

FABRÍCIO LUIZ ASSINI

A ADMINISTRAÇÃO AGUDA/REPETIDA DE MALATION AFETA MODELOS
ANIMAIS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi

FLORIANÓPOLIS –SC

FEVEREIRO-2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai Criador, pela vida e a confiança N'Ele que me deram a certeza de que os momentos difíceis passariam.

A meus pais, Emílio e Nida, primeiros mestres de minha vida, pela formação moral e sólida base emocional e afetiva que me sustentam e guiam. Por haverem me ensinado que o importante é ter a consciência tranqüila.

A Mariah e Cristina, que foram a fonte de alegria, relaxamento e prazer nestes dois anos. Muito obrigado por tudo. Marí, um dia tu vai entender como nossas “brincadas” foram importantes pro Pai nestes anos. Cris, tu já sabe...

Ao prof. Reinaldo, pela oportunidade de voltar a pesquisa exatamente no projeto do Malation e mais que isso, pela paciência e por ter me ensinado a trabalhar de forma profissional sempre buscando fazer melhor.

A Prof. Ana Lúcia pela maneira prestativa com que me recebeu quando a procurei no final do ano passado.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pela experiência em ensinar que contribuíram para minha formação. Em especial ao professor Dr André Ramos pela conversa em momentos complicados.

Aos professores doutores Jorge Flório, Ana Lúcia Severo Rodrigues e Anicleto Poli, por terem gentilmente aceito o convite para participarem da banca examinadora deste dissertação

Aos alunos do projeto malation, Pablo, Patrícia, Kênia e Flávia, pelo companheirismo e amizade que guiaram nossos experimentos.

Aos colegas de laboratório, Leandro, Luciano, George, Rui, Pamplona por havermos conseguido manter um clima cordial e até fraterno entre nós.

Aos amigos de dentro e de fora “da pesquisa” os quais eram solicitados quando as coisas apertavam: Carol e Michel, Leandro, Luciano, Luis Gustavo (Jakaré), Marcelo, Cristina (muitas vezes) e minha irmã Luciana.

Aos alunos da turma de mestrado: Geison, Marcelo, Rafael, Maria, Elizângela, Gisele e Cláudia.

Aos funcionários do biotério, Ione (pelos animais os quais eu pedia “pra ontem” e eram me entregue “hoje”) e Pedro (pelos inúmeros sacos de serragem disponibilizados quando “não tinha”).

Às secretárias, Gorete, Diana, Rita pelo carinho e disposição que sempre me atenderam.

A Dona Nadir pelo sorriso e espírito leve com que recebe a todos nos corredores do Departamento.

Aos alunos de outros laboratórios, em especial aqueles dos Professores Doutores Thereza, Gina e Pádua, muito obrigado pelos objetos emprestados e as muitas conversas destes anos.

Aos jogadores do Time da Farmaco!

A PSPPG-FUNCITEC/CNPq pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa concedida.

Índice

RESUMO	II
ABSTRACT	IV
LISTA DE ABREVIACÕES	V
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS:.....	15
ANIMAIS.....	15
DROGAS E REAGENTES.....	15
PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	16
TESTE DO CAMPO ABERTO (CA).....	17
TEMPERATURA.....	17
ESQUIVA INIBITÓRIA.....	18
TESTE DA FORMALINA.....	18
TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE).....	19
TESTE DO NADO FORÇADO (TNF).....	19
DOSAGEM DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
RESULTADOS	22
EXPERIMENTOS COM ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE MALATION.....	22
<i>Teste do Campo Aberto</i>	22
<i>Avaliação da Temperatura</i>	23
<i>Teste da esQUIVA inibitória</i>	24
<i>Teste da Formalina</i>	25
<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	26
<i>Teste do Nado Forçado</i>	28
<i>Dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral</i>	29
EXPERIMENTOS COM ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE MALATION POR 7 DIAS.....	30
<i>Teste do Campo Aberto</i>	30
<i>Avaliação da Temperatura</i>	31
<i>Teste da EsQUIVA Inibitória</i>	32
<i>Teste da Formalina</i>	33
<i>Teste do Labirinto em Cruz Elevado</i>	33
<i>Teste do nado forçado</i>	36
<i>Dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral</i>	37
EXPERIMENTOS AVALIANDO A AÇÃO DO ANTIDEPRESSIVO IMIPRAMINA NO AUMENTO DE IMOBILIDADE INDUZIDO PELO MALATION NO TNF.....	37
DISCUSSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	67

Resumo

Os praguicidas organofosforados (OF), entre eles o malation, são responsáveis por grande parte das intoxicações relatadas anualmente no Brasil. Além dos sintomas da intoxicação colinérgica clássica, a exposição a OF induz uma síndrome neurocomportamental associada a prejuízos cognitivos e afetivos, que não necessariamente estão relacionados à inibição da atividade da enzima AChE.

O objetivo deste trabalho foi o de investigar os efeitos da administração aguda/repetida com o OF malation sobre modelos experimentais relacionados à emocionalidade (ansiedade e depressão) bem como, processos cognitivos (aprendizado/memória) e, sensibilidade dolorosa. Para isso, inicialmente foram descartados possíveis efeitos depressores gerais nas doses que viriam a ser testadas.

O tratamento agudo (50; 100 e 250 mg/kg) e repetido (25; 50 e 100 mg/kg) com malation em ratas induziu efeito tipo-depressivo e ansiogênico em doses que não alteraram a atividade locomotora tampouco a temperatura corporal. Observamos também efeito antinociceptivo na segunda fase do teste da formalina nos animais administrados agudamente com malation 50 mg/kg. No teste da esQUIVA inibitória, não foram observados efeitos significativos na aquisição da esQUIVA inibitória nos animais administrados agudamente, porém todas as doses da administração repetida (25; 50 e 100 mg/kg) prejudicaram o aprendizado. Como protocolo adicional, o tratamento com imipramina (15 mg/kg i.p. 24, 5 e 1 hora antes do teste) foi capaz de reverter os efeitos tipo-depressivo induzido pelo malation 100 mg/kg (agudo) e 25 mg/kg (repetido)

avaliados no teste do nado forçado, sem alteração na atividade locomotora.

Todas as doses testadas inibiram atividade da AChE cerebral.

Em conclusão, este trabalho descreve pela primeira vez os efeitos depressivos induzidos pelo malation no TNF bem como a reversão destes efeitos pelo tratamento com imipramina. Fatos que associados aos efeitos ansiogênicos observados nos animais administrados aguda ou repetidamente com malation, servem de alerta para as populações expostas a este OF quanto as possíveis alterações emocionais até então pouco descritas.

Apoio Financeiro: FUNCITEC, CNPq

Abstract

Organophosphorus (OP) compounds such as malathion are environmental contaminants that may evoke neurobehavioral responses including cognitive impairment, anxiety and depression. In this study, after a functional observational battery, rats were tested in an open field and temperature test to better define doses used in subsequent experiments. Then, we investigated the effects of acute and repeated treatment with malathion on formalin test, inhibitory avoidance, elevated plus-maze and forced-swim test, which are validated animal models for pain-, memory-, anxiety-, depressive-related behaviors, respectively. We found that both acute and repeated malathion administration induced anxiogenic and depressive-like responses at doses that did not affect neither locomotion nor systemic temperature. In addition, analgesic effect on late phase of formalin test was observed in rats treated with 50 mg/kg of malation. Moreover, significant effects were observed in inhibitory avoidance task in repeated groups but not in acutely treated animals. In a further protocol, we have shown imipramine's reversion of malathion induced depressive-like behavior. Biochemical assays demonstrated inhibition of cholinesterase activity by these effective doses.

In conclusion, this study was the first to show depressive-like behavior induced by acute/repeated administration of OP and the blockade of this effect by imipramine treatment. These findings may contribute on the search for early characterization of OP poisoning and treatment of its neurobehavioral syndrome.

Lista de abreviações

a.C.	Antes de Cristo
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
BchE	Enzima Butirilcolinesterase
BHC	Hexaclorocicloexano
CA	Campo aberto
ChE	Enzima Colinesterase
CIT	Centro de Informações Toxicológicas
d.C.	Depois de Cristo
DFP	Diisopropil fluorofosfato
DL ₅₀	Dose letal em 50% dos animais
i.p.	Intra peritoneal
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
OF	Organofosforado
SC	Santa Catarina
TEPP	Tetraetilpirofosfato
TNF	Teste do nado forçado

Lista de Figuras

Figura 1. Efeitos da administração aguda com malation (50; 250 e 500 mg/kg i.p.) sobre parâmetros locomotores avaliados no campo aberto 30 minutos após a injeção.

Figura 2. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) administrado 30 minutos antes do treino sobre a latência no treino e teste avaliados no teste da esQUIVA inibitória.

Figura 3. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) avaliados na primeira e segunda fase do teste da formalina 30 minutos após a injeção.

Figura 4. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado 30 minutos após a injeção.

Figura 5. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre o tempo de imobilidade avaliados no teste do nado forçado 30 minutos após a injeção.

Figura 6. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre parâmetros locomotores avaliados no campo aberto 30 minutos após a sétima injeção.

Figura 7. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre a latência no treino e teste avaliados no teste da esQUIVA inibitória.

Figura 8. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) avaliados na primeira e segunda fase do teste da formalina 30 minutos após a sétima injeção.

Figura 9. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado 30 minutos após a sétima injeção.

Figura 10. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre o tempo de imobilidade avaliados no teste do nado forçado 30 minutos após a sétima injeção.

Figura 11. Efeito do tratamento com o antidepressivo imipramina (15 mg/kg i.p.) sobre a administração aguda com malation (100 mg/kg i.p.) administrado 30 minutos antes do teste do nado forçado.

Figura 12. Efeito do tratamento com o antidepressivo imipramina (15 mg/kg i.p.) sobre a administração repetida por 7 dias com malation (25 mg/kg i.p.) no teste do nado forçado realizado 30 minutos após a sétima injeção.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeitos da administração aguda com malation (50; 250 e 500 mg/kg i.p.) sobre a temperatura retal de ratas avaliada 30 minutos após a injeção.

Tabela 2. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado 30 minutos após a injeção.

Tabela 3. Efeitos da administração aguda com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre a atividade da enzima AChE cerebral de ratas 24 horas após a injeção.

Tabela 4. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre a temperatura retal de ratas avaliada 30 minutos após a sétima injeção.

Tabela 5. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado 30 minutos após a sétima injeção.

Tabela 6. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre a atividade da enzima AChE cerebral de ratas 24 horas após a sétima injeção.

Tabela 7. Efeitos do tratamento com imipramina (15 mg/kg i.p.) sobre a administração aguda (100 mg/kg i.p.) ou repetida (25 mg/kg i.p.) com malation em parâmetros avaliados no teste do campo aberto 30 minutos após a injeção de malation.

Introdução

Dentre os argumentos utilizados por aqueles que estimulam o uso de defensivos agrícolas, o crescimento da população mundial e a conseqüente necessidade de aumento da produção para suprir a demanda alimentar, servem de pretexto para justificar o incentivo a esta prática. Entretanto, quando constatamos o desperdício nas centrais de abastecimento bem como o alto número de pessoas obesas nas classes mais abastadas da população, podemos concluir que interesses financeiros vem sendo colocados a frente da saúde da população mundial. Já que, como veremos adiante, intoxicações por inseticidas têm se tornado um problema de saúde pública em nossa sociedade.

O termo “agrotóxicos” é definido pela Lei Federal n.º 7 802, regulamentada pelo Decreto n.o 98 816, no seu artigo 2, inciso I da seguinte forma:

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

Estas substâncias podem ser classificadas quanto à praga que combatem em: inseticidas, herbicidas, fungicidas, raticidas, nematocidas,

acaricidas e molusquicidas. Ou quanto ao seu poder tóxico, variando entre os extremamente tóxicos (Classe I - faixa vermelha) até os pouco tóxicos (Classe IV – faixa verde) (OMS 1996)

O emprego de produtos químicos inorgânicos para o controle de pragas remonta às civilizações greco-romanas antigas. O conhecimento de que o enxofre evitava doenças e combatia insetos antecede a 1000 a.C., tendo seu emprego como fumegante mencionado por Homero. O uso do arsênico como inseticida foi recomendado por Plínio (23-79 d.C.) e, posteriormente pelos chineses no século XVI. No século XVII a nicotina, na forma de um extrato de tabaco, foi o primeiro inseticida de ocorrência natural a ser utilizado (Cremllyn, 1991).

Quanto aos compostos anticolinesterásicos, em 1820, Lassaigne estudou reações do álcool com o ácido fosfórico e, em 1854, Clermont sintetizou o tetraetilpirofosfato (TEPP) sem conhecimento de suas propriedades inseticidas. Pouco antes da Segunda Guerra Mundial, Schrader desenvolveu uma série de compostos, entre eles o tabun e o sarin, empregados como gases de guerra (Karczmar, 1998).

Zanin e colaboradores (1992), sugerem que o primeiro agrotóxico utilizado no Brasil tenha sido o hexaclorocicloexano (BHC), empregado no extermínio de gafanhotos em dezembro de 1946 na cidade de Caçador-SC, e posteriormente no combate à broca do café e em misturas contra pragas nas lavouras de algodão.

Todavia, a expansão do seu uso ocorreu na década de 60, acompanhando o processo de modificação da estrutura agrária, com a penetração do capitalismo no campo através da introdução de máquinas e

insumos agrícolas. Nos anos 70 com a implantação dos Planos Nacionais de Desenvolvimento Agrícola e de Fertilizantes e Calcário, o Banco do Brasil concedia financiamentos agrícolas com 15% do crédito atrelado à “aplicação de tecnologia moderna”, dando início a um novo modelo agrícola baseado no uso intensivo de agrotóxicos e na total dependência tecnológica de multinacionais fornecedoras de insumos e sementes (Zanin et al., 1992).

As conseqüências do uso estimulado de agrotóxicos refletem-se nos índices de intoxicações induzidas por estas substâncias, seja no campo ou em áreas urbanas. No Brasil, segundo estatísticas do Ministério da Saúde (SINITOX/FIOCRUZ), no ano de 2001 foram registrados aproximadamente 8 mil casos de intoxicação por agrotóxicos de uso rural e doméstico. Na região Sul estão 31% destes casos, sendo que em Santa Catarina encontram-se 7% do total nacional de intoxicações por agrotóxicos no referido ano.

Em um estudo detalhado da realidade das intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina, Grandó (1998) analisou 1024 prontuários de pacientes atendidos pelo Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina – CIT/SC, no período de 01 de janeiro de 1994 a 31 de dezembro de 1996, com o diagnóstico de intoxicação exógena por agrotóxicos. Os inseticidas foram à classe de uso majoritariamente implicada nas intoxicações, e o grupo químico – inibidores das colinesterases – o mais envolvido. Em 90,7% dos casos a exposição foi aguda e a circunstância não intencional dos acidentes representou 67,8% dos casos. A letalidade foi de 3,1% e as classes toxicológicas de grau I e II foram responsáveis por 68,8% dos óbitos.

