**Cláudio Gomes Salles Jr.**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS DAS PRINCIPAIS CLASSES COMERCIALIZADAS, SOBRE O SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL DE RATOS E SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM SINAPTOSSOMAS DO HIPOCAMPO DE RATOS**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Biomedicina da Universidade Federal de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Biomédico**

**ORIENTADORA: Virginia Campos Junqueira- Departamento de Ciências Biológicas- UNIFESP**

**São Paulo- 2009**

**Cláudio Gomes Salles Jr.**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS DAS PRINCIPAIS CLASSES COMERCIALIZADAS, SOBRE O SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL DE RATOS E SOBRE A ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE EM SINAPTOSSOMAS DO HIPOCAMPO DE RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Biomedicina da Universidade Federal de São Paulo como requisito para a obtenção do grau de Biomédico

ORIENTADORA: Virginia Campos Junqueira- Departamento de Ciências Biológicas- UNIFESP

**ORIENTADORA:**

**Prof°Dra.VirginiaC.Junqueira**

**Co- Orientadora:**

**Prof° Dra. Karin A. Simon**

**Prof° Dr. Fernando L. Fonseca**

**São Paulo, 17 de Junho de 2009**

**A Suprema Personalidade de DEUS**

**Ao meu tio Dr. Robson Domingues**

**Aos meus pais Cláudio e Vanja**

**E ao meu irmão Evandro**

“Sustento que o sentimento religioso cósmico é o mais

forte e o mais nobre incitamento à pesquisa cientifica.”

*Albert Einstein*

**AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ser a fonte de minha vida e inspiração quem me dá FORÇA, LUZ, AMOR para alcançar todos meus objetivos. Ao meu tio Prof° Dr. Robson Domingues sem o qual não seria possível essa tão importante realização e grande influencia exercida sobre mim como um grande profissional.

A Prof° Dra. Lilian Faro pela confiança e aprendizado logo no inicio da graduação me dando uma base sólida e momentos muito agradáveis. A todos os companheiros que estiveram me auxiliando com muita paciência e atenção do qual tive grandes aprendizados também:Elane, Max, Klebson.

A minha família Cláudio, Vanja e Evandro com apoio as minhas decisões estando ao meu lado dando todo apoio possível pra que pudesse realizar essa conquista.

A todos do Laboratório de Estresse Oxidativo- UNIFESP: André, Joes, Prof° Karen, Prof° Virginia, que me receberam muito bem dando suporte para termino do meu curso e com muita atenção e aprendizados muito valiosos.

Aqueles que direta ou indiretamente estiveram mentalizando positivamente em prol desta realização tão importante para mim, que sei que são muitos. Obrigado pela energia e pela irmandade que me da forças.

JAYA AHOW (OBRIGADO) a todos os seres que me guiam e me protegem por estarem tão seriamente empenhados neste intento.

**SUMÁRIO**

**RESUMO ......................................................................................... I**

**ABSTRACT ..................................................................................... II**

**LISTA DE FIGURAS ....................................................................... III**

**1. INTRODUÇÃO ........................................................................................... 1**

**1.1 Pesticidas. Generalidades ................................................................... 1**

**1.1a Classificação dos Pesticidas ............................................................. 2**

**1.1b Classificação segundo a Toxicidade ................................................ 2**

**1.1.c Classificação segundo o Grupo Químico .................................... 3**

**1.1.d Classificação segundo os Organismos que Combatem ................ 4**

**1.2 PRINCIPAIS GRUPOS DE PESTICIDAS E SUA TOXICIDADE**

**1.2.a Organoclorados ................................................................................ 5**

**1.2.b Organofosforados e carbamatos .................................................... 6**

**1.2.c Tio e ditiocarbamatos ...................................................................... 8**

**1.2.d Dipiridilos ..................................................................................... 10**

**1.2.e Piretróides .................................................................................... 11**

**1.3. EFEITOS TOXICOS da EXPOSIÇÃO HUMANA a PESTICIDAS 12**

**1.4. O SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL 14**

**1.4.a A neurotransmissão colinérgica ............................................... 16**

**1.4.b O Hipocampo .................................................................................. 17**

**1.5. SISTEMA DOPAMINÉRGICO 18**

**1.5 a NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA .................................. 20**

**1.6. PESTICIDAS e IMPACTOS AMBIENTAIS 21**

**2. JUSTIFICATIVA ..................................................................................... 25**

**3. OBJETIVOS 27**

**3.1. Objetivos gerais ................................................................................ 27**

**3.2. Objetivos específicos ....................................................................... 28**

**4. MATERIAIS E MÉTODOS**

**4.1. Animais .............................................................................................. 29**

**4.2. Tratamento com pesticidas ................................................................. 29**

**4.3. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS**

**4.3.a.**  **Atividade locomotora no campo aberto ....................................... 30**

**4.3.b. Labirinto em cruz elevado (LCE) .................................................... 31**

**4.3.c. Nado forçado ..................................................................................... 32**

**4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE EM HIPOCAMPO DE RATOS:**

**4.4.a. Substâncias e equipamentos .......................................................... 33**

**4.4.b. Ensaio enzimático em microplaca .................................................. 33**

**4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNA**

**4.5.a. Soluções e equipamentos .................................................................... 34**

**4.5.b. Quantificação protéica .......................................................................... 34**

**5. MICRODIÁLISE CEREBRAL ACOPLADA À CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA PARA TRATAMENTO COM OS FUNGICIDAS E HERBICIDAS, DDT, DICOFOL, LINDANO, MANEB e PARAQUAT**

**5.1. Reagentes e drogas utilizadas .......................................................... 35**

**5.2. Fundamentos da técnica ................................................................... 35**

**5.3. Implantação da cânula guia ............................................................. 36**

**5.4. Administração das substâncias e coleta das amostras .......... 37**

**5.5. Rendimento das sondas de microdiálise .................................... 38**

**5.6. DETERMINAÇÃO DA DOPAMINA E SEUS METABÓLITOS NO DIALIZADO**

**5.6.a. Fundamentos da técnica .......................................................... 39**

**5.6.b. Análise cromatográfica ............................................................ 40**

**5.6.c. Cálculo da Concentração de Substâncias ............................. 41**

**5.7. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA 42**

**6. RESULTADOS**

**6.1. DELTAPHOS ......................................................................................... 43**

**6.1.a METIL PARATION ............................................................................... 45**

##### 6.1.b EFEITOS BIOQUÍMICOS ................................................................... 47

**6.2. RESULTADOS MICRODIÁLISE CEREBRAL ACOPLADA AO HPLC PARA TRATAMENTO COM OS FUNGICIDAS E HERBICIDAS, FLUTRIAFOL, DDT, DICOFOL, LINDANO, MANEB e PARAQUAT ........................................... 49**

**6.2.a – LOCALIZAÇÃO DA SONDA DE MICRODIÁLISE .......................... 50**

**6.3. NÍVEIS BASAIS .................................................................................... 50**

**6.4. EFEITOS DA ADMINISTRAÇAO DE 1 MM DE PARAQUAT, MANEB, DDT, DICOFOL, LINDANO E FLUTRIAFOL SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA .............................................................................................. 51**

**6.5. EFEITOS DA ADMINISTRAÇAO DE 1 MM DE PARAQUAT, MANEB, DDT, DICOFOL, LINDANO E FLUTRIAFOL SOBRE O METABOLISMO DA DOPAMINA ................................................................................................................... 56**

