LÓPEZ-CRESPO *et al.*, 2007). No estudo de Pope *et al.* (1992), a AChE cortical e estriatal manteve-se inibida em 60% até seis semanas após a injeção de 250 mg/kg (s.c.). Do mesmo modo, 279 mg/kg de CPF, pela mesma via de administração, inibiu a atividade da AChE cerebral em 72% dois dias após a intoxicação, havendo recuperação parcial da atividade desta enzima no 30º dia (55% de inibição) (LÓPEZ-CRESPO *et al.*, 2007). Outro resultado diferente foi mostrado por WRIGHT *et al.*, (2010) com o DPF. A exposição aguda levou à redução acentuada da atividade colinesterásica em tecidos periféricos e no córtex frontal, hipocampo e estriado, mesmo 29 dias após a injeção s.c. única do OF. Apesar de a atividade colinesterásica no plasma apresentar-se gradativamente recuperada após a exposição ao DPF (24 horas, 8 e 29 dias depois da injeção), a inibição da atividade da AChE no hipocampo, no córtex frontal e no estriado desses animais ainda era significativa (WRIGHT *et al.*, 2010).

Em resumo, nosso estudo mostrou que a intoxicação aguda com CPF, mesmo sendo branda, foi capaz de provocar alterações comportamentais e bioquímicas que são parcialmente revertidas pela administração do tratamento padrão da intoxicação por OF.

***CONCLUSÃO***

---

## 6. CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que a exposição aguda a uma dose baixa de CPF, um OF, promoveu efeito depressivo transitório no TNF.

O possível acúmulo da ACh devido a inibição da AChE hipocampal parece relacionar-se com o aumento do tempo de imobilidade no TNF. Logo, o hipocampo parece ser a principal estrutura encefálica envolvida no aparecimento do comportamento tipo-depressivo induzido pelo CPF.

A ATR foi parcialmente eficaz em reverter o efeito depressivo do CPF após 24 horas da intoxicação. A 2-PAM reestabeleceu a atividade da AChE no córtex pré-frontal, mas não no hipocampo e no estriado 24 horas depois da intoxicação.

Este estudo sugere que mesmo a intoxicação aguda, em curto prazo, pode ocasionar prejuízo para a saúde mental de indivíduos expostos a estes agentes. Sugere também que o tratamento padrão da intoxicação empregado na clínica parece ser insuficiente para reverter todas as alterações causadas pela exposição aos OF.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 7. REFERÊNCIAS

AFZAAL, S. et al. High dose atropine in organophosphorus poisoning. **Postgraduate Medical Journal**, n. 66, p. 70–71, 1990.

ALDRIDGE, J. E. et al. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1736–1743, 2003.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/imprensa/clipping/2004/agosto/240804.pdf>> Acesso em 14 set. 2014.

ASKEW, B. M. Oximes and atropine in sarin poisoning. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 12, n. 3, p. 340–3, 1957.

BAJGAR, J; MICHALEK, H; BISSO, G.M.. Differential reactivation by HI-6 in vivo of paraoxon-inhibited rat brain acetylcholinesterase molecular forms. **Neurochem Int.** v. 26, n. 4, p. 347–50, 1995.

BAJGAR, J. et al. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7 (5), p. 461–466, 2007.

BALALI-MOOD, M.; SHARIAT, M. Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. **Journal of physiology Paris**, v. 92, n. 5-6, p. 375–378, 1998.

BARELLI, A et al. New experimental Oximes in the management of organophosphorus pesticides poisoning. **Minerva anesthesiologica**, v. 77, n. 12, p. 1197–203, 2011.

BERENDS, F. et al. The chemical basis of the 'ageing process' of DFP-inhibited pseudocholinesterase. **Biochimica et biophysica acta**. v. 34, p. 567-568, 1959.

BERTOLETE, J. M. et al. Suicide, suicide attempts and pesticides: a major hidden public health problem. **Bulletin of the world health organization**, v. 84, n. 4, p. 260, 2006.

BITAR, Y.; HOLZGRABE, U. Impurity profiling of atropine sulfate by microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 44, n. 3, p. 623–633, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAQUENIER, J. et al. Neurotoxicology and teratology anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and teratology**, v. 32, n. 2, p. 234–239, 2010.

BUCKLEY, N. A. *et al.* Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. In: **The Cochrane Library**. n. 11, CD005085, 2014.

CAVALIERE, M. J. *et al.* Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de saúde pública**, v. 30, n. 3, p. 267–272, 1996.