Entre os inibidores da colinesterase, os compostos organofosforados (OF) apresentam toxicidade extremamente variável e são representados pelos

fosfatos (O, O – P = O (O)); pelos fosforotionatos (O, O-P=S (O)); pelos fosforotiolatos (O, O-P=O (S)); pelos fosforoditioatos (O, O-P=S (S)); pelos fosforamidatos (O, O-P=O (NHR)); pelos fosforamidotioatos (O, O-P=S (NHR)) e pelos fosfonatos (O, R-P=O (O)). Os fosforationatos e os fosforotiolatos são comumente designados em um mesmo grupo, os fosforotioatos (Henao e Corey, 1991).

Estes compostos são absorvidos pelo organismo humano por via dérmica, respiratória, digestiva. A absorção por via oral assume importância nas intoxicações acidentais, sobretudo em crianças, e no adulto através do manuseio inadequado dos instrumentos de aplicação, no hábito de fumar ou comer durante o trabalho de aplicação ou preparo do produto, no consumo de alimentos contaminados, e nas intoxicações intencionais (homicídios e suicídios) (Larini , 1996).

Após absorvidos os OF agirão principalmente sobre os dois tipos de enzimas colinesterase (ChE), são elas:

- colinesterase eritrocitária, específica, verdadeira ou acetilcolinesterase (AChE), encontrada principalmente nas sinapses dos sistema nervoso central e periférico parassimpático, junção neuromuscular e eritrócitos;
- butirilcolinesterase, colinesterase plasmática, inespecífica ou pseudocolinesterase (BChE), encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração em outros tecidos.

Estas enzimas têm a capacidade de hidrolisar rapidamente a acetilcolina - terminando seu efeito na sinapse – e voltar ao estado de enzima ativa. A acetilcolina se liga na hidroxila do resíduo serina no centro ativo da ChE para formar uma enzima intermediária (Taylor, 1996). A quebra deste

intermediário regenera a enzima ativa e no processo hidrolisa a acetilcolina.

O mecanismo de ação molecular dos OF é bastante parecido ao da acetilcolina, ou seja, a fosforilação do resíduo serina formando um intermediário OF-ChE. A diferença está na maior estabilidade da enzima fosforilada e menor taxa de hidrólise e regeneração para a forma de enzima ativa. Para algumas enzimas fosforiladas, a taxa de regeneração é tão baixa que a ChE fosforilada torna-se inativa (Taylor, 1996).

Deve-se ressaltar que enquanto a AChE é bastante específica para a ACh, a BChE não está especialmente associada às sinapses colinérgicas e tem uma especificidade de substratos mais ampla. A BchE hidrolisa a butirilcolina mais rapidamente do que a acetilcolina, bem como outros ésteres, como a benzoilcolina, a procaína, o suxametônio e a proponidida (Chattonet e Lockridge, 1989).

A exacerbação dos efeitos da acetilcolina na fenda sináptica é a hipótese mais plausível para a sintomatologia da intoxicação aguda por OF, a qual é dividida em 3 fases: a colinérgica inicial, a síndrome intermediária e a polineuropatia tardia (Karczmar, 1998).

Na fase colinérgica inicial, o acúmulo de acetilcolina nas sinapses muscarínicas leva a um aumento nas secreções (muco dos brônquios, salivação, suor e lágrimas), broncoconstrição, bradicardia, vômitos e aumento da motilidade intestinal; além de miose que resulta em visão borrada. Os efeitos do aumento de acetilcolina na sinapse nicotínica causam fasciculações e paralisia musculares devido ao bloqueio da despolarização. O bloqueio da AChE no cérebro causa cefaléia, insônia, confusão e tontura. Pode haver a incidência de morte nesta fase principalmente devido aos efeitos sobre os

sistemas cardiovascular, respiratório e nervoso central. A fase colinérgica inicial geralmente dura entre 24-48 horas e é considerada uma emergência médica que requer cuidados na Unidade de Terapia Intensiva (Karalliedde e Senanayake, 1989).

A síndrome intermediária é caracterizada por fraqueza dos músculos respiratórios e paralisia dos nervos cranianos. A dificuldade respiratória característica desta fase é causada pela fraqueza muscular do diafragma e outros músculos acessórios a respiração, que se não tratada pode levar à morte por falência respiratória. A síndrome intermediária manifesta-se de 1 e 4 dias após a intoxicação aguda, todavia se tomados os cuidados ventilatórios adequados os sintomas desaparecem num período de 4-21 dias (Senanayake e Karalliedde, 1987).

A polineuropatia tardia geralmente é evidenciada 14-28 dias após a exposição ao OF e não esta associada a mortes, mas sim a fraqueza dos músculos periféricos. Johnson (1969) demonstrou que a fosforilação da enzima “esterase alvo da neuropatia” (NTE) no tecido nervoso seria a responsável por esta disfunção. A NTE é uma enzima de membrana com alta atividade catalítica, porém de função fisiológica desconhecida. Sua atividade catalítica é dispensável em neurônios saudáveis, entretanto modificações na estrutura desta enzima iniciam a polineuropatia de forma irreversível.

Considerando-se o mecanismo de ação dos OF, historicamente a mensuração da atividade da colinesterase eritrocitária (AChE) e plasmática (BchE) tem sido utilizada como medida da exposição a OF, com a AChE sangüínea sendo correlacionada aos níveis da atividade desta enzima no cérebro (Cocker et al., 2002). Entretanto, quando utilizado como marcador da

população em geral os dados devem ser analisados com cuidado, uma vez que variações interindividuais como polimorfismos genéticos, idade dos pacientes e medicamentos podem alterar a análise dos dados (Costa, 1998).

Apesar da inibição destas enzimas e a exposição a OF ser bem caracterizada, a correlação entre a redução da atividade das colinesterases e comportamentos afetados ainda é menos compreendida. Enquanto alguns estudos mostram a existência desta correlação (Padilla, 1995), em outros as alterações comportamentais tem sido detectadas sem a inibição da colinesterase (Costa, 1998).

Provavelmente, a ubiqüidade das vias colinérgicas cerebrais fazem com que uma série de outros neurotransmissores sejam afetados quando do aumento desta transmissão. Entre as características comuns a pessoas intoxicadas aguda ou cronicamente por OF, o aparecimento de alterações em comportamentos relacionados a cognição e emocionalidade podem ser detectadas muito tempo após a exposição aguda por OF. Rosenstock e colaboradores (1991) demonstraram que 2 anos após a intoxicação, o grupo intoxicado ainda apresentava resultados piores que o controle em 5 dos seis testes neuropsicológicos realizados, entre eles os de atenção visual e verbal, memória visual, resolução de problemas e habilidades manuais.

Um estudo bastante semelhante (Reidy et al., 1992), mostrou que no mesmo intervalo de tempo entre a exposição e os testes comportamentais, os parâmetros citados acima também foram alterados em trabalhadores expostos agudamente a OF, sendo que a presença de distúrbios emocionais foi significativamente maior nos grupos expostos quando comparados aos indivíduos controle.

Posteriormente, Steenland e colaboradores (1994), ao avaliarem 128 homens intoxicados por OF na Califórnia entre 1982 e 1990, demonstraram as mesmas alterações cognitivas e de humor dos outros dois trabalhos citados acima. Além disso estes autores evidenciaram que a restrição do grupo experimental a indivíduos com inibição da colinesterase detectada (N=83), ou necessidade de hospitalização no momento da intoxicação (N=36), revela outros sinais de toxicidade como a perda da sensibilidade nas extremidades do corpo, neste caso, os dedos das mãos e dos pés.

Um acompanhamento temporal da intoxicação aguda pelo OF diazinona foi publicado recentemente (Dahlgren et al., 2004). Neste caso uma família de 7 pessoas foi exposta ao OF por 2 dias após um erro da empresa de dedetização. Diferente dos sintomas agudos (náuseas, vômitos, cefaléia e irritação cutânea) que desapareceram, os sintomas psicológicos como irritabilidade, alterações de humor, prejuízos de concentração e memória foram detectados com intensidade variável em todos os membros da família tanto agudamente quanto 3 meses e ainda 3 anos após o incidente.

Tão preocupante quanto a exposição aguda, a intoxicação crônica ou ocupacional por OF ocorre de forma silenciosa e sua evolução geralmente passa despercebida, isto é, sem a presença dos sinais clássicos da crise colinérgica aguda.

A presença de depressão, ansiedade e prejuízos de memória em pessoas expostas cronicamente à OF vem sendo destacada há bastante tempo. Levin e Rodnitzky (1976), já relatavam estes sintomas mesmo na ausência de inibição significativa da colinesterase dos indivíduos estudados.

Mais recentemente um estudo epidemiológico avaliando 251 casos de

suicídio, demonstrou uma relação positiva entre os casos estudados e áreas agrícolas, bem como a respectiva população de risco, ou seja, os agricultores expostos cronicamente a pesticidas (Parrón et al., 1996). O relato de outros pesquisadores acerca de sintomas depressivos em agricultores expostos a OF (Stallones e Beseler, 2002), dá ênfase ao papel dos agrotóxicos na estreita relação entre suicídio e depressão (Isacson et al., 1994).

No Brasil, um estudo com 1.282 agricultores relatou a prevalência de transtornos psiquiátricos menores em 37,5% destes (Faria et al., 1999), todavia a falta de um grupo controle e de delimitação quanto ao tipo de agrotóxico utilizado impossibilitam maiores comparações. Outro estudo avaliou 37 trabalhadores de plantações de fumo no Rio Grande do Sul, tanto imediatamente quanto 3 meses após o período de aplicação dos OF em suas lavouras. Em nenhum dos momentos avaliados a atividade da acetilcolinesterase plasmática apresentou-se alterada, entretanto foram detectados sintomas extrapiramidais e alterações psiquiátricas, isto é, depressão e ansiedade, em mais da metade dos casos estudados (Salvi et al., 2003).

Confirmando estes dados, Nava et al.(1999) descrevem atividade normal da acetilcolinesterase em pacientes expostos a OF que também apresentaram alterações psicomotoras, déficits de atenção e memória, além de outros sintomas psiquiátricos. Diferente dos trabalhos mencionados anteriormente, Farahat et al., 2003, descreve as mesmas alterações cognitivas e psicológicas, porém com alteração significativa nos níveis de colinesterase das populações expostas comparadas às controle.

Por outro lado, nem todos os trabalhos mostram prejuízos em

populações expostas cronicamente a OF. London et al. (1997), não detectaram alterações neurocomportamentais em 231 aplicadores de pesticidas comparados a 115 controles. Todavia os autores relatam a presença de fatores que podem haver prejudicado seus resultados, como a má classificação da exposição e o alcoolismo de alguns dos entrevistados.

A presença de fatores que não podem ser controlados pelos experimentadores diminui a credibilidade destes relatos de exposição aguda e/ou ocupacional aos OF, a medida que muitas vezes as circunstâncias exatas desta exposição são desconhecidas (duração, via e severidade da intoxicação), e ainda a variabilidade cultural entre as diversas etnias pesquisadas impossibilita uma comparação direta. Além disso, é válido mencionar que freqüentemente o diagnóstico dos efeitos tóxicos de pesticidas é dificultado pelo fato de que a característica do envenenamento agudo é a ocorrência de morte.

O uso de modelos animais para avaliar os efeitos neurotóxicos constitui a alternativa para contornar as dificuldades e os problemas encontrados na avaliação comportamental de envenenamentos por OF em humanos.

Além de afetar aspectos da função motora (Mandhane e Chopde, 1995; Nostrandt et al., 1997) e temperatura (Takahashi et al., 1990, 1991; Gordon, 1994) sabe-se que os OF podem melhorar, prejudicar ou não alterar processos de aprendizado e memória avaliados em animais de laboratório e detalhados nos parágrafos seguintes.

Braida et al. (1996), mostraram que o inibidor da colinesterase, heptilfisostigmina, foi capaz de antagonizar os efeitos amnésicos da escopolamina em ratos testados no labirinto radial de oito braços. Por outro

lado, Llorens e colaboradores (1993) estudaram os efeitos comportamentais da exposição repetida por 30 dias com disulfoton, nos testes do labirinto aquático de Morris e na esQUIVA passiva. Neste trabalho a retenção da esQUIVA passiva e a aquisição no labirinto aquático não foram alterados pela exposição ao OF.

Resultados contrários aos apresentados no parágrafo anterior, são descritos por Bushnell et al. (1994) que demonstraram prejuízos na memória espacial e em testes de discriminação visual em ratos tratados repetidamente com o OF, clorpirifos. Nesta mesma linha, Prendergast et al. (1997) observaram déficits em parâmetros de memória espacial até 21 dias após o término da administração repetida com o OF DFP. É interessante notar que a atividade da AChE havia retornado aos níveis do grupo controle 21 dias após o final do tratamento.

Além dos trabalhos mencionados acima, vários outros estudam os efeitos da administração aguda/repetida de OF em modelos animais de aprendizado/memória, seja em ratos (Ivens et al., 1998; McDonnald et al., 1988), camundongos (Reiter et al., 1973) ou ainda macacos (Prendergast et al., 1998). Poucos destes estudos utilizam modelos animais de memória que envolvam aprendizado associado ao estresse.

Comportamentos emocionais, embora descritos por vários estudos clínicos relativos à intoxicação por OF, são menos estudados do que aqueles relacionados a cognição. Diferente do relatado em humanos, um dos primeiros trabalhos acerca dos efeitos da exposição crônica de OF em ratos testados no labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal validado para o estudo da ansiedade, mostrou aumento no tempo de permanência nos braços abertos

(considerado efeito tipo-ansiolítico) na maior dose testada (Shulz et al., 1990). Já o efeito do tratamento agudo com dois outros organofosforados, clorpirifos (Sánchez-Amate et al., 2001) e soman (Baille et al., 2001) mostrou efeito tipo-ansio gênico caracterizado no LCE e a redução significativa na atividade da enzima AChE cerebral. Em estudo subsequente, Sánchez-Amate e colaboradores (2002) demonstraram as propriedades ansio gênicas do clorpirifos em outro teste relacionado à ansiedade, o teste da discriminação de drogas. Neste trabalho os autores demonstram que o OF possui os mesmos estímulos discriminativos de outra droga sabidamente ansio gênica, o pentilenotetrazol.

A busca por trabalhos relacionados aos efeitos de OF sobre modelos experimentais de depressão, demonstrou a escassez de trabalhos acerca deste tema na literatura corrente, apesar das evidências da presença de receptores colinérgicos em áreas relacionadas a depressão (Berger-Sweeney et al., 2001), como o hipocampo e o córtex por exemplo. E ainda, apesar das alterações cognitivas e psicológicas serem relatadas de forma concomitante em indivíduos expostos a OF, não existem trabalhos que comparam os efeitos de doses específicas de OF sobre mais de um comportamento relacionado à emocionalidade em animais, impossibilitando o conhecimento da faixa de dose efetiva em diferentes comportamentos.