**7. DISCUSSÃO ........................................................................................ 58**

**8. CONCLUSÕES .................................................................................... 64**

**9. REFERÊNCIAS ................................................................................... 66**

**RESUMO**

O principal objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos comparativos da administração de diferentes tipos de pesticidas sobre atividades comportamentais e bioquimicos através da avaliação da atividade da enzima acetil colinesterase e sobre a liberação *in vivo* de dopamina (DA) estriatal. Os pesticidas deltaphos, bravik, maneb, dicofol, DDT, paraquat, lindano e flutriafol (em diferentes concentrações) foram administrados diretamente através de injeção intraperitoneal, no caso dos organofosforados e a administração diretamente no estriado através de uma sonda de microdiálise no caso dos organoclorados, herbicidas e fungicidas. Foram feitos os testes comportamentais logo após o utimo dia (7°dia) de cada tratamento e a medida da atividade da Ache feita em duas etapas. A primeira logo após o termino do tratamento e a outra 7 dias após. Os níveis de DA e seus metabólitos ácidos di-hidroxifenilacético (DOPAC) e homovalínico (HVA), obtidos nos dialisados, foram medidos por HPLC com detecção eletroquímica. A administração dos inseticidas organosfosforados deltaphos e bravik induziram deficits comportamentais e bioquimicos, sendo que foi observado deficit da atividade locomotora apenas para Deltaphos, ansiedade para as maiores doses de Deltaphos e doses intermediarias do Bravik e depressão não sendo observada com nenhum dos tratamentos. Observou-se um deficit significativo da atividade da enzima Ache 7 dias após o tratamento.

A administração de diferentes tipos de pesticidas induziu os seguintes aumentos máximos nos níveis extracelulares de DA: maneb 791±87%; dicofol 101±1%; DDT 779±32%; paraquat 956±80%; lindano 281±28%; flutriafol 218±51%. A infusao intraestriatal dos pesticidas também produziu alterações nos níveis extracelulares de DOPAC e HVA. Desta maneira, a infusao intrastriatal de DDT, lindano e flutriafol produziu aumentos tanto nos níveis de DOPAC (229±21%, 291±6% e 180±32%, respectivamente) quanto de HVA (185±3%, 308±4% e 146±11%, respectivamente), enquanto o paraquat aumentou os níveis de DOPAC (214±2%) e diminuiu os de HVA (56±3%), o mesmo efeito produzido pelo maneb sobre os níveis de HVA (58±6%). Esses resultados sugerem que diferentes classes de pesticidas, com diferentes estruturas e atividades bioquímicas, podem afetar o sistema dopaminérgico estriatal induzindo neurotoxicidade.

**ABSTRACT**

The main objective of this work was to study the comparative effects of administration of different types of pesticides on biochemical and behavioral activity by assessing the activity of the enzyme acetyl cholinesterase and on the *in vivo* release of dopamine (DA) striatal. Pesticides deltaphos, bravik, maneb, dicofol, DDT, paraquat, lindane and flutriafol (in different concentrations) were directly administered by intraperitoneal injection in the case of organophosphates and administration directly into the striatum through a microdialysis probe in the case of organochlorine, herbicides and fungicides. Behavioral tests were performed soon after last day (7 days) of each treatment and measure the activity of the Ache done in two steps. The first right after the end of treatment and after another 7 days. The levels of DA and its metabolites hidroxifenilacético di-acid (DOPAC) and homovalínico (Hva), obtained in dialysis, were measured by HPLC with electrochemical detection. The administration of deltaphos and bravik Organophosphorus insecticide induced biochemical and behavioral deficits, which was observed deficit in locomotor activity only for Deltaphos, anxiety for the largest doses of Deltaphos and middle doses Bravik and depression are not seen with any of the treatments. There was a significant deficit of the enzyme activity Find 7 days after treatment

The administration of different types of pesticides induced the following maximum increases in extracellular levels of DA: maneb 791 28%;± 80%, lindane 281 ± 32%, paraquat 956 ± 1%; DDT 779 ± 87%; dicofol 101 ± 51%. The infusion intraestriatal of pesticides has also±flutriafol 218 produced changes in extracellular levels of DOPAC and Hva. Thus, the intrastriatal infusion of DDT, lindane and flutriafol produced increases in both 32%, respectively) as of Hva± 6 ± 21%, 291% and 180 ±the levels of DOPAC (229 11%, respectively), while paraquat increased the± 4% and 146 ± 3%, 308 ±(185 3%), produced by the± 2%) and decreased those of Hva (56 ±levels of DOPAC (214 6 %). These results suggest that±same effect on the levels of maneb Hva (58 different classes of pesticides, with different structures and biochemical activities, may affect the striatal dopamine system induced neurotoxicity.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

**Figura 1:** Exemplos de frascos com formulações de maior até o menor potencial tóxico. As pontas de seta mostram a localização das tarjas, que também são usadas para informar o perigo que o produto traz. **............................................................................. 2**

**Figura 02:** Esquema da neurotransmissão colinérgica **.................................... 16**

**Figura 03:** A) hipocampo no um corte hipocampal de rato campos CA1, CA2 e CA3 além do GD e córtex entorrinal. B) fotomicrografia de um corte coronal hipocampo de rato corado por Nissl,regiões CA1, CA2, CA3 e giro dentado**....................................... 17**

**Figura 04:** Esquema da neurotransmissão dopaminérgica **................................... 20**

**Fig 05:** Aparato do Campo Aberto **................................................................... 30**

**Fig 06:** Aparato do Labirinto em cruz elevado**................................................... 31**

**Fig 07:** Aparato do Nado forçado **..................................................................... 32**

**Figura 8:** Corte coronal esquemático mostrando a inserção da sonda de microdiálise no estriado **.............................................................................................................. 36**

**Figura 9:** Procedimento cirúrgico para a colocação da cânula-guia. Nas figuras pode-se ver a fixação da cabeça do animal no aparelho de estereotaxia (A), a localização, a partir do Bregma, das coordenadas estereotáxicas (B), a colocação dos parafusos de fixação (C), a colocação da cânula (D ,E) e a sua fixação posteriormente com cimento acrílico (F). **.............................................................................................................. 37**

**Figura 10:** Representação das sondas (A) e cânulas de microdiálise **....................... 38**

**Figura 9:** Cromatograma representativo mostrando os picos registrados para as diferentes substâncias estudadas: A) DOPAC, B) DA, C) 5 – HIAA **............................. 49**

**Figura 10:** Secção coronal a fresco de um animal utilizado nos experimentos de implantação da sonda de microdiálise. O local de implantação da sonda no estriado está indicado pela seta laranja. Ao lado e abaixo está uma representação esquemática do local no cérebro do rato. Aumento de 10X. **.......................................................... 50**

**Tabela 01.** Classificação dos pesticidas segundo a dose letal 50 (DL50) **...................... 2**

**Tabela 02.** Grupos e características químicas dos pesticidas **..................................... 3**

**Tabela 03.** Classificação dos pesticidas segundo o organismo que combatem**.............. 4**

**Tabela 4:** Indice (%) de alimentos contaminados por pesticidas **................................ 24**

**Tabela 5.** Efeitos máximos observados com a perfusao intraestriatal de diferentes concentrações de paraquat e dicofol sobre os níveis extracelulares de dopamina do núcleo estriado. **....................................................................................................... 54**

**Gráfico 01.** Deltaphos e atividade locomotora **.............................................. 43**

**Gráfico 02:** Deltaphos e Comportamento de ansiedade **.................................. 44**

**Gráfico 03:** Deltaphos e Tempo de imobilidade**.............................................. 45**

**Gráfico 04**. Metil Paration e atividade locomotora**............................................... 45**

**Gráfico 05.** Metil Paration e Labirinto em cruz elevado. **...................................... 46**

**Gráfico 06.** Metil paration e teste do nado forçado. **........................................... 47**

**Gráfico 07.** Metil paration e AChE no término do tratamento **............................. 48**

**Gráfico 08.** Metil paration e AChE uma sema depois do tratamento**....................... 48**

**Gráfico 09.** Efeitos da perfusão intraestriatal de 1 mM de Maneb, Paraquat e Flutriafol sobre os níveis extracelulares de dopamina no núcleo estriado de ratos. **......................... 53**