CENTRO TOXICOLÓGICO DO ESPÍRITO SANTO - TOXCEN. **Dados Epidemiológicos de 2012**. Secretaria de Saúde do Espírito Santo, 2014. Disponível em: <[http://www.saude.es.gov.br/download/Dia\\_1\\_A01\\_Apresentacao\\_Toxcen\\_2014\\_Epidemiologia\\_2013\\_OFICIAL\\_Modo\\_de\\_Compatibilidade.pdf](http://www.saude.es.gov.br/download/Dia_1_A01_Apresentacao_Toxcen_2014_Epidemiologia_2013_OFICIAL_Modo_de_Compatibilidade.pdf)>.

CHAMBERS, J. E.; CHAMBERS, H. W. Oxidative desulfuration of chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, and leptophos by rat brain and liver. **Journal of biochemical toxicology**, v. 4 (3), p. 201-203, 1989.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **The Biochemical journal**, v. 260, n. 3, p. 625–634, 1989.

CHEN, W. Q. *et al.* Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 355–361, 2011.

CHEN, W. Q. *et al.* Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. **Neuroscience Letters**, v. 570, p. 76–80, 2014.

CLARK, R. F. **Inseticides: Organic phosphorus compounds and carbamate**. In: Goldfrank's Toxicologic Emergencies. Edited by: Flomenbaum, N. E.; Goldfrank, L. R.; Hoffman, R. S.; Howland, M. A.; Lewin, N. A.; Nelson, L. S. McGraw-Hill, pp. 1497-1512, 2006.

CLEMENT, J. G. Central activity of acetylcholinesterase oxime reactivators. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 112, p. 104-109, 1992.

COLOVIĆ, M. B. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315–35, 2013.

CUNHA, A. F. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição ao inseticida clorpirifós sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais em animais experimentais**. 2014. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2014.

DAS, A.; DIKSHIT, M.; NATH, C. Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life sciences**, v. 68 (13), p. 1545-1555, 2001.

DAVIES, R. Chronic exposure to organophosphates: background and clinical picture. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 6, n. 3, p. 187–192, 2000.

DE BLEECKER, J. L.; DE REUCK, J. L.; WILLEMS, J. L. Neurological aspects of organophosphate poisoning. **Clinical neurology and neurosurgery**, v. 94, n. 2, p. 93–103, 1992.

DEIANA, S.; PLATT, B.; RIEDEL, G. The cholinergic system and spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 389–411, 2011.

DIETZ, A A; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid) procedure. **Clinical Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1309–1313, 1973.

DREVER, B. D.; RIEDEL, G.; PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 505–14, 2011.

DREVETS, W. C.; ZARATE, C. A; FUREY, M. L. Antidepressant effects of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine: a review. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1156–63, 2013.

EATON, D. L. *et al.* Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38 Suppl 2, p. 1–125, 2008.

EDDLESTON, M. *et al.* Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 597–607, 2008.

EDDLESTON, M. *et al.* Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **QJM**, v. 95, p. 275–283, 2002.

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D.; FRANCISCO, S. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

GERSHON S.; SHAW, F. H. Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. **Lancet**, v. 277, n. 7191, p. 1371–1374, 1961.

GUNNELL, D. *et al.* The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. **BMC Public Health**, v. 7, n. 1, p. 357, jan. 2007.

HOBBIGER, F. Effect of the nicotinhydroxamic acid methiodide on human plasma cholinesterase inhibited by organophosphates containing a dialkylphosphato group. **British Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 3, p. 356–362, 1955.

IYER, R.; IKEN, B.; LEON, A. Developments in alternative treatment for organophosphate poisoning. **Toxicology Letters**, v. 233 (2), p. 200-206, 2015.

JAGA, K.; DHARMANI, C. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. **Reviews on Environmental Health**, v. 22, n. 1, p. 57–73, 2007.

JANOWSKY, D. S. *et al.* A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. **Lancet**, v. 2, n. 7778, p. 632-635, 1972.

JANOWSKY, D. S. *et al.* Central muscarinic effects of physostigmine on mood , cardiovascular function, pituitary and adrenal neuroendocrine release. **Psychopharmacology**, v. 89, n. 2, p. 150–154, 1986.

JANOWSKY D. S., EL-YOUSEF M. K., DAVIS J. M. Antagonistic effects of physostigmine and methylphenidate in man. **American Journal of Psychiatry**, v. 130, n. 12, p. 1370–1376, 1973.

JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**, v. 166, n. 3, p. 139–60, 2001.

JOKANOVIĆ, M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 2, p. 107–15, 2009.

JOKANOVIĆ, M.; KOSANOVIĆ, M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 195–201, 2010.

JOHNSON, M. K. et al. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. **The Biochemical journal**, v. 114 (4), p. 711-717, 1969.

JOHNSON, M. K. et al. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. **Emergency Medline**, v. 12, p. 22–37, 2000.

JOUBERT, J.; JOUBERT, P. H. Chorea and psychiatric changes in organophosphate poisoning. A report of 2 further cases. **South African Medical Journal**, 74(1): 32–34, 1988.

JUDGE, S. J. et al. Mechanism for the acute effects of organophosphate pesticides on the adult 5-HT system. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 82–89, 2016.

KARADE, H. N. et al. Synthesis and in vitro evaluation of bis-quaternary 2-(hydroxyimino)-N-(pyridin-3-yl)acetamide derivatives as reactivators against sarin and VX inhibited human acetylcholinesterase (hAChE). **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 22, n. 9, p. 2684–91, 2014.

KARALLIEDDE, L.; SENANAYAKE, N. Organophosphorus insecticide poisoning. **British journal of anaesthesia**, v. 63 (5), p. 736-750, 1989.

KARASOVA, J. Z. et al. Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood-brain barrier: Influence of molecular structure. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1838–1844, 2010.

KOSE, A. et al. Cardiac damage in acute organophosphate poisoning in rats: effects of atropine and pralidoxime. **The American Journal of Emergency Medicine**, v. 27, n. 2, p. 169–75, 2009.

KRISHNAN, J. K. S. et al. Intranasal delivery of obidoxime to the brain prevents mortality and CNS damage from organophosphate poisoning. **Neurotoxicology**, v. 53, p. 64–73, 2016.

LASSITER, T. L. et al. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. **Toxicology**, v. 186, n. 3, p. 241–253, 2003.

LONDON, L. et al. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? **American Journal of Industrial Medicine**, v. 47, n. 4, p. 308–21, 2005.

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, 2009.

LÓPEZ-CRESPO, G. A *et al.* Time course of biochemical and behavioural effects of a single high dose of chlorpyrifos. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 3, p. 541–7, 2007.

MANCINELLI, A. *et al.* Cholinergic drug effects on antidepressant-induced behaviour in the forced swimming test. **European Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 199–205, 1988.

MARQUES, G. M. L. **Avaliação da eficácia de atropina e pralidoxima na intoxicação aguda por clorpirifós e validação de método de análise de organofosforados e seus antídotos por HPLC-MS.** 2016. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, 2016.

MARRS, T. C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 1, p. 51–66, 1993.

MARTINS-SILVA, C. **Avaliação neuroquímica do sistema colinérgico de camundongos com o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) modificado geneticamente.** 2008.187f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MASSOULIÉ, J. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, v. 41 (1), p. 31-91, 1993.

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.

MEZADRI, T. J. BATISTA, G. M., PORTES, A. C., J. MARINO-NETO, C. L. O. 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. E. *et al.* Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. **Toxicological sciences**. v. 20, 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. 3573–8, 2013.

MORENO, M. *et al.* Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute chlorpyrifos exposure. **Toxicology Letters**, v. 176, p. 162–167, 2008.

NAMBA, T., NOLTE, C. T., JACKREL, J. G. D. Poisoning due to organophosphate insecticides: Acute and chronic Manifestations. **The American Journal of Medicine**, v. 50, n. 4, p. 475–92, 1971.

PABLO, F. *et al.* Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos--laboratory versus a coastal mesocosm system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 219–29, 2008.

PARRAN, D. K. *et al.* Chlorpyrifos alters functional integrity and structure of an in vitro BBB model: Co-cultures of bovine endothelial cells and neonatal rat astrocytes. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 1, p. 77–88, 2005.

PARSONS, S. M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 15, p. 2423–34, 2000.

PIRES, R. G. *et al.* The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 70, n. 2–3, p. 227–35, 2001.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical papers of The Medical Faculty of the University Palacky**, v.155 (3), p. 2219-229, 2011.

POPE, C. N. *et al.* Comparison of in vivo cholinesterase inhibition in neonatal and adult rats by three organophosphorothioate insecticides. **Toxicology**, v. 68, n. 1, p. 51–61, 1991.

POPE, C. N. *et al.*, Long-term neurochemical and behavioral effects induced by chlorpyrifos treatment. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 42 (2), p. 251-256, 1992.