Além disso para alguns OF, entre eles o malation é bastante escassa a literatura relacionando seus efeitos comportamentais em animais, possivelmente devido a sua classificação como OF pouco tóxico e a crença de sua baixa toxicidade em mamíferos (Taylor, 1996), características que não impedem que este OF esteja entre os maiores causadores de intoxicações em

nosso estado (Grando, 1998).

O malation, ester dietil (dimetoxifosfinotiol), é utilizado nas áreas rurais e urbanas em uma grande variedade de situações, desde a erradicação de insetos e formigas (Brenner,1992) até o combate a piolhos (Meinking et al., 2004). A DL₅₀ aguda do malation administrado por via oral em ratos varia entre 1500 e 2000 mg/kg (U.S. EPA, 2000).

Estudos com animais e humanos mostram que o malation após absorvido, é oxidado no fígado por enzimas do citocromo P-450, em pequenas quantidades para malaaxon, o qual é responsável pela inibição da ChE (U.S.EPA,2000). Tanto o malation quanto o malaaxon são rapidamente detoxificados por carboxiesterases até derivados mono e di-ácidos, que são excretados principalmente na urina; ainda, estes ácidos podem ser convertidos metabolicamente para derivados fosfóricos, e também excretados na urina (U.S.EPA, 2000).

Os efeitos da intoxicação aguda em populações expostas ao malation são semelhantes aqueles descritos previamente para os organofosforados, com dificuldade respiratória (Choi et al., 1998), distúrbios gastrointestinais (Rivett e Potgieter, 1987) e cardiovasculares (Dive et al., 1994). Além dos efeitos clássicos da fase inicial da intoxicação colinérgica, outros trabalhos descrevem o aparecimento da síndrome intermediária após a intoxicação por malation (Benslama et al., 1998;Sudakin et al., 2000).

Quanto a classificação temporal das intoxicações por OF, Kemple (2001) refere-se à exposição aguda como aquela que ocorre uma ou duas vezes no período de uma semana ou menos. A exposição crônica é aquela que ocorre por espaço de tempo superior a 10% do tempo médio de vida daquela espécie.

Por sua vez, a exposição repetida compreenderia aquela que ocorresse por um período entre 7 dias e 10% da vida média.

Sabendo-se que as intoxicações agudas e repetidas são as responsáveis por grande parcela dos casos registrados anualmente em nosso país (SINITOX/FIOCRUZ) e que estas induzem alterações cognitivas e emocionais, onde a inibição da AChE é descrita de maneira menos consistente e considerando a escassa literatura pesquisando o malation, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar as respostas comportamentais e a atividade da AChE cerebral em ratas administradas aguda/repetidamente com o OF malation.

Objetivos Específicos

- Caracterizar efeitos da administração aguda/repetida com malation sobre parâmetros locomotores, termoregulação e sensibilidade dolorosa;
- Investigar possíveis alterações cognitivas sobre o processo de aprendizado/memória em ratas administradas aguda/repetidamente com malation e avaliadas em modelo animais de aprendizado associado ao estresse;
- Avaliar as ações da intoxicação aguda/repetida com malation sobre o comportamento das ratas em modelos experimentais de ansiedade e depressão, o labirinto em cruz elevado e o teste do nado forçado,

respectivamente;

- Dosar a atividade da AChE cerebral como parâmetro da intoxicação aguda/repetida por malation;
- Reverter farmacologicamente o efeito comportamental mais relevante.

Material e Métodos:

Animais

Ratos Wistar fêmeas com cerca de 3 meses de idade pesando entre 180 e 250 gramas foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água a vontade, ciclo claro/escuro de 12 horas com as luzes acesas às 7:00 horas da manhã e temperatura mantida em 22 ± 2 °C. Os animais permaneceram no biotério do Laboratório de Psicofarmacologia por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos. Os testes comportamentais foram realizados entre 13:00 e 17:00 horas e seguiram as normas do Comitê de Ética da UFSC, processo número 520684/99-0.

Drogas e Reagentes

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: Malation (95% pureza, CAS 121-75-5, Dipil Ind., Brasil); Iodeto de acetilticolina (Sigma Chemical Co. USA); Albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co. USA); Ácido 5,5'ditiobis2-nitrobenzóico (Sigma Chemical Co. USA); Malonildialdeído (Sigma Chemical Co. USA); Ácido tiobarbitúrico (Sigma Chemical Co. USA); Ácido tricloroacético (Merck); Imipramina (Sigma Chemical Co. USA). NaCl 0,9% foi utilizada como solução controle.

O malation vendido comercialmente em solução de 500 mg/ml, foi diluído em salina nas seguintes doses de cada tratamento, agudo (50 mg/kg; 100 mg/kg) ou repetido (25 mg/kg; 50 mg/kg; 100 mg/kg). Nas outras doses (250 mg/kg – 2000 mg/kg) variou-se o volume (aproximadamente 0,10-1,2 ml) da solução administrada a fim de obtermos a concentração desejada.

Protocolo experimental

Dada a necessidade de descartar doses que por si teriam efeitos visíveis sobre o sistema colinérgico, os experimentos envolvendo administração aguda iniciaram-se com um piloto onde três animais por grupo foram colocados em gaiolas de arame e receberam doses crescentes de malation 500-2000 mg/kg, i.p., sendo observados por 2 horas. Nesta bateria simplificada de observação funcional analisaram-se os sintomas clássicos de intoxicação por agrotóxicos, entre eles piloereção, ptose, salivação, dificuldade respiratória e morte, sendo possível padronizar a dose de 500 mg/kg como a maior concentração a ser utilizada nos experimentos seguintes.

Na seqüência, grupos independentes de animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: campo aberto, teste da formalina, esquivas inibitórias, labirinto em cruz elevado e nado forçado. Mediu-se ainda a temperatura retal das ratas.

Os mesmos procedimentos foram realizados após a administração repetida por 7 dias com malation, com exceção da bateria de observação funcional.

Todos os testes descritos acima foram realizados 30 minutos após a última administração do agrotóxico, com a retirada do cérebro para dosagem

da atividade da enzima acetilcolinesterase após 24 horas.

Os efeitos da imipramina sobre doses selecionadas de malation administrados aguda ou repetidamente no TNF foram avaliados nos mesmos intervalos de tempo dos outros testes, ou seja, 30 minutos após a última injeção de malation, sendo que a imipramina (15 mg/kg i.p.) foi injetada de forma repetida 24, 5 e 1 hora antes do teste.

Teste do Campo Aberto (CA)

O campo aberto consistia numa arena circular com 97cm de diâmetro e dividida em 19 quadrantes onde o animal foi colocado no centro e durante 5 minutos pôde andar livremente. Acima desta arena havia uma câmera de vídeo que possibilitava ao experimentador registrar o experimento de fora da sala. Durante o teste registrou-se o número de quadrantes cruzados pelo animal, bem como o número de respostas de levantar. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo (Montgomery, 1955). Assim, esse teste permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de uma dada droga e/ou procedimento. No intervalo entre cada animal o aparelho foi limpo com papel e pano umedecido em álcool 5%, procedimento que foi adotado para todos os subseqüentes testes comportamentais.

Temperatura

Utilizou-se um termômetro Cole Parmer[®] para medir a temperatura retal das ratas. Para evitar viés induzido pelo estresse na temperatura a ser medida, os animais foram habituados ao procedimento durante 3 dias efetuando-se o teste somente no quarto dia, quando a temperatura colônica foi registrada

inserindo-se 5 cm do sensor no cólon do animal. Foi considerado como temperatura válida àquela que manteve-se estável por 45 segundos.

Esquiva inibitória

O aparelho de esquiva inibitória (Insight[®]) consiste em uma caixa 25X20cm e h=23cm com o chão formado por barras paralelas de metal com 1mm de diâmetro espaçadas 1cm uma das outras. Uma plataforma de 7cm de largura e 2,5cm de altura localiza-se no lado direito da caixa.

Na sessão de treino, os animais eram colocados na plataforma e a latência para descer até às barras era medida pelo próprio aparelho. Quando o animal colocava as quatro patas no chão recebia um choque de 0,4mA durante 3 segundos. A sessão de teste era realizada 24 horas após o treino, nesta sessão o animal era colocado na plataforma e media-se a latência de descida. Considerava-se como tempo limite de permanência em cima da plataforma, 180 segundos (Izquierdo, 2002)

Teste da Formalina

O teste da formalina de nocicepção foi realizado em caixas de acrílico medindo 28 x 28 x 28 cm, com um espelho posicionado em um ângulo de 45° atrás da caixa para facilitar a completa visualização das patas das ratas. Cada rata foi injetada com 50 µl de formalina a 5 % na região dorsal da pata traseira direita e então observadas por 60 min. O número de eventos nociceptivos (retração, mordida ou lambida) da pata injetada foi quantificado através de visualização direta e considerado como índice de nocicepção. O teste da formalina para ratos é dividido em duas diferentes fases: a primeira, de 0-10 minutos (Fase 1) e a fase tardia de 10-60 minutos (Fase 2) (Dubuisson e

Dennis, 1977; Hunskar e Hole, 1987).

Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Este aparelho construído em madeira e coberto por fórmica preta consiste de quatro braços elevados 51 cm do chão, sendo dois braços abertos (50 cm / 10 cm / 1 cm) perpendiculares a dois braços fechados (50 cm / 10 cm / 40 cm). No centro do labirinto existe um quadrado central (10 cm / 10 cm) onde o animal é colocado com a cabeça voltada para um dos braços fechados no início do procedimento. Durante cinco minutos foram registrados o tempo e número de entradas nos braços abertos e fechados. Os experimentos foram realizados com baixa iluminação, aproximadamente 9 LUX, monitorados por câmeras de vídeo e quantificados por experimentador localizado em sala adjacente ao aparelho. Neste teste, drogas e/ou procedimentos com atividade ansiolítica aumentam a frequência de entradas e/ou tempo gasto nos braços abertos, enquanto que procedimentos ou drogas ansiogênicas fazem o inverso. A frequência de entradas nos braços fechados, tido como parâmetro de atividade locomotora, geralmente não é afetada (Pellow *et al.*, 1985).

Teste do Nado Forçado (TNF)

O teste do nado forçado consiste em colocar as ratas, individualmente, em um cilindro de 40 cm de altura por 28 cm de diâmetro, contendo 23 cm de água mantida a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos, sendo que 24 horas mais tarde, estas ratas eram re-submetidas ao teste, porém por apenas 5 minutos. O parâmetro registrado no dia do teste foi o tempo de imobilidade, ou seja, o tempo que o animal permaneceu flutuando, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água. No final da avaliação comportamental de cada

animal, tanto no primeiro quanto no segundo dia, a água do cilindro foi trocada completamente, os animais secos em papel toalha e deixados em caixa plástica aquecida por lâmpada de 40 W por pelo menos 30 minutos.

Porsolt e colaboradores (Porsolt *et al.*, 1978) mostraram que quando os ratos são colocados no cilindro com água pela primeira vez (por um período de 15 minutos), permanecem mais tempo nadando e atingem um platô – média de 80% de imobilidade por minuto – em cerca de 7 minutos. Além disso, relataram que uma única exposição de 15 minutos é suficiente para produzir um nível relativamente consistente de imobilidade no teste subsequente, sendo que a re-submissão do rato ao cilindro com água reproduz de maneira resumida o comportamento da primeira sessão (pré-teste), porém alcançando o platô de imobilidade já no terceiro minuto do teste.

Dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase

Os animais foram decapitados 24 horas após a última administração de malation. Subseqüentemente a remoção do encéfalo, retirou-se a porção anterior do cérebro a qual foi pesada e homogeneizada em 2 volumes de tampão Hepes 20 mM, pH 7,4, para posterior dosagem bioquímica.

O método para determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral baseia-se na produção de tiocolina a partir da hidrólise da acetiltiocolina. Isto é acompanhado por uma contínua reação da tiocolina com o DTNB para produzir o ânion TNB de cor amarela (Ellman *et al.*, 1961).

O meio da reação continha ácido 5',5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) 1 mM, tampão fosfato de potássio 40 mM, pH 8,0 e iodeto de acetiltiocolina 0,022 mM procedendo-se à leitura da absorbância por 2 minutos, a temperatura de

25 °C. A reação colorimétrica foi medida em um espectrofotômetro Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech®, em 412 nm.

Análise estatística

Todos os testes com exceção da esQUIVA inibitória, tiveram seus dados representados pela média \pm EPM e foram avaliados por ANOVA de 1 via com análise posterior de significância pelo teste post-hoc de Tukey. Os dados da esQUIVA inibitória são representados por mediana \pm intervalos interquartil e foram analisados através de testes não paramétricos de Wilcoxon e Kruskal Wallis.

Os testes de reversão comportamental foram analisados por ANOVA de 2 vias com post-hoc de Tukey.

Resultados

Experimentos com administração aguda de malation

Teste do Campo Aberto

A figura 1 mostra o efeito de doses crescentes de malation (50; 250 e 500 mg/kg) injetados 30 minutos antes do teste sobre o número de cruzamentos e de resostas de levantar nos 5 minutos que que o animal permanecia na arena. A análise por ANOVA de 1 via indica efeito significativo do tratamento tanto na ambulação geral [$F(3,26)= 2,48$; $p<0,05$] quanto na vertical [$F(3,26)=3,41$; $p<0,05$]. A análise posterior pelo teste de Tukey confirma os prejuízos locomotores induzidos pela dose de 500 mg/kg nos dois parâmetros avaliados.

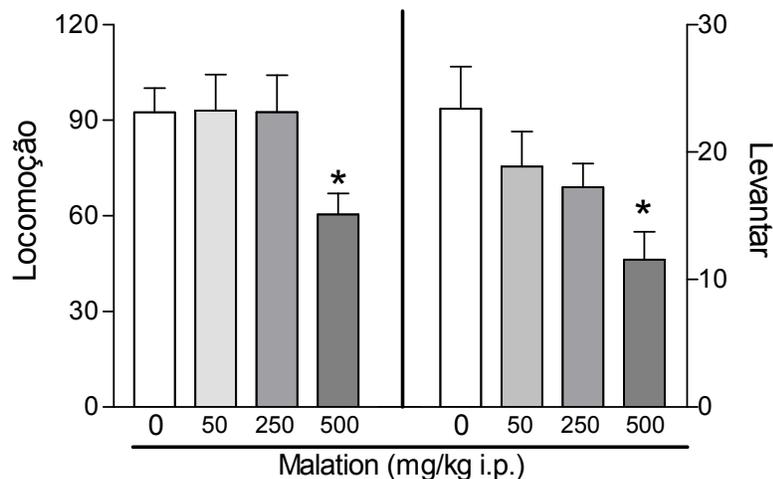


Figura 1. Efeitos do malation (50; 250 e 500 mg/kg i.p.) na atividade locomotora (esq.) e levantar (dir.) avaliados no campo aberto e registrados durante 5 minutos, 30 minutos após ao tratamento. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 8-11 ratos. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

Os resultados observados no teste do campo aberto sugerem redução na locomoção induzida pela maior dose de malation administrada agudamente.