**Gráfico 10.** Efeitos da perfusão intraestriatal de 1 mM de DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de dopamina no núcleo estriado de ratos**................................ 54**

**Gráfico 11.** Os efeitos da administraçao de paraquat, maneb, DDT, lindano, dicofol e flutriafol os níveis extracelulares de dopamina in vivo sao expressados como uma Escala Comparativa de Potência (ECP) **.................................................................... 55**

**Gráfico 12.** Efeitos máximos observados com a perfusão intraestriatal de 1 mM de paraquat, maneb, flutriafol, DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de DOPAC no núcleo estriado de ratos. **......................................................................... 57**

**Gráfico 13.** Efeitos máximos observados com a perfusao intraestriatal de 1 mM de paraquat, maneb, flutriafol, DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de HVA no núcleo estriado de ratos**................................................................................ 57**

**1. INTRODUÇÃO**

**1.1 PESTICIDAS GENERALIDADES**

Os pesticidas ou praguicidas, têm sido utilizados desde 500 a.C. e se origina a partir de um antigo desejo do homem de livrar-se das pragas que atrapalham seu modo de vida, sendo que o primeiro pesticida que se conhece foi o enxofre e apenas por volta do Século XV começou a serem utilizados elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio no combate a pragas em colheitas.

Essas substâncias ou misturas são produzidas com o objetivo de impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer tipo de praga rural ou urbano (USEPA definitions, 24 de junho de 2006). Um pesticida pode ser uma substância química ou um agente biológico (tal como um vírus ou bactéria) que é lançada de encontro com as pragas que estiverem destruindo uma plantação, disseminando doenças, etc. O aumento da população mundial e a demanda crescente de alimentos têm motivado o uso extensivo dessas substâncias nas plantações, visando assegurar maior produtividade (CALDAS, E.;SOUZA, L. C., 2000) gerando grandes impactos à saúde pública e ao meio ambiente. As nações desenvolvidas já sofreram estes problemas, e ainda enfrentam alguns problemas em determinados locais, entretanto por diversas razões, a gravidade do problema é muito mais acentuada nos países em desenvolvimento.

O uso indevido destes compostos e ainda políticas públicas de controle e eliminação insuficientes ou não atuantes contribuem em larga escala para o surto de efeitos adversos pelo qual vem passando os países em desenvolvimento. A quantidade de produtos usados como pesticidas atualmente é enorme e não são necessariamente venenos, porém quase sempre são tóxicos; são cerca de 300 princípios ativos e mais de 2000 formulações comerciais no Brasil. Devido essa grande diversidade de produtos, é importante conhecer a classificação destes.

**1.1.a CLASSIFICAÇÃO DOS PESTICIDAS**

A OMS elaborou a classificação de pesticidas segundo o perigo que estes podem ocasionar à saúde em exposição aguda. Sendo que três classes de classificação são as mais utilizadas.

**1.1.b Classificação segundo a Toxicidade:**

A classificação foi baseada nos valores da Dose Letal de 50 % (DL50)

**Tabela 01.** Classificação dos pesticidas segundo a dose letal 50 (DL50) para o rato

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Substância Química*** | ***DL50 Oral (MG/Kg)*** | ***Dose letal provável para o homem adulto*** |
| **Extremamente tóxico** | 5 | **Algumas gotas** |
| **Altamente tóxico** | 5 – 50 | **Algumas gotas a 1 colher (chá)** |
| **Medianamente tóxico** | 50 – 500 | **1 colher (chá) a 2 colheres (sopa)** |
| **Pouco tóxico** | 500 – 5000 | **2 colheres (sopa) a 2 copos** |
| **Levemente tóxico** | **5000** | **2 copos a 1 Litro** |

Nota: Os valores de DL50 referem-se aos pesticidas comercializados na forma sólida e os efeitos observados são dos princípios ativos. Fonte: Gallo, 1988 p.310



**Figura 1:** Exemplos de frascos com formulações de maior até o menor potencial tóxico. As pontas de seta mostram a localização das tarjas que também é usada para informar o perigo que o produto traz. Fonte: (ANDEF, 2001)

**1.1.c Classificação segundo o Grupo Químico:**

Este modelo foi elaborado através da análise dos componentes químicos encontrados nas formulações.

**Tabela 02.** Grupos e características químicas dos pesticidas

|  |  |
| --- | --- |
| *Grupo* | *Características químicas* |
| ***Organofosforados*** | Compostos orgânicos devivados do ácido fosfórico, tiofosfórico ou ditiofosfórico. |
| *Carbamatos* | São ésteres derivados dos ácidos n-metil ou dimetil carbâmico. |
| *Organoclorados* | São compostos a base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do ciclobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno. |
| *Ditiocarbamatos* | São carbamatos que contêm, quase sempre, um metal na sua estrutura química. |
| *Dipiridilos* | São herbicidas sólidos, insípidos e inodoros e muito solúveis em água. |
| *Piretróides* | São compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do crisântemo. |
| *Neonicotinóides* | São compostos que apresentam estrutura química semelhante à nicotina, possuindo efeito biológico similar a esta. |

Fonte: OPAS-OMS (Brasil), 1996- Adaptada

**1.1.d Classificação segundo os Organismos que Combatem:**

Nessa terceira classificação, os pesticidas foram agrupados segundo sua utilização no combate a determinados organismos.

**Tabela 03**. Classificação dos pesticidas segundo o organismo que combatem

|  |  |
| --- | --- |
| ***Tipode Pesticida*** | ***Alvo de Ataque*** |
| *Acaricida* | Compostos que combatem escorpiões, aranhas, ácaros. |
| *Antimicrobiano* | Compostos que combatem micróbios |
| *Avicida* | Compostos que combatem pássaros |
| *Fungicida* | Compostos que combatem fungos |
| *Herbicida* | Compostos que combatem plantas e ervas daninha |
| *Inseticida* | Compostos que combatem insetos |
| *Moluscicida* | Compostos que combatem caracóis e lesmas |
| *Piscicida* | Compostos que combatem peixes |
| *Rodenticidas*  *Raticida* | Compostos que combatem roedores  Que combate ratos |

Fonte: (Baird, 2002)

**1.2 PRINCIPAIS GRUPOS DE PESTICIDAS E SUA TOXICIDADE**

**1.2.a Organoclorados**

Os pesticidas orgânicos, que apresentam átomos de carbono em sua estrutura, constituem o maior grupo de produtos com alta atividade fisiológica. As principais classes desses compostos são os organoclorados (OC) e os organofosforados (OF). Os organoclorados apresentam em sua estrutura átomos de carbono e cloro e surgiram comercialmente na década de 40 geralmente usados para o combate a insetos (inseticidas). Aldrin, dieldrin, clordano, hexaclorobenzeno, mirex e DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) são exemplos de compostos desse grupo.

O DDT foi sendo lentamente restringido e sofrendo gradativa substituição, a partir de 1957, pelos organosfosforados e em menor escala pelos carbamatos (Gallo & Lawryk, 1991), após a exposição na mídia pela bióloga norte-americana Rachel Carson dos males causados pelo uso do organoclorado DDT em seu livro “*Primavera Silenciosa” e*  as constatações da grande capacidade de acumulação no meio ambiente (persistindo até 30 anos no solo). No Brasil, o uso dos organoclorados foi limitado pela Portaria n° 329, de 2/9/85, que permitiu sua utilização somente no controle de formigas (Aldrin) a em campanhas de saúde pública (DDT) e atualmente, é proibido em pelo menos 86 países.