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, 1978.

PROFITA, M. *et al.* Muscarinic receptors, leukotriene B4 and neutrophilic inflammation in COPD patients. **Allergy**, v. 60 (11), p. 1361-1369, 2005.

RAMI, A. *et al.* Differential effects of scopolamine on neuronal survival in ischemia and glutamate neurotoxicity: relationships to the excessive vulnerability of the dorsoseptal hippocampus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 13, n. 3, p. 201–208, 1997.

RAMOS, Z. R. *et al.* Influence of malathion on acetylcholinesterase activity in rats submitted to a forced swimming test. **Neurotoxicology Research**, v. 9, n. 4, p. 285–290, 2006.

ROHLMAN *et al.* Neurobehavioral performance of adult and adolescent agricultural workers. **Neurotoxicology**, v.28 (2), p. 374-380, 2007.

SAKURADA, K. *et al.* Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 9, p. 1401–1407, 2003.

SALAZAR, V. C. R. **Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s)**. 2011.187f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) –Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises

Toxicológicas Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2011.

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. 285–92, 2001.

SINGLETON, S. T. *et al.* Longitudinal assessment of occupational exposures to the organophosphorous insecticides chlorpyrifos and profenofos in Egyptian cotton field workers. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 218, n. 2, p. 203–211, 2015.

SLOTKIN, T. A. *et al.* Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, p. 433–439, 2008.

SONG, X. *et al.* Interactive effects of paraoxon and pyridostigmine on blood-brain barrier integrity and cholinergic toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 78, n. 2, p. 241–247, 2004.

STALLONES, L.; BESELER, C. L. Assessing the connection between organophosphate pesticide poisoning and mental health: A comparison of neuropsychological symptoms from clinical observations, animal models and epidemiological studies. **Cortex**, v. 74, p. 405–16, 2016.

STEENLAND, K. *et al.* Neurologic function among termiticide applicators exposed to chlorpyrifos. **Environmental Health Perspectives**, 108(4): 293–300, 2000.

STEPHENS, R. *et al.* Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. **Lancet**, v. 345, n. 8958, p. 1135–9, 1995.

TAIT, S. *et al.* Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 1, p. 112–6, 2009.

TECLES, F.; CERÓN, J. J. Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 3, p. 233–8, 2001.

TERRY, A. V. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 3, p. 355–365, 2012.

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

VALE, J.; MEREDITH, T.; HEATH, A. High dose atropine in organophosphorus poisoning. **Postgraduate Medical Journal**, v. 66, n. 780, p. 878, 1990.

VAN DER ZEE, E. A.; LUITEN, P. G. M. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: A review of immunocytochemical localization. **Progress in neurobiology**, v. 58 (5), p. 409-471, 1999.

VOICU, V. A.; BAJGAR, J.; *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of some oximes and associated therapeutic consequences: A critical review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 719–729, 2010b.

VOICU, V. A.; THIERMANN, H.; *et al.* The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: Biological consequences. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, n. 2, p. 73–85, 2010.

WITKIN, J. M. *et al.* M1 and M2 Muscarinic receptor subtypes regulate antidepressant-like effects of the rapidly acting antidepressant scopolamine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n. November, p. 448–456, 2014.

WOREK, F. *et al.* Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. **Biochemical pharmacology**, v. 73, n. 2007, p. 1807–1817, 2007.

WOREK, F. *et al.* Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. **Archives of Toxicology**, v. 70, n. 8, p. 497–503, 1996.

WRIGHT, L. K. *et al.* Behavioral sequelae following acute diisopropylfluorophosphate intoxication in rats: comparative effects of atropine and cannabinomimetics. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 3, p. 329–35, 2010.

YANG, P. Y. *et al.* Carbofuran-induced delayed neuropathy. **Journal of Toxicology. Clinical Toxicology**, v. 38 (1), p. 43-46, 2000.

ZHANG, X. *et al.* Pesticide poisoning and neurobehavioral function among farm workers in Jiangsu, people's Republic of China. **Cortex**, v.74, p. 396-404, 2016.

***ANEXOS***

---

## 8. ANEXOS

### 8.1 ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **047/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito do tratamento padrão com atropina e pralidoxima na intoxicação aguda por clorpirifós em ratos expostos a modelos animais de ansiedade e depressão.**" que tem como responsável o (a) docente **Vanessa Beijamini Harres**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/11/14.

  
Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA / UFES

Vitória (ES), 07 de novembro de 2014.