Avaliação da Temperatura

A temperatura colônica foi avaliada em grupos adicionais de animais tratados com as mesmas doses utilizadas no campo aberto.

A análise estatística por ANOVA de 1 via indica efeito significativo do tratamento [$F(3,28)=15,57$; $p<0,01$] nos dados apresentados na tabela 1. O teste *post-hoc* de Tukey confirma o efeito hipotérmico significativo nas ratas tratadas somente com malation 500 mg/kg.

Tabela 1: Efeitos do malation (50; 250 e 500 mg/kg i.p.) na temperatura colônica de ratas, 30 minutos após a injeção do tratamento. Os dados estão representados em médias \pm EPM. ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle

<i>Malation</i> (mg/kg i.p.)	<i>N</i>	<i>Temperatura (°C)</i>)
0	8	38,07 \pm 0,12
50	8	38,06 \pm 0,13
250	8	37,43 \pm 0,19
500	8	36,56 \pm 0,24**

Constatados os efeitos sedativos e hipotérmicos induzidos pela maior dose de malation, a mesma foi descartada para evitar posteriores falsos positivos e/ou negativos. Desta forma nos experimentos seguintes, a dose de 500 mg/kg foi substituída por um tratamento intermediário às doses restantes,

ou seja, adicionamos o grupo malation 100 mg/kg.

Teste da esQUIVA inibit6ria

Poss6veis altera76es na fun76o cognitiva de ratas tratadas agudamente com malation foram avaliadas utilizando-se o teste da esQUIVA inibit6ria. Por ser um teste que possui tempo de corte, os dados apresentados na figura 2 passaram por an6lise estat6stica n6o-param6trica. Apesar do teste Wilcoxon haver apontado diferen7as significantes entre as lat6ncias dos dias treino e teste para todos os grupos [$Z=2,52$ e $p=0,01$], a an6lise realizada pelo teste de Kruskal-Wallis n6o apontou diferen7as entre os grupos, ou seja, todos os grupos foram capazes de adquirir o comportamento de esQUIVA inibit6ria.

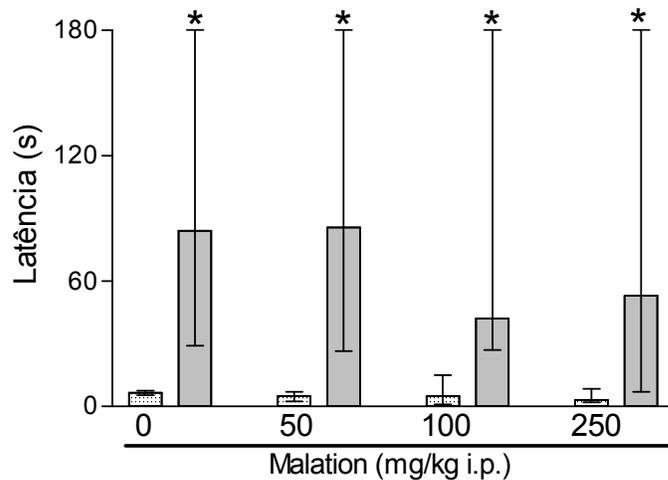


Figura 2. Efeitos do malation injetado 30 minutos antes do treino sobre a lat6ncia para descer da plataforma no dia treino (barras claras) e no dia teste (barras escuras). Barras representam mediana \pm intervalo interquartil de 8 animais. * diferen7a estat6sticamente significativa em rela76o ao dia treino. * $p<0,05$.

Teste da Formalina

Os efeitos do malation sobre a sensibilidade dolorosa dos animais foram pesquisados fazendo-se uso do teste da formalina. Trinta minutos após a administração de malation (50; 100 ou 250 mg/kg), os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 5% e foi registrado o número de eventos característicos de nocicepção durante uma hora conforme mostrado na figura 3.

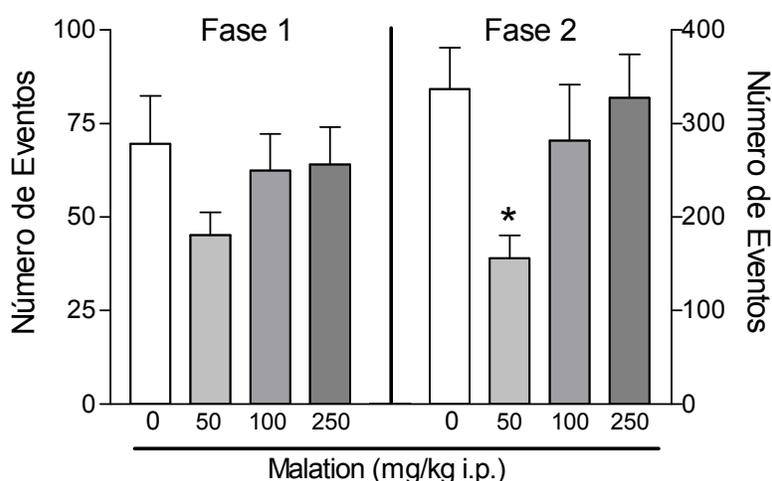


Figura 3. Efeitos do malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) injetado 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 5%. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 7 ratos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina.

O teste ANOVA de 1 via aplicado separadamente a cada uma das fases indicou efeito significativo do tratamento somente na segunda fase do teste [$F(3,24)=3,32$; $p < 0,05$]. Conforme o observado na figura 3 e confirmado pelo teste *post-hoc* de Tukey, a administração de malation 50 mg/kg reduziu de maneira significativa o número de eventos nociceptivos na segunda fase do teste da formalina, sugerindo um possível efeito antinociceptivo nesta fase.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

A tabela 2 e a figura 4 mostram as alterações nos comportamentos relacionados à ansiedade em animais tratados agudamente com malation e avaliados no teste do labirinto em cruz elevado.

Tabela 2. Medidas do labirinto em cruz elevado avaliadas 30 minutos após a injeção do tratamento agudo com malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.). Os dados estão representados em médias \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, respectivamente.

<i>Malation (mg/kg i.p.)</i>	<i>N</i>	<i>Tempo nos braços abertos (s)</i>	<i>Entradas nos braços abertos</i>	<i>Entradas totais</i>
0	11	140,72 \pm 11,76	10,09 \pm 0,31	19,72 \pm 1,07
50	9	100,60 \pm 10,48	7,60 \pm 1,05	17,40 \pm 1,65
100	10	78,55 \pm 13,53 **	6,00 \pm 1,30 *	15,22 \pm 1,92
250	8	81,00 \pm 15,30 **	6,50 \pm 1,08	14,62 \pm 1,08

O teste estatístico ANOVA de 1 via indica efeito significativo do tratamento para as seguintes medidas mostradas na tabela 2 e posteriormente na figura 4: tempo nos braços abertos [$F(3,34)=5,33$ $p < 0,01$]; entradas nos braços abertos [$F(3,34)= 3,80$ $p < 0,05$] e % de tempo nos braços abertos [$F(3,34)= 3,60$ $p < 0,05$]. A análise posterior pelo teste de Tukey confirma a redução de todas as medidas citadas acima no grupo malation 100 mg/kg. E ainda, a redução significativa do tempo gasto nos braços abertos pelos animais que receberam a dose de 250 mg/kg. Tanto as entradas totais, quanto o número de entradas nos braços fechados não foram alterados de maneira significativa. O conjunto destes dados indica possível efeito ansiogênico nas doses citadas, sem comprometimento motor.

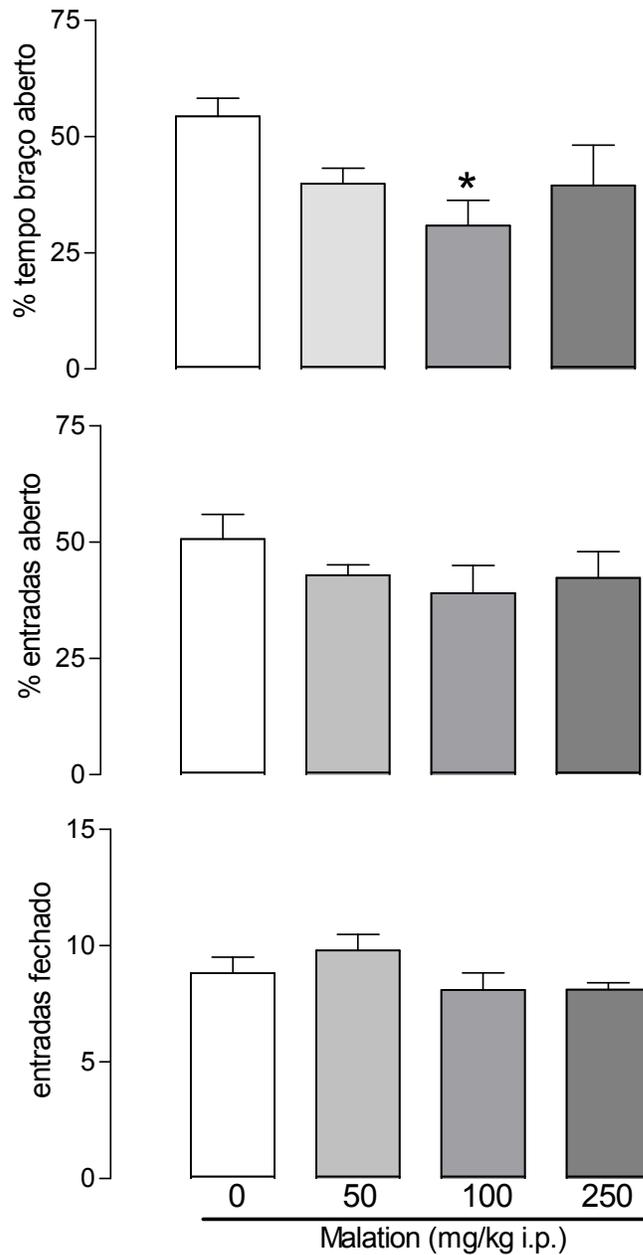


Figura 4. Efeitos do malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) injetado 30 minutos antes do teste, sobre as porcentagens de tempo e entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 8-11 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

Teste do Nado Forçado

O efeito do tratamento agudo com malation em um modelo animal da depressão, o teste do nado forçado, é apresentado na figura 5. O aumento no tempo de imobilidade induzido pelas doses de 100 e 250 mg/kg é confirmada pela análise por ANOVA de 1 via [$F(3,31)=75,29$; $p<0,01$] e pelo teste *post-hoc* de Tukey.

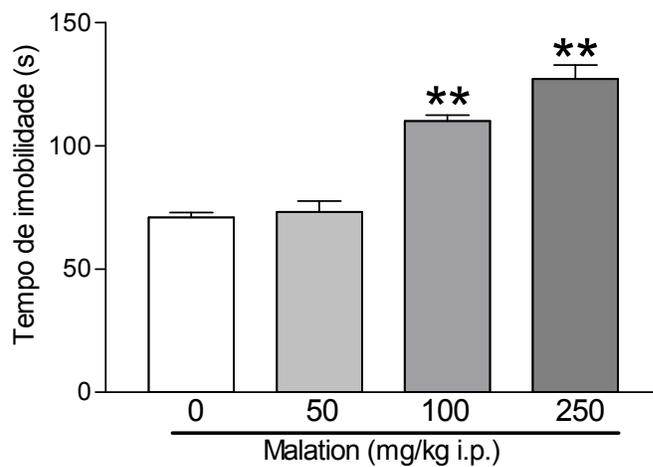


Figura 5. Efeitos do malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) injetado 30 minutos antes do teste, sobre o tempo de imobilidade no nado forçado. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 8-11 animais. ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle.

O aumento significativo no tempo de imobilidade sugere possível efeito tipo-depressivo induzido pela administração de malation 100 e 250 mg/kg.

Dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral.

O monitoramento da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral foi utilizado como parâmetro bioquímico da ação do malation. Os resultados expostos na tabela 3 mostram inibição significativa induzida pelo tratamento [F(3,16)=25,43; p<0,01] em todas as doses testadas, efeito confirmado pelo teste *post-hoc* de Tukey.

Tabela 3. Efeitos da administração de malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral. A atividade da enzima foi expressa em nmol substrato (acetiltiocolina) hidrolisado/ mg proteína / minuto. Os dados estão representados em médias \pm EPM. **p<0,01 em relação ao grupo controle.

<i>Malation (mg/kg i.p.)</i>	<i>N</i>	<i>Atividade AChE (nmol/min/mg proteína)</i>	<i>% Atividade em relação ao controle</i>
0	5	24,77 \pm 1,67	100%
50	5	19,18 \pm 0,65**	77,5%
100	5	13,66 \pm 0,93**	55,1%
250	5	11,95 \pm 0,74**	48,2%

Experimentos com administração repetida de malation por 7 dias

Teste do Campo Aberto

A análise por ANOVA de 1 via dos dados mostrados na figura 6 indica efeito significativo da administração repetida de malation por 7 dias nos dois índices de locomoção avaliados, tanto horizontal [F(3,26)=9,43; p<0,01] quanto vertical [F(3,26)=3,59; p<0,05]. O teste *post-hoc* de Tukey confirma a redução na ambulação no grupo malation 250 mg/kg nas duas medidas observadas.

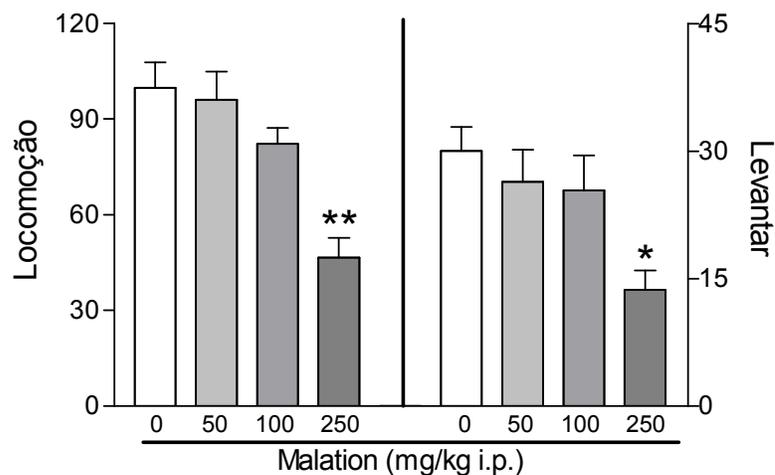


Figura 6. Efeitos do malation na atividade locomotora (esq.) e levantar (dir.) avaliados no campo aberto e registrados durante 5 minutos, 30 minutos após a sétima injeção do tratamento. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 6-8 animais. *p<0,05; **p<0,01 em relação ao grupo controle, respectivamente.