Os organoclorados são estimulantes do SNC, sendo seus efeitos manifestados principalmente por convulsões ou ainda outros sinais menos severos de toxicidade neurológica como: parestesia, agitação involuntária, ataxia e hiperreflexia. Estes sinais podem ser conseqüência de ações a nível molecular tais como aumento da concentração de amônia livre, diminuição dos níveis de GABA (ácido γ-aminobutírico) e da concentração de Acetilcolina. Também foi demonstrado que o DDT e DDOH (um metabólito do DDT) diminuem a captação de colina dependente de sódio em sinaptossomos de hipocampo de camundongos imaturos (Eriksson & Nordberg, 1986).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Inseticida + Acaricida- Organoclorado:**  **Diclorodifenilcloroetano (DDT): Extremamente Tóxico** | (1,1,1-Tricloro-2,2-bis-(4-clorofenil)-etano). Salvou várias vidas no controle de pragas como a malária, porém sua persistência e lipofilicidade causou a morte de vários animais. O DDT é altamente persistente em solos com t1/2 de cerca de 1,1 a 3,4 anos. Também exibe altos fatores de bioconcentração. No ambiente, o DDT tem alta reatividade e atua como interferente endócrino. Ele é metabolizado para DDD e DDE, sendo o DDE produto de degradação da maioria das reações que ocorrem no meio ambiente. | **Formula DDT** |
| **Acaricida- Organoclorado:**  **Hexaclorocicloexanos(HCH):** **Extremamente Tóxico** | (1,2,3,4,5,6-Hexaclorocicloexano. O “HCH técnico” é uma mistura de vários isômeros, incluindo α-HCH (60-70%), β-HCH (5-12 %) e γ-HCH (10-15%). Os HCH são menos bioacumulativos que outros organoclorados devido as suas baixas lipofilicidades, enquanto as altas pressões de vapor facilitam o transporte para longas distâncias na atmosfera. Lindano (γ-HCH) é utilizado como pesticida e preservante de madeira. Apresenta t1/2 no solo superior a 1 ano e atua como interferente endócrino. | formula lindano |

**1.2.b Organofosforados e carbamatos**

Os carbamatos e organofosforados são os pesticidas que vêm sendo usados com maior freqüência na agricultura e no ambiente doméstico (Singh *et al.*, 1995). O combate a vetores transmissores de doenças, como a malária, também é feito através destas substâncias (Carlton *et al.*, 1998), como exemplos de formulações podemos citar: diazinon (Diacap®), triclorfon (Dylox®), monocrotofos (Azodrin®), disulfoton (Di-Syston®), metamidofos (Monitor®) e metil paration (Bravik®). Como exemplos de carbamatos: carbofuran (Furadan®), aldicarb (Temik®), carbaril (Sevin®), tiodicarb (Larvin®), carbosulfan (Advantage®) e promecarb (Carbamult®).

O uso de compostos organofosforados (OF’s) iniciou-se a partir da década de 1950 em substituição aos organoclorados, como DDT, que tiveram seu uso proibido e/ou restrito, devido à toxicidade apresentada sobre o homem e os impactos ambientais provocados pela bioacumulação desses compostos ao longo das cadeias alimentares (STOCKER, SEAGER, 1985; BAIRD, 2002), são empregados principalmente como inseticidas usados para combater insetos domésticos e pragas de uma grande variedade de culturas cereais e de vegetais. Oferecem como vantagem a fácil degradação, ou seja, são compostos do tipo não persistentes, fato que minimiza a ameaça ao ecossistema, pois não se acumulam nos organismos humanos e nem ao longo das cadeias alimentares como ocorre com os organoclorados (BAIRD, 2002), entretanto, apresentam alta toxicidade.

O envenenamento devido à exposição direta a esses inseticidas é comum entre os trabalhadores rurais (BAIRD, 2002). Sua ação principal é sobre as colinesterases, em especial a Acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a Acetilcolina liberada na fenda sináptica do terminal colinérgico estes compostos ligam-se irreversivelmente à enzima acetilcolinesterase (AChE), envolvida na transmissão dos impulsos nervosos entre as células nervosas causando sinais típicos de distúrbio colinérgico, podendo, dependendo da gravidade, levar a uma falência cárdio-respiratória e à morte (STOCKER, SEAGER, 1985). Essa transmissão é realizada pela acetilcolina, um neurotransmissor que se liga à membrana pós-sináptica. Os carbamatos causam uma carbamilação reversível da enzima o que provoca como conseqüência, um acúmulo de Acetilcolina nas uniões mioneurais do músculo esquelético e nos gânglios autonômicos assim como no cérebro (efeitos sobre o Sistema Nervoso Central – SNC) (Taylor, 1985 e Marrs, 1993).

Os principais sintomas de intoxicação aguda por organofosforados e carbamatos logo após a exposição são suor abundante, salivação intensa, lacrimejamento, fraqueza, tontura, dores e cólicas abdominais, visão turva e embaçada, dentre outros. Em um tempo maior depois da exposição podem-se observar pupilas contraídas – miose –, vômitos, dificuldade respiratória, tremores musculares, convulsões (OPAS/OMS, 1996). Em casos de intoxicação grave, os sintomas são convulsões tônico-clônicas generalizadas, trastornos psíquicos, coma e morte por falência cardíaca ou respiratória (OPAS/OMS, 1996).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Inseticida + Acaricida- Organofosforado:**  **DELTAPHOS (DELTAMETRINA + TRIAZOFÓS): Extremamente Tóxico** | Potencial extremamente tóxico aplicado preferencialmente nas folhas é capaz de ser adsorvido e causar grandes impactos a todos os organismos e ao ambiente com alto grau de persistência tanto no meio ambiente como nos organismos humanos. Estudos mostram que o triazofós é rapidamente eliminado, mas a deltametrina apresentou um percentual de acumulação. A meia-vida plasmática foi de 10 a 11,5 horas e a excreção urinária representou mais de 50% da dose ministrada com meia-vida de 10 - 13,5 horas. Os metabólitos excretados pela urina eram derivados dos ácidos m-fenoxibenzóicos e ácidos becistêmicos e não da deltametrina. O principal caminho de metabolização é hidrólise de éster e de algumas hidroxilações, ou seja, semelhante à via de degradação encontrada nos mamíferos. | formula_deltametrina |
| **Inseticida + Acaricida- Organofosforado:**  **METIL- PARATION (BRAVIK): Extremamente Tóxico** | (O,O-Dietil-O-4-nitro-feniltiofosfato) é extremamente poderoso com pobre poder residual mas altamente tóxico, tem um baixo potencial tóxico para contaminar as águas do subsolo. Os resíduos deste composto podem persistir por muitos anos, mas normalmente ficam nos 15cm superficiais do terreno havendo fotodegradação podendo converter o paration em um composto ativo muito mais tóxico. As vias de exposição podem ser através da inalação, por ingestão ou através dos olhos ou pés. | **[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/eb/Methyl%26Ethylparathion.png/160px-Methyl%26Ethylparathion.png](http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Methyl&Ethylparathion.png)** |

**1.2.c Tio e ditiocarbamatos**

Nos campos, jardins e lavouras, é freqüente o uso de compostos do grupo dos tio e ditiocarbamatos como fungicidas. Há uma quantidade elevada de formulações no mercado, sendo o maneb (Maneb 800®), mancozeb (Manzate GRDA®), Propineb (Positron Duo®) e Etileno-bis-ditiocarbamato de manganês (Manzate®) exemplos de compostos.