A redução significativa da movimentação vertical e horizontal na maior dose testada repetidamente, sugere um eventual comprometimento motor deste tratamento.

Avaliação da Temperatura

Na tabela 4 estão representados os valores da temperatura colônica de ratas 30 minutos após a sétima administração de doses de malation (50; 100 ou 250 mg/kg i.p.). A análise estatística não apontou efeito significativo em qualquer uma das doses testadas [$F(3,22)=0,33$; $p=0,8$].

Tabela 4: Efeitos da administração repetida de malation (50; 100 e 250 mg/kg i.p.) por 7 dias na temperatura colônica de ratas, 30 minutos após a última injeção Os dados estão representados em médias \pm EPM.

<i>Malation (mg/kg i.p.)</i>	<i>N</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
0	7	37,02 \pm 0,15
50	6	37,12 \pm 0,16
100	6	37,01 \pm 0,11
250	7	37,18 \pm 0,25

Além dos efeitos motores da maior dose testada nestes protocolos, houve letalidade entre os animais do grupo malation 250 mg/kg durante o tratamento repetido. Desta forma, como procedido no protocolo agudo, substituímos esta dose nos experimentos seguintes. Todavia, diferente da administração aguda onde a nova dose escolhida (100 mg/kg) foi intermediária aquelas que estavam sendo usadas nos procedimentos iniciais (50 – 250 mg/kg), nos experimentos envolvendo administração repetida, devido a restrita faixa de doses restantes (50 – 100 mg/kg), optamos por utilizar uma dose 10

vezes menor aquela que foi descartada, ou seja 25 mg/kg.

Teste da Esquiva Inibitória

A figura 7 mostra os efeitos do tratamento repetido com malation sobre a latência dos animais para descer da plataforma no teste da esquiva inibitória. A análise não paramétrica dos dados obtidos sugere que somente os animais controle foram capazes de adquirir esquiva inibitória [$Z=2,24$ e $p=0,02$] e a posterior análise com o teste de Kruskal-Wallis, não indicou diferenças entre os grupos no dia teste.

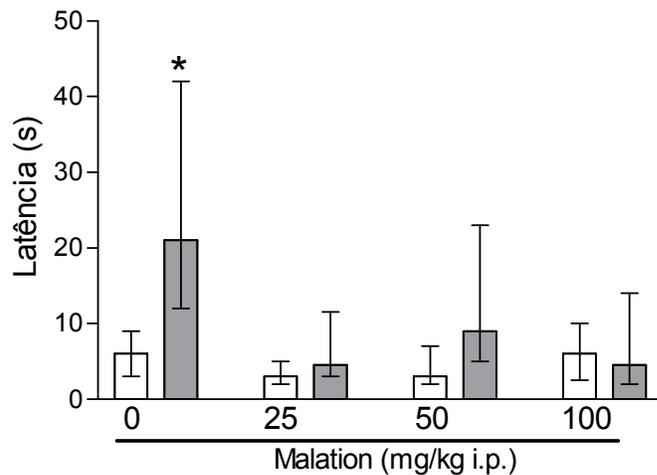


Figura 7. Efeitos da administração repetida com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre a aquisição de esquiva inibitória. A sessão de treino foi realizada 30 minutos após a sétima injeção do tratamento. * diferença significativa em relação ao dia treino. Barras representam a mediana \pm intervalo interquartil de 8 animais; * $p<0,05$.

Estes resultados indicam um possível prejuízo induzido pela administração repetida com todas as doses de malation no aprendizado dos

animais.

Teste da Formalina

Na figura 8 são mostrados os efeitos da administração repetida com malation sobre o número de eventos nociceptivos quantificados nas duas fases do teste da formalina. Não foram identificados efeitos significantes após realizados os testes estatísticos, tanto na primeira [$F(3,16)=1,39$ $p<0,3$] quanto na segunda fase [$F(3,16)=0,23$ $p<0,9$]. Estes resultados sugerem tolerância ao efeito antinociceptivo comparado ao efeito da administração aguda, ver figura 3.

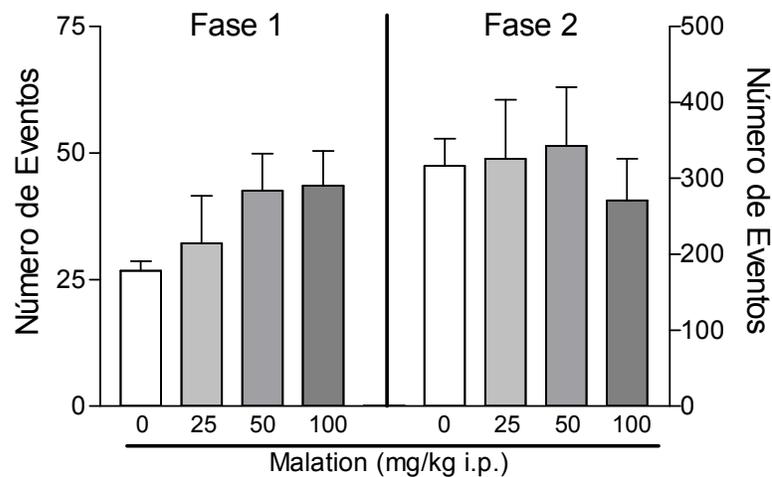


Figura 8. Efeitos do tratamento repetido com malation sobre a injeção intraplantar de formalina 5% aplicada 30 minutos após a sétima administração. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 6 ratos.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado após o tratamento

repetido por 7 dias com malation (25; 50 ou 100 mg/kg i.p.) são mostrados na tabela 5 e figura 9, respectivamente.

Tabela 5. Medidas do labirinto em cruz elevado avaliadas 30 minutos após a sétima injeção com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.). Os dados estão representados em médias \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle, respectivamente.

<i>Malation (mg/kg i.p.)</i>	<i>N</i>	<i>Tempo nos braços abertos (s)</i>	<i>Entradas nos braços abertos</i>	<i>Entradas totais</i>
0	9	81,22 \pm 7,68	7,66 \pm 0,83	17,66 \pm 1,41
25	8	27,00 \pm 6,74 **	2,75 \pm 0,75 **	11,25 \pm 1,57 **
50	8	84,00 \pm 13,96	7,00 \pm 1,11	17,75 \pm 1,82
100	8	124,00 \pm 11,97 *	8,62 \pm 1,16	17,25 \pm 1,67

A análise estatística por ANOVA de 1 via indicou efeito significativo nos seguintes parâmetros: tempo de permanência nos braços abertos [$F(3,29)=14,29$; $p < 0,01$]; entradas nos braços abertos [$F(3,29)=6,92$; $p < 0,01$] e entradas totais [$F(3,29)= 3,72$; $p < 0,01$].

Os parâmetros mais validados e melhor correlacionados com “ansiedade” avaliada no LCE estão mostrados na figura 9, foram significantes: % de tempo nos braços abertos [$F(3,29)= 15,63$; $p < 0,01$] e % de entradas nos braços abertos [$F(3,29)= 11,20$; $p < 0,01$]. O número de entradas nos braços fechados não foi alterado de maneira significativa.

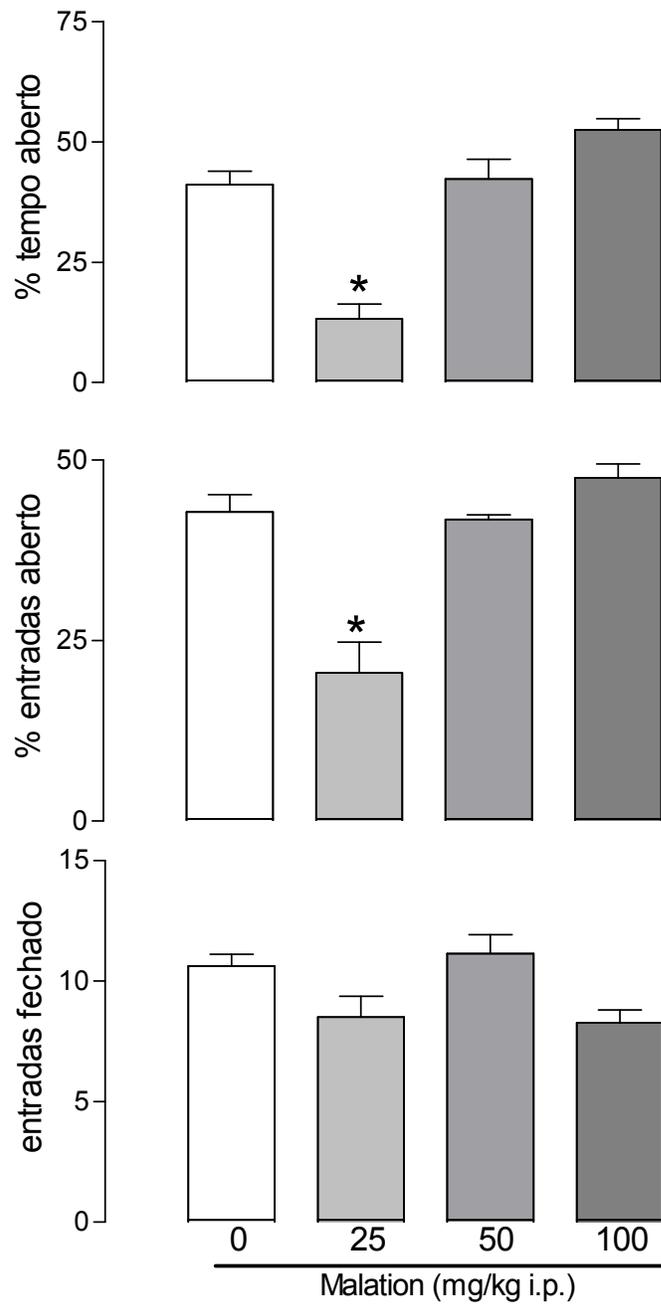


Figura 9. Efeitos da administração repetida com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre as porcentagens de tempo e entradas nos braços abertos e número de entradas nos braços fechados do labirinto em cruz elevado. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 8-9 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

A análise posterior por Tukey confirma a redução de todos os parâmetros avaliados no labirinto em cruz elevado no grupo malation 25 mg/kg, com exceção do número de entradas nos braços fechados. Após a análise destes resultados percebe-se que prevalece o efeito tipo-ansiógênico nos animais administrados com malation 25 mg/kg repetidamente.

Teste do nado forçado

A figura 10 mostra o aumento no tempo de imobilidade avaliado no teste do nado forçado após a administração de malation por 7 dias. O significativo aumento na imobilidade foi evidenciado pelo teste ANOVA de 1 via [$F(3,30)=25,66$; $p<0,01$] e teste *post-hoc* de Tukey que sugere efeito tipo-depressivo em todas as doses testadas.

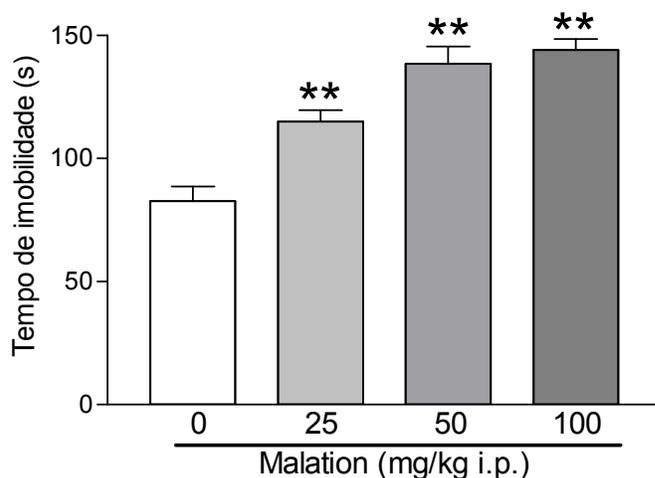


Figura 10. Efeitos da administração repetida com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre o tempo de imobilidade avaliado no teste do nado forçado. Os dados estão representados em médias \pm EPM de 7-9 animais. ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle.

Dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral.

A atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral apresentou-se inibida de maneira significativa em todos os tratamentos monitorados [F(3,28)=18,32 $p<0,01$] (ANOVA 1 via; Tukey), os dados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Efeitos da administração repetida por 7 dias com malation (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral. A atividade da enzima foi expressa em nmol substrato (acetiltiocolina) hidrolisado/ mg proteína / minuto. Os dados estão representados em médias \pm EPM. ** $p<0,01$ em relação ao grupo controle.

<i>Malation (mg/kg i.p.)</i>	<i>N</i>	<i>Atividade AchE (nmol/min/mg proteína)</i>	<i>% Atividade em relação ao controle</i>
0	8	25,22 \pm 1,35	100%
25	8	14,65 \pm 0,68**	58,1%
50	8	15,43 \pm 1,18**	61,2%
100	8	17,03 \pm 1,49**	67,2%

Experimentos avaliando a ação do antidepressivo imipramina no aumento de imobilidade induzido pelo malation no TNF.

Os experimentos seguintes foram feitos para avaliar a possível reversão do aumento da imobilidade induzido pelo malation no TNF através do tratamento com o antidepressivo imipramina. Foram escolhidas as doses de 100 mg/kg e 25 mg/kg de malation nos tratamentos agudos e repetido, respectivamente, porque estas alteraram significativamente parâmetros

relacionados a emocionalidade tanto no LCE quanto no TNF. A dose e esquema de administração do tratamento com imipramina foram selecionados baseando-se em trabalhos publicados na literatura (Porsolt et al., 1978). A figura 11 mostra os efeitos do antidepressivo imipramina (15 mg/kg i.p.) administrada 24, 5 e 1 hora entre o treino e o teste do nado forçado, sobre o tempo de imobilidade nos grupos controle e administrados agudamente com malation 100 mg/kg. A análise por ANOVA de 2-vias indicou efeito significativo do pré-tratamento com imipramina [$F(1,28)=42,02$; $p<0,01$], bem como do tratamento com malation [$F(1,28)=5,40$; $p<0,05$]. O teste *post-hoc* de Tukey confirma o aumento na imobilidade observado no grupo malation 100 mg/kg comparado ao grupo controle, bem como a redução da imobilidade nos dois grupos pré tratados com imipramina. Por outro lado, a interação entre os tratamentos não foi significativa [$F(1,28)=3,02$ $p<0,09$].

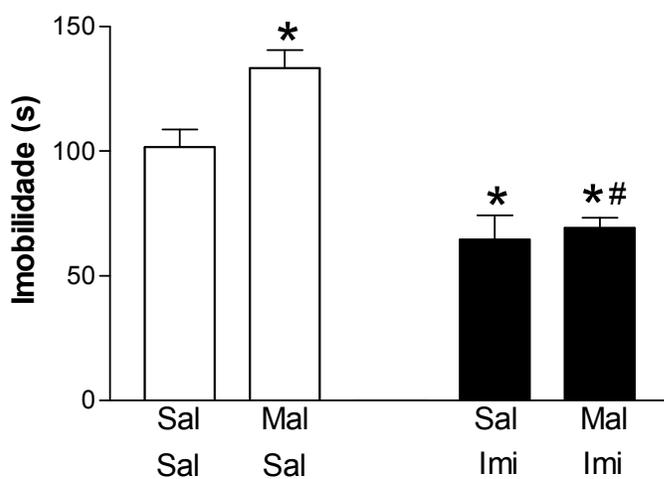


Figura 11. Efeitos do tratamento com o antidepressivo imipramina 15 mg/kg (24, 5 e 1 hora antes do teste) sobre a administração aguda com malation 100 mg/kg em animais avaliados no teste do nado forçado. * diferença em relação ao grupo Sal/Sal; # diferença em relação ao grupo Sal/Mal; $p<0,05$.

Estes resultados indicam que o efeito tipo-depressivo induzido pela administração aguda de malation 100 mg/kg, pode ser revertido pelo pré tratamento com imipramina.

Na figura 12 são apresentados os efeitos do tratamento com imipramina, em animais que receberam a administração repetida por 7 dias com malation 25 mg/kg e posteriormente foram avaliados no teste do nado forçado.

A análise por ANOVA de 2 vias indicou efeito significativo da administração repetida com malation [F(1,31)=4,18; p<0,05]; do tratamento com imipramina [F(1,31)=29,24; p<0,01]; bem como para a interação entre as duas variáveis [F(1,31)=7,93; p<0,01].

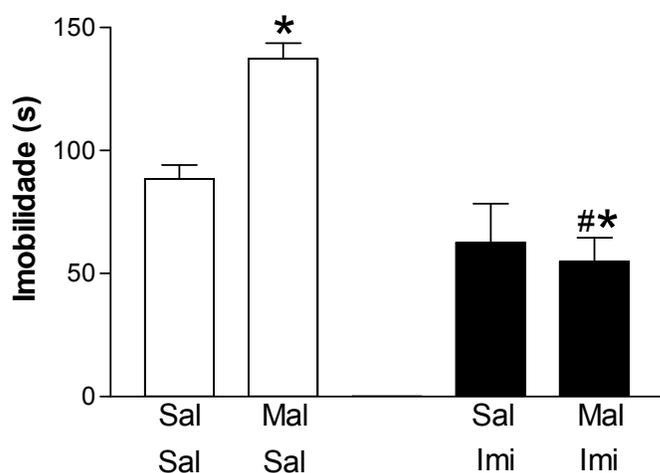


Figura 12. Efeitos do tratamento com imipramina 15 mg/kg (24, 5 e 1 hora antes do teste) sobre a administração repetida por 7 dias com malation 25 mg/kg em animais avaliados no teste do nado forçado. * diferença em relação ao grupo Sal/Sal; # diferença em relação ao grupo Sal/Mal; p<0,05..

O teste posterior de Tukey confirma o efeito tipo-depressivo induzido pelo malation, bem como a reversão deste efeito pelo tratamento com

imipramina.

Para descartar eventual comprometimento motor nos experimentos anteriores, foi realizado o teste do campo aberto. Na tabela 7 são mostrados os resultados nos grupos de animais administrados tanto aguda quanto repetidamente com malation, e posteriormente tratados com imipramina ou salina. No experimento agudo, após a análise por ANOVA de 2 vias percebe-se que nem o tratamento com imipramina [$F(1,14)=4,22$; $p=0,06$], ou a administração de malation [$F(1,14)=0,09$; $p=0,9$] tampouco a interação entre as duas variáveis [$F(1,14)=0,0001$; $p=0,99$] alteraram de maneira significativa a ambulação no CA. A análise do número de levantar por este teste estatístico indicou efeito significativo do malation [$F(1,14)=5,99$; $p<0,02$], todavia não confirmado pelo teste *post-hoc* de Tukey, e ausência de significância para os efeitos do tratamento com imipramina [$F(1,14)=0,14$; $p=0,71$] e para a interação entre as duas variáveis [$F(1,14)=0,01$; $p=0,90$].

Tabela 7. Efeitos do tratamento com imipramina (15 mg/kg i.p.), 24 / 5 e 1 hora antes do teste, sobre o número de cruzamentos e levantar no CA em animais administrados aguda (100 mg/kg) ou repetidamente (25 mg/kg) com malation, N = 4-5 animais.

Grupo	Locomoção	Levantar	Grupo	Locomoção	Levantar
Agudo			Repetido		
Sal/Sal	92,7±6,9	17,5±2,6	Sal/Sal	81,8±9,5	19,5±1,8
Sal/Mal	92,0±8,3	11,0±2,5	Sal/Mal	75,2±8,2	19,5±2,5
Imi/Sal	78,2±4,1	16,8±3,8	Imi/Sal	52,5±7,9	13,2±2,7
Imi/Mal	77,6±8,2	09,6±1,3	Imi/Mal	59,2±10,2	15,3±3,4

Para o grupo repetido, a ANOVA de 2 vias relacionada ao número de cruzamentos indicou efeito significativo para o tratamento com imipramina [F(1,16)=5,16; p<0,05] mas não para a administração repetida com malation 25 mg/kg [(F1,16)=0,0008; p=0,9] nem para a interação entre as duas variáveis [F(1,16)=0,48; p=0,49]. A análise para o número de levantar não indicou significância em nenhuma das variáveis analisadas: administração de malation [F(1,16)=0,13; p=0,71]; tratamento com imipramina [F(1,16)=3,40; p=0,09]; interação pré-tratamento e tratamento [F(1,16)=0,13; p=0,7]. Estes resultados sugerem que a reversão do efeito tipo depressivo do malation pela imipramina não está associado a aumento da atividade motora.

Discussão

O uso de agrotóxicos nas plantações tem trazido sérios efeitos à saúde tanto de agricultores quanto da população em geral. Além dos sintomas fisiológicos, a intoxicação aguda/repetida por OF pode levar a uma série de alterações neurocomportamentais por vezes imperceptíveis. A caracterização precoce destas alterações seria de extrema valia para o tratamento dos indivíduos expostos, e o uso de modelos animais é de fundamental importância na busca por comportamentos alterados quando da exposição a baixas doses de OF.

O presente trabalho apresenta como resultado mais relevante que tanto o tratamento agudo quanto o repetido com malation em ratas induz imobilidade avaliada no teste do nado forçado, as quais podem ser revertidos pelo tratamento com o antidepressivo imipramina. Além disso, doses de malation que não alteraram a atividade locomotora, tampouco a regulação térmica dos

animais foram capazes de induzir efeito tipo ansiogênico quando administradas aguda (100 mg/kg) ou repetidamente (25 mg/kg). Foi também observado efeito analgésico para a administração aguda com malation 50 mg/kg no teste da formalina e além disso, na tarefa de aprendizado avaliada no teste da esQUIVA inibitória, somente o tratamento repetido prejudicou o desempenho dos animais testados. Ainda, a enzima AChE cerebral foi inibida em todas as doses utilizadas, tanto na administração aguda quanto na repetida.

O teste de observação funcional das diferentes doses de malation foi importante para caracterizar as doses sem efeitos fisiológicos sobre os animais, de maneira que estes não interferissem nas medidas comportamentais avaliadas nos experimentos seguintes. O efeito sedativo induzido pela maior dose investigada no campo aberto tanto na administração aguda (500 mg/kg) quanto na repetida (250 mg/kg), demonstra que estas doses ainda eram relativamente altas e poderiam interferir nos testes comportamentais subsequentes. Apesar de também ocorrer nas doses baixas, o aumento da transmissão colinérgica na junção neuromuscular é a explicação mais razoável para este efeito sedativo.

A substituição das maiores doses utilizadas no campo aberto foi consolidada com a hipotermia induzida pela dose de malation (500 mg/kg) administrada agudamente. Para a administração repetida, apesar da ausência de efeitos significantes, a dose de 250 mg/kg foi substituída devido a seu efeito sedativo e também em consequência da letalidade observada em alguns animais neste grupo. Possivelmente a ativação de receptores colinérgicos no hipotálamo esteja envolvida na hipotermia observada, conforme sugerido por inicialmente por Beckman e Carlisle (1969) e confirmado por Gordon (1994).

A tolerância ao efeito hipotérmico induzido por OF é bem descrita (Costa et al., 1982; Russel et al., 1986). Neste sentido trabalhos de nosso grupo mostram que outros pesticidas inibidores da colinesterase, os carbamatos, também desenvolvem tolerância ao efeito hipotérmico após a administração repetida (Tahakashi et al., 1990, 1991).

As vias emocionais de memória são amplamente comandadas por estruturas como córtex pré-frontal, amígdala e tálamo (LeDoux, 1993), as quais também modulam a ansiedade (Pratt, 1992) e a depressão (Nestler, 2002). O modelo da esquiva inibitória utilizado neste estudo baseia-se na inibição comportamental, onde o animal após descer de uma plataforma e receber um choque forte no dia treino, terá seu comportamento inibido no dia teste devido a lembrança do estímulo aversivo recebido no dia anterior (Izquierdo, 2002). Em nosso trabalho, a administração aguda com malation não apresentou efeitos deletérios tampouco benéficos na tarefa de esquiva inibitória nas doses utilizadas, entretanto todas as doses administradas repetidamente impediram o aprendizado nos animais testados. Apesar de nenhum dos animais ter atingido o tempo máximo (180 s) de inibição comportamental no dia teste, este experimento foi replicado e o perfil do resultado foi o mesmo.

Provavelmente, os prejuízos de aprendizado/memória sejam o comportamento mais bem estudado em animais expostos a OF. Modelos experimentais como o labirinto aquático de Morris (Prendergast et al., 1997; Brandeis et al., 1985), caixa de Skinner (Geller et al., 1985) e tarefas de associar exemplos com retardo “delayed matching to position” (Bushnell et al., 1990, 1994) vem sendo extensamente utilizadas por estes e outros autores ao longo das décadas para avaliar o comportamento de animais expostos a OF.

O teste da esquiva inibitória foi utilizado por Ivens et al. (1998), os quais não evidenciaram prejuízos significativos em animais administrados cronicamente ao OF paration. Por outro, o tratamento por 14 dias com o OF diisopropil fluorofosfato (DFP) foi capaz de alterar os parâmetros relacionados a memória de trabalho em macacos (Prendergast et al., 1998), bem como a memória espacial avaliada no labirinto aquático de Morris em ratos (Prendergast et al., 1997; 1998). Desta forma, dada a vasta literatura acerca do tema e o foco desta dissertação, ou seja, a avaliação da emocionalidade afetada pela exposição aguda/repetida a baixas doses do OF malation, optamos por não utilizar outros modelos de aprendizado/memória para confirmar os resultados observados na esquiva inibitória.

Entre os estudos clínicos avaliando os efeitos cognitivos da exposição aguda a OF, Rosentock e colaboradores (1991) compararam 36 pacientes com exposição aguda registrada por OF a outras 36 pessoas da mesma comunidade, porém sem relato prévio de intoxicação por OF. Neste estudo os autores sugerem que mesmo uma única exposição ao OF, a qual levou os pacientes a buscar auxílio médico, estava associada a declínio persistente das funções cognitivas. Outros trabalhos (Savage et al., 1988; Steenland et al., 1994; McConnell et al., 1994) também registraram a piora de funções cognitivas associadas à memória em pacientes expostos agudamente e avaliados meses ou anos após a intoxicação.

Os estudos avaliando os déficits cognitivos relacionados a aprendizado e memória em pacientes expostos por longos períodos a OF são menos conclusivos do que aqueles apresentados avaliando a intoxicação aguda. Enquanto London e colaboradores (1997) não detectaram sinais claros de

prejuízos cognitivos ao compararem 231 aplicadores de agrotóxicos a 115 indivíduos controles, Farahat e colaboradores (2003) mostraram que a exposição ocupacional a OF foi capaz de reduzir o desempenho em vários testes neurocomportamentais.

A dor, assim como os outros comportamentos avaliados nesta dissertação, também é relatada após intoxicações por OF (Strong et al., 2004), além de ser afetada por estados emocionais alterados. O efeito analgésico induzido pela dose de malation 50 mg/kg administrada agudamente, vai contra o que esperávamos de início, ou seja, se OF provocam dor nas populações expostas estes provavelmente induziriam hiperalgesia nos animais tratados.

Para avaliar esta questão utilizamos o teste da formalina, o qual nos permitiria detectar efeitos tanto hiper quanto analgésicos. Neste teste aconforme mencionado em procedimentose resposta é observada em 2 fases. Enquanto que a resposta para a fase inicial parece envolver a estimulação química direta dos nociceptores, para a fase tardia envolve mediadores inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987).

Poucos trabalhos investigam os efeitos de OF sobre a dor em animais de laboratório, entre estes Gralewicz e Socko (1990) não relatam alterações na latência de retirada da pata no teste da placa quente (um índice de algesia) em ratos tratados com o OF clorfenvinfos. Entretanto, após receberem um choque nas patas estes animais mostraram-se hiperalgésicos em relação aos controles.

Vale ressaltar que mesmo nos estudos clínicos avaliando a relação exposição a OF X distúrbios de aprendizado e memória, ou mesmo dor, a presença de alterações emocionais também é relatada (Levin e Rodnitzky,

1976; Farahat et al., 2003), entre estas destaca-se a ansiedade. Em nosso estudo o malation induziu efeito tipo-ansiolítico consistente somente na dose intermediária quando administrado agudamente (100 mg/kg i.p.) e na menor dose na administração repetida (25 mg/kg i.p.). A redução do tempo de entradas nos braços abertos para a dose de 250 mg/kg administrada agudamente, bem como o aumento nesta mesma variável para o grupo administrado com malation 100 mg/kg repetidamente, foram considerados efeitos casuais, já que, conforme proposto por File (2001) as principais medidas de “ansiedade” no LCE são as porcentagens de tempo ou entradas nos braços abertos.