Os tio e ditiocarbamatos são considerados de toxicidade aguda média, sendo degradados rapidamente e não se acumulando nos tecidos gordurosos. Por se degradarem parcialmente a dissulfeto de carbono (CS2) no organismo, suspeita-se que metabólitos de alguns compostos apresentem um papel nos efeitos neurotóxicos causando disturbios no sistema de neurotransmissão (Costa, 1988; Gagnaire *et al.*, 1986), o maneb, por exemplo, apresenta o elemento manganês ligado a sua estrutura, onde acredita-se que esse complexo pode produzir estresse oxidativo, acarretando em morte neuronal, em especial da substância negra, com potencial em causar Doença de Parkinson (Fitsanakis *et al.*, 2002). Muitos desses produtos foram proibidos em diversos países também em virtude de seu efeito altamente cancerígeno. As impurezas produzidas pela fabricação dos compostos desse grupo, como o etileno-etiluréia (ETU), estão sendo apontadas como as causadoras de muitos efeitos carcinogênicos observados em animais de laboratório (adenocarcinoma de tireóide), além de efeitos teratogênicos e mutagênicos (OPAS/OMS, 1996).

Esses pesticidas também alteram a atividade de vários sistemas enzimáticos, incluindo a AChE e a ATPase (Kackar *et al*., 1999; Pentyala & Chetty, 1993; Savolaine & Hervonen, 1985). Também sendo descrita a ação sobre o sistema dopaminérgico nigro-estriatal, onde diminuem a captação de dopamina de alta afinidade e o número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (Defazio *et al.*, 1996). Os efeitos de sua intoxicação incluem cefaléia com vertigem, náuseas e vômitos, ansiedade e excitação, sendo comum o aparecimento de dermatite, faringite, bronquite e conjuntivite em caso de contato com as vias respiratórias e com a pele (OPAS/OMS, 1996),

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Fungicida Ditiocarbamato:**  **MANEB: Altamente Tóxico** | Por ser um produto com ação de contato, MANEB 800 deve ser aplicado em quantidade de água suficiente para uma cobertura completa e uniforme das plantas. Os ditiocarbamatos são irritantes das mucosas, causando faringite, rinite, laringite, traqueobronquite e conjuntivite; em contato prolongado com a pele podem causar dermatite. Em casos de ingestão causam irritação da mucosa gástrica, com ardor epigástrico, náuseas e vômitos. | maneb |

**1.2.d Dipiridilos**

São comumente usados como herbicidas sendo o paraquat o principal exemplo, comercializado com o nome de Gramoxone®. é bastante perigoso, pelo seu elavado poder tóxico, quando em solução, aparenta muito a refrigerantes de cola, daí o elevado número de crianças que o ingeriram acidentalmente, mas casos de suicídios também são relatados (OPAS/OMS, 1996; Serra *et al.*, 2003). Podemos ainda citar os dipiridilos glifosato, pentaclorofenol e diquat (Reglone®).

A principal via de entrada do paraquat no organismo é através da respiração, podendo provocar lesões hepáticas e renais, irritação grave das mucosas e fibrose pulmonar irreversível, causando tardiamente insuficiência respiratória, e ocasionalmente óbito (OPAS/OMS, 1996), sua neurotoxicidade dá-se através da formação anormal de espécies de oxigênio reativas, expondo as células a altas taxas de radicais livres bastantes lesivos (Mollace *et al.*, 2003). O paraquat também acarreta na depleção do NADP, nucleotídeo responsável pelo transporte de elétrons para a fosforilação oxidativa, que quando está diminuído, praticamente não há síntese de ATP. Isso acaba por produzir íons peróxidos, que ao se decompõem em grupos oxidrilo (por ação de uma enzima peróxido desmutase) irão oxidar os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios de membrana (Bus & Gibson, 1979) das diferentes organelas celulares, alterando a permeabilidade com conseqüente parada do transporte de membrana e depois a morte celular.

Esses efeitos são muito pronunciados nos neurônios dopaminérgicos do núcleo estriado e substância negra (Brooks *et al.*, 1999), levando a uma mudança nos níveis de dopamina (Yoshimura *et al*., 1993) e degeneração seletiva destes neurônios.

Os sinais e sintomas do contato e intoxicação por dipiridilos, em especial o paraquat, podem ser: sangramento pelo nariz, mal-estar, fraqueza e ulcerações na boca, conjuntivite ou opacidade da córnea, unhas quebradiças (OPAS/OMS, 1996), ansiedade, convulsões, ataxia e diminuição do estado de vigília (Honoré *et al.*, 1994).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Herbicida Dipiridilo:**  **PARAQUAT:** **Altamente Tóxico** | É um composto sólido cristalino, instável em meio alcalino, solúvel em água, pouco solúvel em alcool e insolúvel em solventes orgânicos não polares. É altamente perigoso para os humanos, caso ingerido. Por ser hidrossolúvel, tem pouco absorção pela pele. Depois de ingerido ou inalado, o herbicida acumula-se em órgão alvo tais como o cérebro, rins, pulmão e fígado. | **Formula do Paraquat** |

**1.2.e Piretróides**

Os piretróides são bastante efetivos contra pragas de insetos na agricultura. Há uma variedade muito grande de formulações destes pesticidas, onde podemos encontrar tetrametrin (Neo-Pynamin®), permetrin (Ambush®, Astro®, Dragnet®), bifentrin (Capture®, Talstar®), deltametrin (Decis®) e acrinatrin (Rufast®).

Mesmo em baixas dosagens, os pesticidas piretróides apresentam uma considerável ação inseticida, razão pela qual possuem grande difusão no ambiente doméstico e na agropecuária (Ware & Whitacre, 2004; OPAS/OMS, 1996). Nas residências, é comum o uso de *sprays* à base de piretróides no combate a insetos como baratas e mosquitos. As exposições aos piretróides podem acarretar no aparecimento de uma dermatite de contato, onde se observa irritação das conjuntivas e mucosas, sensação de formigamento nas pálpebras e lábios, e as reações respiratórias alérgicas (espirros, rinite, hiperreatividade bronquial). Pode aparecer coceira intensa, manchas na pele, reação aguda de hipersensibilidade, excitação e convulsões (OPAS/OMS, 1996).

Com base em estudos em animais experimentais (ratos), dividiu-se em dois tipos os compostos piretróides em relação aos seus efeitos tóxicos: no primeiro, denominado de Tipo I, encontram-se compostos que geram sensibilidade aumentada a estímulos externos, tremores suaves que se espalham pelo corpo e prostração. O segundo , Tipo II, são compostos que induzem a vontade de escavar e esconder-se, provocam salivação profusa e tremor grosseiro progredindo para uma fraqueza crônica (Verschoyle & Aldridge, 1980). Estes pesticidas também estimulam a atividade cerebral e produzem lesões duradouras ou permanentes no sistema nervoso periférico. Kakko *et al.* (2003) descreveram que esse grupo de substâncias diminui a atividade da Na+-K+ ATPase em sinaptossomos.

A principal forma de ação dos piretróides no SNC é sobre os canais de sódio dependentes de voltagem (CSDV). Esse grupo de pesticidas torna mais lenta a abertura dos CSDV quando ativados, assim como aumenta o tempo para o fechamento dos mesmos, quando inativados, permitindo que haja um maior influxo de sódio e despolarização da membrana, ou seja, estes pesticidas produzem uma hiperpolarizaçao da membrana. A interação dos compostos Tipo I com os CSDV faz desencadear um disparo repetitivo dos potenciais de ação, ao passo que os do tipo II agem sobre os mesmos canais de tal maneira que a geração do potencial de ação não mais seja possível por logos períodos (Narahashi, 1996; Ray, 2001 e Shafer *et al.*, 2005).

**1.3. EFEITOS TOXICOS da EXPOSIÇÃO HUMANA a PESTICIDAS**

A exposição a pesticidas tem efeitos profundos sobre o sistema nervoso, sendo bem estabelecidas as conseqüências impostas à exposição de altas concentrações destes compostos gerando uma infinidade de sintomas como déficits neurocomportamentais e anormalidades nas funções normais do sistema nervoso.

As exposições consideradas crônicas ainda não têm sua neurotoxicidade muito bem conhecida, tendo algumas controvérsias, mas, há prováveis associações com o aumento de doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Doença de Alzheimer em longo prazo. (Lundberg *et al*., 1997; Letz *et al*., 1996; Alavanja *et al*., 2004). Em contrapartida as intoxicações agudas provocadas pelos diferentes compostos já citados, provocam quadros já bem caracterizados como o caso de superestimulação de receptores colinérgicos pós-sinápticos, seguida de inibição da AChe pelos organofosforados ou ainda a depleção de NADP causada pelo Paraquat que irá produzir significativa morte de neurônios dopaminérgicos do núcleo estriado e substância negra através da decomposição de íons peróxido. Vemos então que a exposição a estes compostos podem acarretar diversos disturbios no sistema de neurotransmissão como o sistema colinérgico e dopaminégico.

Dados epidemiológicos descritos em humanos indicam que a exposição a pesticidas pode ser um risco ambiental para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas como Parkinson e Alzheimer (Barbeau *et al.*, 1986; Cannas *et al.*, 1991; Butterfield *et al.*, 1993; Fleming *et al.*, 1994). No caso da Doença de Alzheimer, sabe-se que é uma patologia caracterizada por alterações neuropatológicas e neuroquímicas específicas, estudos apontam uma grande diminuição da Colina Acetiltransferase (ChAT) e AChE nos casos da doença (Davis *et al.*, 1976; Perry *et al.*, 1977), outros relatam a ocorrência de estresse oxidativo por radicais livres como um dos fatores de risco (Frolich & Riederes, 1995).

A etiologia da doença ainda não está bem estabelecida, sugere-se que pode ser conseqüência de processos multifatoriais envolvendo tanto pré-disposição genética quanto exposição a fatores ambientais modulados por processos biológicos de envelhecimento (Gauvreau, 1987).

Estudos revelam uma alta prevalência da doença de Alzheimer no meio rural em relação ao urbano (Shibayama *et al.*, 1986; Jean *et al.*, 1996). Este dado está de acordo com o fato de os pesticidas estarem sendo utilizados em larga escala no meio rural para o controle de pragas. Entretanto, esta evidência tende a alterar-se uma vez que o uso de pesticidas no ambiente urbano está aumentando devido à crescente industrialização. Outros estudos realizados em locais de trabalho têm identificado lesões no SNC e desordens neurofisiológicas devido à exposição a pesticidas (Boyd *et al.*, 1990; Reidy *et al.*, 1992; Steenland *et al.*, 1994; Stephens *et al.*, 1995).

**1.4. O SISTEMA COLINÉRGICO CENTRAL**

Costuma-se dividir o sistema colinérigo em seis grupos de células ou feixes colinérgicos no SNC, com a denominação “Ch” e seus respectivos números (Mesulam *et al.*, 1983). A região septal possui os dois primeiros grupos de neurônios colinérgicos (Ch1, no septo medial, e Ch2, no limbo vertical do núcleo da banda diagonal de Broca); daí partem as principais projeções para o hipocampo. O grupo Ch3 relaciona-se com as células do limbo horizontal do núcleo da banda diagonal de Broca, enquanto que a amígdala e o neocórtex fazem parte do grupo Ch4. Finalmente, Ch5 e Ch6 estão localizados no tálamo

A acetilcolina é o neurotransmissor no sistema colinérgico e é a síntese entre AcetilCoenzima A e Colina catalisada pela Colina Acetiltransferase (ChAT), com a posterior liberação da Coenzima A. A disponibilidade de colina pode ser seriamente comprometida por ser extremamente dependente da dieta (fonte exógena), ou seja, não é sintetizada pelo tecido nervoso ou qualquer outro tecido - a colina, vinda da dieta, pode seguir dois rumos: será recrutada para a formação de fosfolipídios de membrana ou estará disponível para a síntese da acetilcolina. A acetil CoA não apresenta essa limitação, por ser derivada de várias rotas metabólicas.

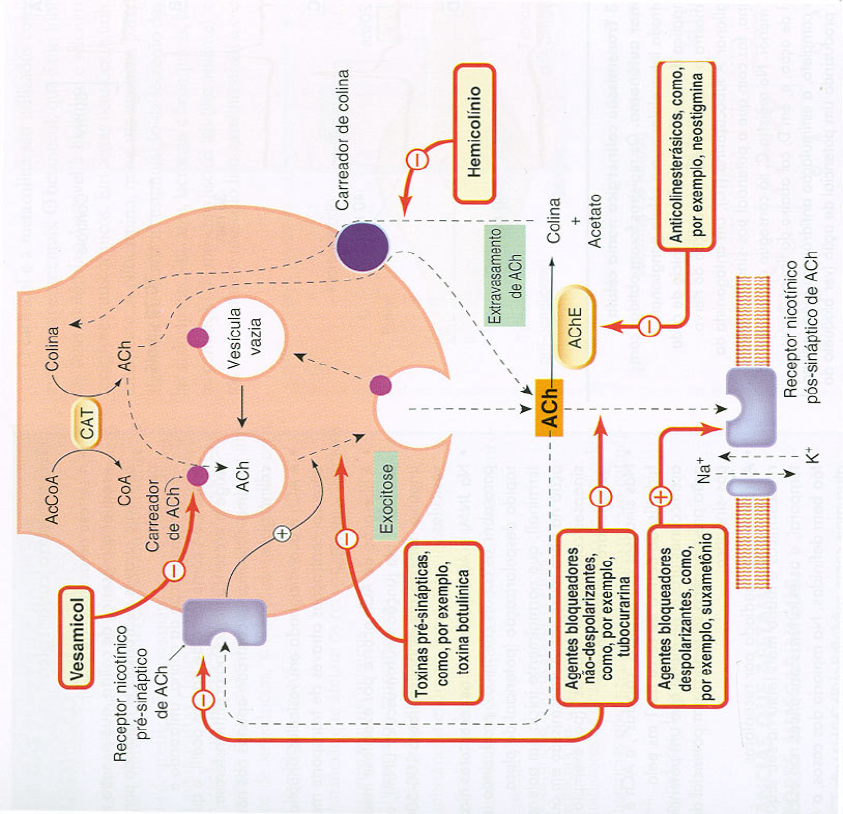
Após a excitação de um neurônio colinérgico, há a liberação da acetilcolina na fenda sináptica que agirá sobre receptores de membrana pós e pré – sinápticos, levando ao aparecimento de uma resposta celular(Arneric *et al*, 1995). Existem dois tipos de receptores para a acetilcolina - nicotínicos e muscarínicos - com ações bastante diferentes de acordo com o sítio de origem no sistema nervoso. Os receptores nicotínicos são ionotrópicos, ou seja, quando há a ligação da acetilcolina ou da nicotina aos mesmos, abrem-se canais de Na+ e K+ e há o influxo desses íons com conseqüente efeito, despolarizando a célula. Esses receptores são encontrados principalmente nos gânglios e nas junções neuromusculares (Racké & Matthiesen, 2004). Os receptores muscarínicos, por outro lado, são metabotrópicos, desencadeando, quando estimulados pela acetilcolina ou muscarina (substância obtida da planta *Amanita muscaria*), uma cascata de fosforilação e ativação de determinadas proteínas até seus produtos atuarem em algumas ou diversas partes da célula; são bem mais disseminados no cérebro do que os receptores nicotínicos e são largamente encontrados no músculo liso e nas glândulas inervadas pelos nervos parassimpáticos (Racké & Matthiesen, 2004).