O aumento da “ansiedade” em animais expostos a OF é relatado por Baille e colaboradores (2001), os quais mostraram efeito tipo-ansiolítico no LCE apenas após a administração aguda de doses moderadas do OF soman. Nesta mesma linha, Abbud Righi e Palermo-Neto (2003), utilizando baixas doses de um inseticida piretróide do tipo II, cialotrina, também evidenciaram redução na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE após a administração por 7 dias. Todavia, é preciso mencionar que nos dois trabalhos citados acima, a interpretação dos resultados das doses maiores foi claramente prejudicado por prejuízos locomotores acentuados. Diferentemente, outro trabalho utilizando o OF clorpirifos mostrou efeito tipo ansiolítico nas doses testadas (Sánchez-Amate et al., 2001), sem alterar o principal parâmetro de atividade locomotora no LCE, ou seja, o número de entradas nos braços fechados (File, 2001)

O número de entradas totais nos braços do LCE, que a princípio era considerado a principal medida de locomoção neste teste, tem perdido

importância desde que alguns autores (Fernandes e File, 1996; Rodgers e Johnson, 1995) mostraram através de análise fatorial, que esta medida é influenciada pelo estado de ansiedade do animal. Desta forma, o aumento ou redução das entradas totais não representa seguramente efeitos estimulantes ou sedativos no LCE. Assim, apesar da redução significativa no número de entradas totais nos animais administrados repetidamente com malation, podemos considerar que os efeitos observados neste teste não foram influenciados por alterações locomotoras por dois motivos: primeiro porque o número de entradas nos braços fechados não foi alterado, e segundo porque as doses testadas foram escolhidas após a realização do teste do campo aberto.

A ansiedade é um distúrbio heterogêneo e pode ser dividida em pelo menos três componentes: o componente de avaliação (que gera a ansiedade), a experiência subjetiva e a expressão da ansiedade (Pratt, 1992). Vale salientar que o sistema colinérgico exerce um papel modulador no controle da ansiedade (File et al., 1998; Ouagazzal et al., 1999). Assim, a estimulação dos receptores nicotínicos pode induzir tanto efeitos tipo-ansiolítico quanto ansiogênico, dependendo da duração da estimulação e do modelo animal utilizado (Olausson et al., 1999; Ouagazzal et al., 1999).

O LCE tem sido utilizado como um modelo animal etologicamente validado para a ansiedade humana (Dawson e Tricklebank, 1995). Entretanto, é grande a dificuldade em determinar a forma específica de ansiedade que esta associada a determinado modelo. Como proposto por Lister (1990), as respostas comportamentais avaliadas em testes como o labirinto em cruz, que incluem uma situação que provoca ansiedade temporária, provavelmente

refletem um estado de ansiedade e não, um traço de ansiedade crônico.

A co-morbidade entre depressão e ansiedade é mostrada por uma diversidade de trabalhos (Gorwood, 2004). Nesta mesma linha, a grande maioria dos trabalhos envolvendo os efeitos da intoxicação colinérgica sobre os distúrbios neurológicos, apontam tanto ansiedade quanto depressão como sintomas comuns a populações expostas (Farahat et al., 2003; Salvi et al., 2003). Desta forma, o consistente aumento no tempo de imobilidade induzido pela administração de malation aguda (100 e 200 mg/kg i.p.) e repetidamente (25; 50 e 100 mg/kg i.p.) representam, ao menos no nosso conhecimento, o primeiro trabalho investigando os efeitos de OF sobre modelos animais de depressão.

A depressão é uma patologia multicausal que além da carga genética, pode ser desencadeada por situações específicas como a perda de um parente próximo ou outros fatores estressantes (Nestler et al., 2002). Além destes, a exposição a contaminantes ambientais como os agrotóxicos, pode ser relacionada ao aumento no número de suicídios (Parron et al., 1996) assim como a episódios depressivos (Stallones e Bessler, 2002), conforme mostram estudos clínicos avaliando tanto a intoxicação aguda (Hayes et al., 1980; Mearns et al., 1994), quanto a crônica aos agrotóxicos (Legaspi e Zenz, 1994; Salvi et al., 2003).

Como mencionado na introdução, nos estudos clínicos apresentados acima faltam o detalhamento do transtorno psiquiátrico pesquisado. Todavia, neste último item a complexidade dos distúrbios de humor e as deficiências metodológicas em identificar os tipos e subtipos deste distúrbios realmente dificultam a caracterização. Visto isso, o uso de modelos animais traz a

possibilidade de maior controle sobre essas variáveis.

O caráter múltiplo e subjetivo da depressão dificulta a interpretação dos modelos. Se os procedimentos modelam aspectos da depressão ou se o efeito de drogas antidepressivas nestes testes está relacionado ao efeito antidepressivo é tema de intensa controvérsia (Lucki, 1997). Estudos mostram que a administração pré-natal de deltametrina, um inseticida piretróide do tipo 2, parece não alterar o tempo de imobilidade avaliado no TNF em ratos machos e fêmeas testados aos 2 meses de idade. Entretanto, neste mesmo experimento, a latência para iniciar a flutuar foi reduzida nos ratos machos do grupo experimental (Lazarini et al., 2001), sugerindo um possível efeito tipo-depressivo. Vale lembrar que o mecanismo de ação dos inseticidas piretróides – os quais agem sobre canais iônicos na membrana de neurônios – é bastante diferente do efeito principal dos OF, o que impossibilita comparações apropriadas. Todavia é interessante notar que os autores, assim como no presente estudo, utilizaram o TNF para caracterizar comportamentos tipo depressivos induzidos pelo tratamento.

O teste do nado forçado é um modelo animal proposto por Porsolt et al., (1978) os quais observaram que ratos nadando em um espaço confinado, de onde não podem escapar, após o período de alguns minutos adotam uma postura de imobilidade que lhes permite apenas manter a cabeça fora da água (pré-teste), comportamento que se acentua quando o animal é exposto novamente a esta situação dentro de um período de 24 horas (teste). A este comportamento de imobilidade os autores denominaram “desespero comportamental” e é interpretado como desistência do animal de fugir da situação incontrolável. Ainda neste trabalho Porsolt e colaboradores

observaram que o tratamento subcrônico (1, 5 e 24 horas após o pré-teste e antes da sessão teste) com drogas antidepressivas (imipramina, desipramina, amitriptilina, iproniazida, iprindole) diminui o tempo de imobilidade dos animais no período do teste.

Assim, o TNF vem sendo utilizado principalmente para a validação de drogas antidepressivas, todavia outros autores tem mostrado que o modelo pode ser sensível a caracterização de comportamentos tipo-depressivo. Por exemplo, linhagens geneticamente selecionadas para depressão, os ratos Flinders, apresentam maior tempo de imobilidade no TNF do que seus respectivos controles (Tizabi et al., 1999; Einat et al., 2002) e além disso, a administração do interferon alfa, uma substância sabidamente depressiogênica (Asnis et al., 2003) também é capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos animais avaliados no TNF (Makino et al., 2000).

Todavia apesar das evidências apresentadas nos parágrafos anteriores, devemos ressaltar que a validade preditiva do TNF ainda é questionada por alguns autores (Willner, 1990), apesar de ser um modelo bastante utilizado para a validação farmacológica de fármacos antidepressivos (Cryan et al., 2002).

A reversão do efeito tipo-depressivo induzido tanto pela administração aguda (100 mg/kg) quanto repetida (25 mg/kg) com malation pelo tratamento com imipramina, utiliza a validade preditiva do TNF para reforçar a teoria de que o aumento da imobilidade representa um comportamento depressivo. Outros trabalhos serviram-se desta estratégia para sugerir esta hipótese, Overstreet et al.(1995), mostram que o maior tempo de imobilidade no TNF apresentado por ratos Flinders pode ser revertido com antidepressivos como a

imipramina, corroborando com o apresentado em nosso trabalho. E ainda, o fato de nas doses selecionadas tanto aguda quanto repetidamente o malation haver replicado os efeitos obtidos anteriormente, demonstra a consistência deste comportamento.

A principal crítica ao modelo é a susceptibilidade a falso positivos (Nestler et al., 2002). Os falso positivos no TNF incluem aquelas drogas que são estimulantes e diminuem o tempo de imobilidade sem ação antidepressiva, ou o contrário, falso positivos quando drogas sedativas aumentam o tempo de imobilidade. Desta forma estes efeitos sobre a atividade motora podem ser detectados com o uso de outro teste comportamental, como campo aberto por exemplo. Neste trabalho excluímos a possibilidade de falso positivo, definindo a faixa de dose utilizada no TNF após a realização de uma curva dose-resposta no teste do campo aberto.

Além disso, pode-se perceber que a redução da imobilidade no TNF nos animais tratados com imipramina, não está associada a estimulação locomotora no CA. Pelo contrário, os animais tratados com o antidepressivo tendem a hipoatividade neste teste. Nesta linha, dados não publicados de nosso laboratório mostram que o zinco (Brocardo et al., 2005), um metal com ação antidepressiva no TNF (Krocicka et al., 2001), apresenta o mesmo perfil de resposta que a imipramina quando avaliado no CA.

Apesar de alguns autores mostrarem efeitos comportamentais sem a inibição significativa da AChE tanto em humanos (Salvi et al., 2003; Nava et al., 1999) quanto em ratos (Ivens et al., 1998; Prendergast et al., 1997) em nosso trabalho todas as doses testadas inibiram de maneira consistente a atividade da AChE, corroborando com o mostrado por outros trabalhos seja na clínica

(Farahat et al., 2003) ou nos testes pré-clínicos (Geller et al., 1985; Sanchez-Amate et al., 2001; Baille et al., 2001).

Estas diferenças podem ser explicadas de algumas maneiras, nos estudos clínicos a grande variação interindividual na população em geral, faz com que a comparação entre indivíduos “expostos” X “controle” não seja um modo sensível de detectar a absorção excessiva de OF (Cocker et al., 2002).

Ainda, embora os OF sejam uma classe com mecanismo de ação semelhante, existem substanciais diferenças ente eles quando considerada a inibição da AChE. Cocker et al. (2002) mostraram diferenças entre 100 e 200 vezes na potência entre OF quanto à inibição da AChE. Por exemplo, o produto ativo do malation (malaoxon) é menos potente em fosforilar a AChE humana do que o clorpirifos.

A variação temporal entre a exposição aos OF e a mensuração da atividade da AChE também pode ser um fator para as divergências apontadas nos trabalhos anteriores. Enquanto os autores que relataram inibição significativa da AChE fizeram a dosagem 30 minutos (Baille et al., 2001) ou mesmo 2 dias (Sanchez-Amate et al., 2001) após a exposição, Ivens e colaboradores (1998) não observaram inibição significante da AChE 21 dias após a exposição ao OF, porém os prejuízos cognitivos continuavam presentes.

Todavia, o inverso também ocorre, ou seja, a inibição significativa da colinesterase sem a detecção de alterações comportamentais, como mostram os resultados publicados por (Prendergast et al., 1997; Nostrandt et al., 1997) e corroborados por nossos dados.

Desta forma, parece que a inibição da AChE não está diretamente

associada a alterações comportamentais. Assim, poderíamos sugerir que alguns comportamentos (como o tempo de imobilidade no TNF) são melhor influenciados pela inibição da colinesterase cerebral do que outros. Todavia os dados disponíveis nesta dissertação não permitem tal afirmativa e para isso, outros estudos seriam necessários.

Em suma, diante dos objetivos propostos o presente trabalho mostrou que a administração aguda/repetida por malation em ratas foi capaz de induzir alterações neurocomportamentais bastante semelhantes aquelas relatadas na clínica. Além disso, ao constatarmos que a maioria da população somente evita a exposição desnecessária quando manuseia agrotóxicos classificados como perigosos (Diel et al., 2003), este estudo têm a importância social de servir de alerta para os riscos envolvidos na manipulação imprudente de agrotóxicos pouco tóxicos, no caso o malation.

Ainda, a ocorrência de ansiedade e depressão em doses que não estão associadas a intoxicação colinérgica visível, isto é: piloereção, diarreia ou salivação apontam para outro fator a ser investigado em pacientes com episódios depressivos ou ansiosos sem causa aparente, ou seja, a exposição a OF. Além disso, este trabalho mostra que, pelo menos em nossas condições experimentais, o comportamento depressivo pode ser avaliado pelo tratamento com imipramina.

Como possíveis desdobramentos desta dissertação, outros modelos animais de depressão podem ser utilizados ou ainda, poder-se-ia avaliar medicamentos eficazes em ambos os distúrbios comportamentais aqui caracterizados.

Referências

- ABBUD RIGHI, D.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. *Toxicol. Applied. Pharmacol.* 191 (2003) 167-176.
- ASNIS, G.M.; LA GARZA, R.; KOHN, S.R.; REINUS, J.F.; HENDERSON, M.; SHAH, J. IFN-induced depression: a role for NSAIDs. *Psychopharmacol. Bull.* 37 (2003) 29-50.
- BAILLE, V.; DORANDEU, F.; CARPENTIER, P.; BIZOT, J.C.; FILLIAT, P.; FOUR, E.; DENIS, J.; LALLEMENT, G. Acute exposure to a low or mild dose of soman: biochemical, behavioral and histopathological effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69 (2001) 561-569.
- BECKMAN, A.L.; CARLISLE, H.J. Effect of intrahypothalamic infusion of acetylcholine on behavioral and physiological thermoregulation in the rat. *Nature* 221 (1969) 561-562.
- BENSLAMA, A.; MOUTAOUAKKIL, S.; MJAHEDE, K. Syndrome intermédiaire lors d'une intoxication aiguë par le malathion. *Presse Med.* 27 (1998) 713-715.
- BERGER-SWEENEY, J.; STEARNS, N.A.; MURG, S.L.; FLOERKE-NASHNER, L.R.; LAPPI, D.A.; BAXTER, M.G. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J. Neurosci.* 21 (2001) 8164-8173.
- BRAIDA, D.; PALADINI, E.; GRIFFINI, P.; LAMBERTI, M.; MAGGI, A.; SALA, M. An inverted U-shaped curve for heptylphysostigmine on radial maze performance in rats: comparison with other cholinesterase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 302 (1996) 13-20.

- BRANDEIS, R.; DACHIR, S.; SAPIR, M.; LEVY, A.; FISHER, A. reversal of age-related cognitive impairments by an M1 cholinergic agonist, AF102B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36 (1985) 89-95.
- BRENNER, L. Malathion. *J. Pesticide. Reform.* 12 (1992) 29-42.
- BROCARD, P.S., PANDOLFO, P., TAKAHASHI, R.N., RODRIGUES, A.L., DAFRE, A.L. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology* 207 (2005) 283-291.
- BUSHNELL, P.J.; PADILLA, S.S.; WARD, T.; POPE, C.N.; OLSZYK, V.B. Behavioral and neurochemical changes in rats dosed repeatedly with diisopropylfluorophosphate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256 (1990) 741-750.
- BUSHNELL, P. J.; KELLY, K. L.; WARD, T. R. Repeated inhibition of cholinesterase by chlorpyrifos in rats: behavioral, neurochemical and pharmacological indices of tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 15-25.
- CHATTONET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260 (1989) 625-634.
- CHOI, P.T.L.; QUINONEZ, L.G.; COOK, D.J. The use of glycopyrrolate in a case of intermediate syndrome following organophosphate poisoning. *Can. J. Anaesth.* 4 (1998) 5337-5340.
- COCKER, J.; MASON, H.J.; GARFITT, K.J. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 134 (2002) 97-103.
- COSTA, L.G. Biochemical and molecular neurotoxicology: relevance to biomarker development, neurotoxicity testing and risk assessment. *Toxicol. Lett.* 102-103 (1998) 417-421.