Essas moléculas não podem ficar por muito tempo na fenda para que não haja uma super estimulação por isso é importante que seja feita sua degradação pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) em Acetato e Colina e a posterior captação através do tranpostador de colina (TCh) dessas que serão o substrato para os novos neurotransmissores. Uma vez verificada que a maioria da colina captada é utilizada para a síntese de acetilcolina e esta depende da ChAT para a sua formação, muitos autores acreditam e suportam a idéia de que a captação de colina e a ChAT são sistemas conjugados (Barker *et al*, 1975), e que os seus estados de equilíbrio estão intrinsecamente ligados à atividade neuronal(Simon *et al*, 1976), podendo ser um ótimo método de se avaliar a atual situação do sistema colinérgico (Atweh *et al*, 1975; Simon *et al*, 1975).

Dados da literatura apontam uma significativa redução dos fosfolipídios de membrana em casos de depressão do sistema colinérgico. Nesse caso há o metabolismo anormal das maiores moléculas de membrana, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, que correspondem 75-80% do total dos fosfolipídios encontrados nas membranas das células cerebrais (Nitsch *et al.*, 1992; Zapata *et al.*, 2000). A redução nos fosfolipídios deve-se principalmente à tentativa da célula em suprir o aporte necessário de colina (fonte endógena), em níveis baixos em doenças neurodegenerativas, através da degradação da fosfatidilcolina e conseqüente liberação da colina para a síntese do neurotransmissor. Esse evento de degradação dos fosfolipídios de membrana pode fundamentar o lento progresso de morte neuronal em doenças neurodegenerativas crônicas, como é o caso da Doença de Alzheimer (Farooqui *et al.*, 1994).

Áreas como o estriado, bulbo olfatório, tálamo, córtex e sistema septo-hipocampal, entre outras, são inervadas pelos neurônios colinérgicos.

**1.4.a A neurotransmissão colinérgica**



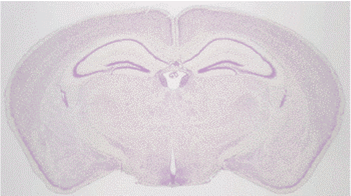
**Figura 02:** Esquema da neurotransmissão colinérgica: (síntese do neurotransmissor, sua liberação na fenda sináptica, degradação e posterior recaptação) **Fonte:** SILVA, P. 2006

**1.4.b O Hipocampo**

O hipocampo é uma complexa estrutura do córtex cerebral, é envolvida pela curvatura dos ventrículos laterais e faz parte de um grupo de estruturas dentro do sistema límbico, tipicamente chamado de formação hipocampal, envolvendo o giro dentado(GD), o hipocampo propriamente dito, o prosubículo, subículo, presubículo e parasubículo e o córtex entorrinal (Lopes da Silva  Arnolds, 1978). O hipocampo e outras estruturas são mostrados na figura 02.

O hipocampo propriamente dito é ainda subdividido, nos humanos, em CA1, CA2, CA3 e CA4 (CA para o termo em latim *Cornus Ammonis*). No rato, o último campo não é evidente. Os campos (ou regiões) CA2, CA3 e CA4 são formados por neurônios piramidais gigantes; CA1 é formado por piramidais não gigantes e o GD apresenta células granulares, sendo de tamanho bem inferior às outras populações de células da região hipocampal.

**A) B)**

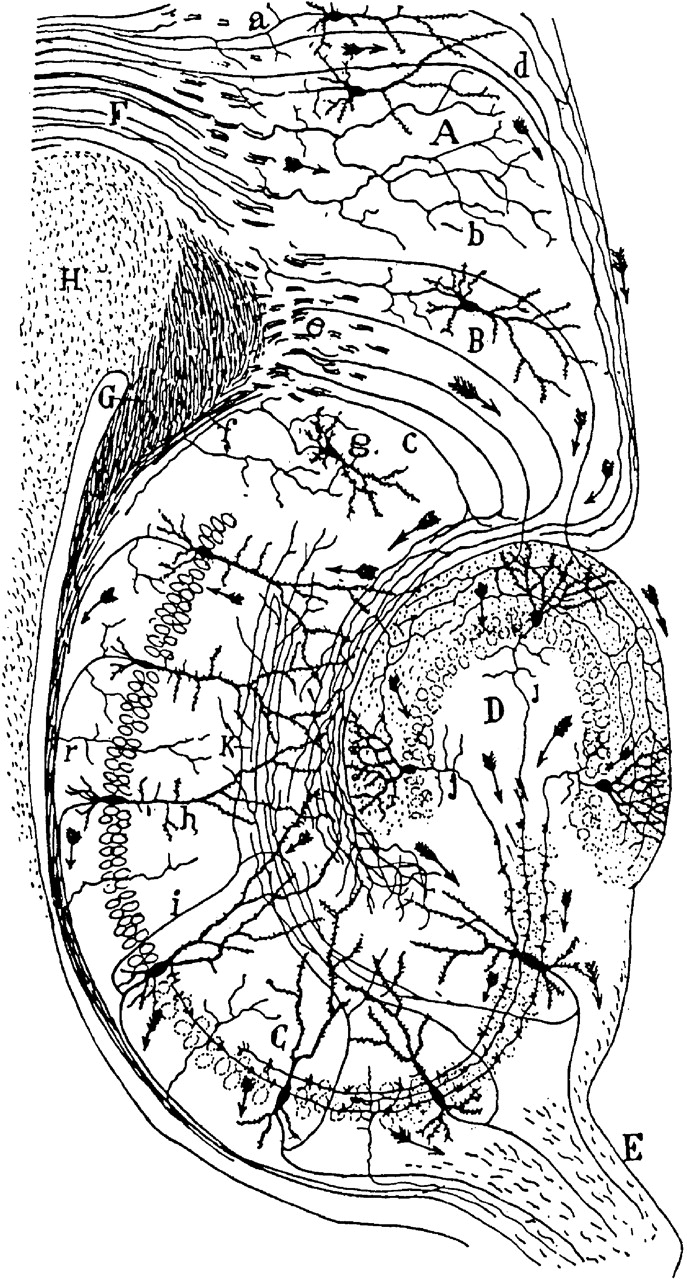


CA1

CA2

CA3

Giro dentado (GD)



**GD**

**CA3**

**CA1**

**Córtex Entorrinal**

(fonte: Ramón y Cajal, 1911)

**Figura 03**: **A) hipocampo** noum corte hipocampal de rato campos CA1, CA2 e CA3 além do GD e córtex entorrinal (fonte: Ramón y Cajal, 1911). Em **B)** uma fotomicrografia de um corte coronal hipocampo dorsal de rato corado por Nissl, mostrando as regiões CA1, CA2, CA3 e giro dentado.

As fibras que chegam à região hipocampal principalmente através do córtex entorrinal e projetam-se diretamente para o GD e CA3 através da via perfurante, sendo que neurônios CA3 recebem inervação do GD através de um feixe chamado fibra musgosa. Estas mandam axônios para CA1 através dos colaterais de Schaffer. A região CA1 manda axônios para o subículo, que por sua vez enviam os principais eferentes do hipocampo de volta para o córtex entorrinal, formando um *loop*. Na região CA2, encontram-se projeções meio difusas e espersas em direção ao CA – pelas várias evidências de participar dos processos de memória, o hipocampo tem sido objeto de extensos estudos, no esforço em se entender as funções relacionadas com a aprendizagem e memória.