- COSTA, L.G.; SCHWAB, B.W.; MURPHY, S.D. Differential alterations of cholinergic muscarinic receptors during chronic and acute tolerance to organophosphorous insecticides. *Biochem. Pharmacol.* 31(1982) 3407-3413.
- CREMLYN, R.J. Introduction: historical aspects. In: *Agrochemicals: preparation and mode of action*. 1. Ed. Cichester: John Wiley & Sons. 1991. P. 1-15.
- DAHLGREN, J.G.; TAKHAR, H.S.; RUFFALO C.A.; ZWASS, M. Health effects of diazinon on a family. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42 (2004) 579-91.
- DAWSON, G.R.; TRICKLEBANK, M.D. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. *TiPS*. 16 (1995) 33-41.
- DIEL, C.; FACCHINI, L.A.; DALL'AGNOL, M.M., Household insecticides: pattern of use according to per capita income. *Rev. Saúde Pública.* 37 (2003) 83-90.
- DIVE, A.; MAHIEU, P.; VAN BINST, R. Unusual manifestations after malathion poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 1 (1994) 271-274.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain* 4 (1977) 161-174.
- EINAT, H.; BELMAKER, R.H.; ZANGEN, A.; OVERSTREET, D.H.; YADID, G., Chronic inositol treatment reduces depression-like immobility of Flinders Sensitive Line rats in the forced swim test. *Depress. Anxiety.* 15 (2002) 148-159.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-96.

- FARAHAT, T.M.; ABDELRASOUL, G.M.; AMR, M.M.; SHEBL, M.M.; FARAHAT, F.M.; ANGER, W.K. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. *Occup. Environ. Med.* 60 (2003) 279–286.
- FARIA, N.M.X.; FACCHINI, L.A.; FASSA, A.G.; TOMASI, E. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores da Serra Gaúcha (Brasil). *Rev. Saúde Pública.* 33 (1999) 391-400.
- FERNANDES, C.; FILE, S.E. The influence of open arm ledges and maze experience in the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1996) 31-40.
- FILE, S.E.; GONZALEZ, L.E.; ANDREWS, N. Endogenous acetylcholine in the dorsal hippocampus reduces anxiety through actions on nicotinic and muscarinic receptors. *Behav. Neurosci.* 112 (1998) 352-359.
- FILE, S.E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain Res.* 125 (2001) 151-57.
- GELLER, I.; HARTMANN, R.J.; GAUSE, E.M. Effects of subchronic administration of soman on acquisition of avoidance-escape behavior by laboratory rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23 (1985) 225-230.
- GORDON, C.J. Thermoregulation in laboratory mammals and humans exposed to anticholinesterase agents. *Neurotoxicol. Teratol.* 16 (1994) 427-439.
- GORWOOD, P. Generalized anxiety disorder and major depressive disorder comorbidity: an example of genetic pleiotropy? *Eur. Psych.* 19 (2004) 27–33.
- GRALEWICZ, S.; SOCKO, R. Effects of a single exposure to chlorphenvinphos,

- an organophosphate insecticide, on hot-plate behaviour in rats. *Pol. J. Occup. Med.* 3 (1990) 215-220.
- GRANDO, M. Intoxicações humanas por agrotóxicos em Santa Catarina. Um perfil dos casos registrados pelo Centro de Informações Toxicológicas. Florianópolis: UFSC, 1998. 147p. Dissertação – Universidade Federal de Santa Catarina.
- HAYES, A.L.; WISE, R.A.; WEIR, F.W. Assessment of occupational exposure to organophosphates in pest control operators. *Am. Ind. Hyg. J.* 41 (1980) 568–575.
- HENAO, S.H.; COREY, O.G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterases. OMS:México, 1991. 179p.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30 (1987) 103-114.
- ISACSON, G.; HOLUSGREN, P.; WASSERMAN, D.; BERGMAN, U. Use of antidepressants among people committing suicide in Sweden. *Br. Med. J.* 308 (1994) 506-509.
- IVENS, I.A.; SCHMUCK, G.; MACHEMER, L. Learning and memory of rats after long-term administration of low doses of parathion. *Toxicol. Sci.* 46 (1998) 101–111.
- IZQUIERDO, I. Memória. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.
- JOHNSON, M.K. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds: identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochem. J.* 114 (1969) 711-717.

- KARALLIEDDE, L.; SENANAYAKE N. Organophosphorus insecticide poisoning. *Br. J. Anaesth.* 63 (1989) 736-750.
- KARCZMAR, A. Anticholinesterases: dramatic aspects of their use and misuse. *Neurochem. Int.* 32 (1998) 401-411.
- KEMPLE, M. ABCs of toxicology – basic definitions. *J. Pesticide Reform.* 21 (2001) 22-23.
- KROCZKA, B.; BRANSKI, P.; PALUCHA, A.; PILC, A.; NOWAK, G. Antidepressant-like properties of zinc in rodent forced swim test. *Brain. Res. Bull.* 55 (2001) 297-300.
- LARINI, L. Praguicidas. In: OGA,S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996. 515p.
- LAZARINI, C.A.; FLORIO, J.C.; LEMONICA, I.P.; BERNARDI, M.M. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 23 (2001) 665– 673.
- LEDOUX, J.E. Emotional memory systems in the brain. *Behav. Brain Res.* 58 (1993) 69-79.
- LEGASPI, J.A.; ZENZ, C. Occupational health aspects of pesticides. In: C. Zenz, (ed.), *Occupational Medicine*, 3rd edn., Mosby, St. Louis, pp 617-653. 1994.
- LEVIN, H.S.; RODNITZKY, R.L. Behavioral effects of organophosphate in man. *Clin. Toxicol.* 9 (1976) 391-403.
- LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol. Ther.* 46 (1990) 321-363.

- LLORENS, J.; CROFTON, K. M.; TILSON, H. A.; ALI, S. F.; MUNDY, W. R. Characterization of disulfoton-induced behavioral and neurochemical effects following repeated exposure. *Fundam. Appl. Toxicol.* 20 (1993) 163–169.
- LONDON, L.; MYERS, J.E.; NEIL, V.; TAYLOR, T.; THOMPSON, M.L.; An investigation into neurologic and neurobehavioral effects of longterm agrochemical use among deciduous fruit farmworkers in the Western Cape, South Africa. *Environ. Res.* 73 (1997) 132–45.
- LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.* 8 (1997) 523-532.
- MAKINO, M.; KITANO, Y.; KOMIYAMA, C.; HIROHASHI, M.; TAKASUNA, K. Involvement of central opioid systems in human interferon-alpha induced immobility in the mouse forced swimming test. *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 1269-1277.
- MANDHANE, S.N.; CHOPDE, C.T. Neurobehavioral effects of acute monocrotophos administration in rats and mice. *Ind. J. Pharmacol.* 27 (1995) 245-249.
- MCCONNELL, R.; KEIFER, M.; ROSENSTOCK., L. Elevated quantitative vibrotactile threshold among workers previously poisoned with methamidophos and other organophosphate pesticides. *Am. J. Ind. Med.* 25 (1994) 325–334.
- MCDONALD, B. E.; COSTA, L. G.; MURPHY, S. D. Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates. *Toxicol. Lett.* 40 (1988) 47–56.

- MEARNS, J.; DUNN, J.; LEES-HALEY, P.K. Psychological effects of organophosphate pesticides: a review and call for research by psychologists. *J. Clin. Psych.* 50 (1994) 286–293.
- MEINKING, T.L.; VICARIA, M.; EYERDAM, D.H.; VILLAR, M.E.; REYNA, S.; SUAREZ, G. Efficacy of a reduced application time of ovide lotion (0.5% malathion) compared to nix creme rinse (1% permethrin) for the treatment of head lice. *Pediatr. Dermatol.* 21 (2004) 670-674.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48 (1955) 254-260
- NAVA, M.E.; ROMÁN, P.P.; ROBLES, S.H.; ALVARADO, L.M. Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Publica Mex.* 41 (1999) 55-61.
- NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD S.J.; MONTEGGIA L.M. Neurobiology of Depression. *Neuron* 34 (2002) 13–25.
- NOSTRANDT, A.C.; PADILLA, S.; MOSER, V.C.; The relationship of oral chlorpyrifos effects on behavior, cholinesterase inhibition, and muscarinic receptor density in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (1997) 15-26.
- OLAUSSON, P.; ENGEL, J.A.; SODERPALM, B. Behavioral sensitization to nicotine is associated with behavioral disinhibition, counteraction by citalopram., *Psychopharmacology* 142 (1999) 111-118.
- OUAGAZZAL, A.M.; KENNY, P.J.; FILE, S.E. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. *Psychopharmacology* 144 (1999) 54-61.

- OVERSTREET, D.H.; PUCILOWSKI, O.; REZVANI, A.H.; JANOWSKY, D.S. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. *Psychopharmacology* 121 (1995) 27-37.
- PADILLA, S. Regulatory and research issues related to cholinesterase inhibition. *Toxicol.* 102 (1995) 215-220.
- PARRON, T.; HERNANDEZ, A.F.; VILLANUEVA, E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic. Sci. Int.* 79 (1996) 53-62.
- PELLOW S.; CHOPIN P.; FILE S.E.; BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14 (1985) 149-167.
- PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressants treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47 (1978) 379-391.
- PRAT, J.A. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmac. Ther.* 55 (1992) 149-181.
- PRENDERGAST, M. A.; TERRY, A. V.; BUCCAFUSCO, J. J. Chronic, low level exposure to diisopropylfluorophosphate causes protracted impairment of spatial navigation learning. *Psychopharmacology* 129 (1997) 183–191.
- PRENDERGAST, M.A.; TERRY, A.V.; BUCCAFUSCO, J.J. Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 20 (1998) 115-122.

- REIDY, T.J.; BOWLER, R.M.; RAUCH, S.S.; PEDROZZA, G.I. Pesticide exposure and neuropsychological impairment in migrant farm workers. *Archi. Clin. Neuropsychy.* 7 (1992) 85–95.
- REITER, L. W.; TALENS, G.; WOOLLEY, D. Acute and subacute parathion treatment: effects on cholinesterase activities and learning in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 25 (1973) 582–588.
- RIVETT, K.; POTGIETER, P.D. Diaphragmatic paralysis after organophosphate poisoning. A case report. *S. Afr. Med. J.* .72 (1987) 881-882.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.T.J. Factor analysis of spatio-temporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (1995) 297-303.
- ROSENSTOCK, L.; KEIFER, M.; DANIELL, W.E.; MCCONNELL, R.; CLAYPOOLE, K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxications. *Lancet* 338 (1991) 223–227.
- RUSSEL, R.W.; BOOTH, R.A.; LAURETZ, S.D.; SMITH, C.A.; JENDEN, D.H. Behavioral, neurochemical and physiological effects of repeated exposures to subsymptomatic levels of the anticholinesterase, soman. *Neurobehav. Toxicol. Terat.* 8 (1986) 675-685.
- SALVI, R.S.; LARA, D.R.; GHISOL, E.S.; PORTELA, L.V.; DIAS, R.D.; SOUZA, D.O. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Sci.* 72 (2003) 267–271.
- SANCHEZ-AMATE, M.C.; DAVILA, E.; CANADAS, F.; FLORES, P.; SANCHEZ-SANTED F. Chlorpyrifos shares stimulus properties with pentylenetetrazol as evaluated by na operant drug discrimination task. *Neurotoxicology.* 23 (2002) 795–803.

- SANCHEZ-AMATE, M.C.; FLORES, P.; SANCHEZ-SANTED, F. Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. *Behav. Pharmacol.* 12 (2001) 285-296.
- SAVAGE, E.P.; KEFFE, T.J.; MOUNCE, M.L.; HEATON, R.K.; LEWIS, J.A.; BURCAR, P.J. Chronic neurologic sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. *Arch. Environ. Health* 43 (1988) 38–45.
- SCHULZ, H.; DESI, I.; NAGYMAJTENYI, L. Behavioral effects of subchronic intoxication with parathion-methyl in male wistar rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 12 (1990) 125-127.
- SELIGMAN, M.E.P. Desamparo. Sobre depressão, desenvolvimento e morte. EdUSP São Paulo 1977.
- SENANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. *N. Engl. J. Med.* 316 (1987) 761-763.
- Sistema Nacional de Informações Toxicológicas e Farmacológicas [SINITOX]. [on-line]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz. Disponível:
<http://www.cict.fiocruz.br/intoxicacoeshumanas/2001/brasil2001.htm>
- STALLONES, L.; BESELER, C. Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. *Ann. Epidemiol.* 12 (2002) 389-394.
- STEENLAND, K.; JENKINS, B.; AMEX, G.R.; CHRISLIP, D.; RUSSO, J. Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. *Am. J. Public Health* 84 (1994) 731–736.

- STRONG, L.L.; THOMPSON, B.; CORONADO, G.D.; GRIFFITH, W.C.; VIGOREN, E.M.; ISLAS, I. Health symptoms and exposure to organophosphate pesticides in farmworkers. *Am. J. Ind. Med.* 46 (2004) 599-606.
- SUDAKIN, D.L.; MULLINS, M.E.; HOROWITZ, B.Z.; ABSHIER, B.; LETZIG, L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38 (2000) 47-50.
- TAKAHASHI, R.N.; POLI, A.; MORATO, G.S.; LIMA, T.C.; ZANIN, M. Behavioral and biochemical changes following repeated administration of carbaryl to aging rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (1990) 879-881.
- TAKAHASHI, R.N.; POLI, A.; MORATO, G.S.; LIMA, T.C.; ZANIN, M.; Effects of age on behavioral and physiological responses to carbaryl in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 13 (1991) 21-24.
- TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In Hardman JE, Limbird LE, eds. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996: 161-176.
- TIZABI, Y.; OVERSTREET, D.H.; REZVANI, A.H.; LOUIS, V.A.; CLARK, E. JR.; JANOWSKY, D.S.; KLING, M.A. Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 142 (1999) 193-201.
- U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. 2000. Guidance for the registration of pesticides products containing malathion as the active ingredient. Washington, D.C.
- WILLNER, P. Animal models of depression: an overview. *Pharmac. Ther.* 45 (1990) 425-455.

ZANIN, M.; NIEWEGLOWSKI, A.M.; MEDEIROS, M.L.; SLISZ, R.; FOWLER, R.; CAVALET, V.; ZAPPIA, V. Agrotóxicos: a realidade do Paraná. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná, 1992. 93p.

Anexos

Parte desta dissertação foi submetida sob a forma de artigo para a revista: *Environmental Toxicology and Pharmacology*, com o título de Behavioral and Biochemical alterations induced by acute and repeated administration of malathion.