Em relação aos pesticidas, sabe-se que a maioria deles apresenta ação sobre o SNC, agindo diretamente sobre vários eventos fora e dentro dos neurônios tornando evidente que a fisiologia neuronal pode ser alterada por efeito de pesticidas através de diversos mecanismos de ação. Como inibição de sistemas enzimáticos, ação nos sistemas de transporte de membrana, sobre a permeabilidade de membrana, sobre o metabolismo interno dos neurônios e através da produção de radicais livres, entre outros. Entretanto, esses dados ainda são incompletos, sendo os mecanismos de ação neurotóxicos de grande parte dos princípios ativos usados desconhecidos.

No entanto, sabe-se que um dos efeitos produzidos por grande parte dos pesticidas é a ação sobre o sistema colinérgico (Taylor, 1985; Marrs, 1993). Isso pode estar relacionado a diversos processos patológicos, incluindo a perda de memória, cognição, atenção, desvio do comportamento e dos movimentos, bem característicos das doenças de Alzheimer e de Parkinson, principalmente.

**1.5. SISTEMA DOPAMINÉRGICO**

A transmissão dopaminérgica esta organizada de forma que suas principais projeções são enviadas para regiões especificas dos Núcleos da Base e Sistema Límbico do cérebro sendo identificadas projeções em direção ao estriado, originando-se a partir da substância negra e as projeções da área tegmental ventral para o tubérculo olfatório, núcleo acumbens e córtex pré-frontal (modificado de Gerfen, 2000).

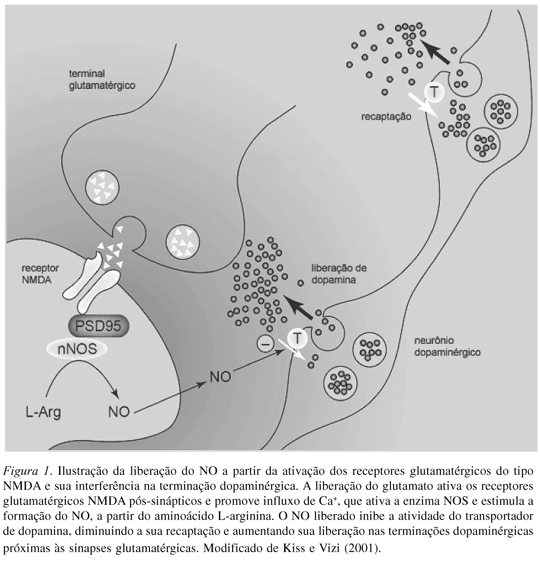
As dopaminas e as catecolaminas, noradrenalina(NA) e a adrenalina (A) são em geral sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, que é captado diretamente da circulação sanguínea e obtido através da alimentação ou sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina no fígado. A síntese desse neurotransmissor envolve duas etapas: primeiro a tirosina sofre uma hidroxilação por ação da enzima tirosina hidrolixase (TH), sendo transformada então em L- DOPA, tendo como cofatores o oxigênio molecular e a tetrahidropteridina (BH4); a segunda etapa dessa reação consiste da dexcarboxilação da L-DOPA por ação da enzima DOPA descarboxilase originando-se a dopamina sendo essa última enzima diferente da TH, pois não é específica para o substrato, podendo ser encontrada em outros tipos celulares além dos neurônios dopaminérgicos, além disso, não é um fator limitante na síntese de dopamina (Nedergaard, 1988).

Nos terminais dopaminérgicos, o neurotransmissor sintetizado no citoplasma pode ser liberado diretamente ao espaço sináptico ou ser transportado ao interior das vesículas sinápticas para ser liberado por exocitose, nesse último processo a dopamina contida em vesículas é liberada ao exterior após a fusão da membrana da vesícula com a membrana pré-sináptica da célula. A recaptação de DA é realizada diretamente através do transporte desta substancia para dentro do terminal juntamente com Na+ e Cl-. A DA é então degradada para ser usada posteriormente para síntese, as enzimas responsáveis pelo catabolismo da DA são a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O\_metiltransferase (COMT), que se distinguem inicialemnte por sua localização.

A enzima MAO é localizada na membrana externa das mitocôndrias, portanto intraneural, a COMT é uma enzima extraneural que atua fundamentalmente na fenda sináptica. Esta localização distinta de ambas enzimas gera ainda outra importante diferencça dado que a COMT age diretamente sobre a DA que é liberada no espaço sináptico e a MAO age sobre a DA que é recaptada antes que esta volte a ser reutilizada (Bradford, 1988; Cardinalli, 1992). A enzima MAO, na presença de oxigênio molecular, transforma a DA em Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), esse metabolito pode ser convertido, pela ação da COMT, em Ácido homovanílico (HVA) ou a enzima COMT pode transformar a DA liberada em 3-metoxitiramina (3-MT) que, por ação da MAO é convertida também em HVA.

O sistema dopaminérgico tem recebido uma atenção significativa devido ao papel importante que exerce no SNC, especificamente sobre o controle do sistema motor, a cognição, a “recompensa” (reforço positivo da recompensa obtido durante a alimentação, a atividade sexual, a estadia em locais particularmente agradáveis e experiências associadas ao prazer) e a regulação endócrina. A dopamina é o neurotrasnmissor utilizado pela via nigro-estriatal e possui um papel modulador do controle dos movimentos voluntários com funções exercidas também no estriado, de grande importância clínica a varias doenças neurológicas como Parkinson ou esquizofrenia. Quando ocorre uma forte diminuição nos níveis de dopamina ou suas ações são farmacologicamente bloqueadas, aparece uma síndrome parkinsoniana com hipocinesia e rigidez muscular, ainda que, do ponto de vista quantitativo, constituam somente uma pequena parte dos neurônios cerebrais, os neurônios dopaminérgicos têm uma grande importância funcional (Bradford, 1998; Oak *et AL.,* 2000; Chinta e Andersen, 2005)

**1.5 a NEUROTRANSMISSÃO DOPAMINÉRGICA**

**Figura 04: Esquema da neurotransmissão dopaminérgica: liberação do neurotransmissor na fenda sináptica e sua posterior recaptação em vesiculas. Fonte:** Kiss e Vizi, 2001

**1.6. PESTICIDAS e IMPACTOS AMBIENTAIS**

O uso extensivo desses compostos como inseticida doméstico e no combate às pragas na agricultura e pecuária deixa resíduos nos alimentos, na vegetação e também representa uma das principais fontes de poluição dos solos, subsolos e corpos de água doce. Esse fato representa um grande problema porque muitos compostos OF’s apresentam elevada toxicidade ao homem e demais animais (DRISS et al., 1993).

O uso de pesticidas dobrou desde a década de 50, e cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são usadas agora todos os anos e devido ao crescente avanço industrial e crescimento populacional com conseqüente aumento da demanda e da produção de alimentos, gerando uma larga produção e utilização de pesticidas no meio rural, para controle de pragas, introduzindo essas substancias em grande quantidade também nos meios domiciliares urbanos.

Os pesticidas, aplicados de modo indiscriminado e excessivo devido a políticas de incentivo para a utilização de novas tecnologias surgidas a partir da década de 70, levaram a graves problemas que surgiram aos poucos, ao longo dos anos. As aplicações constantes e em grandes quantidades de agrotóxicos levam ao aparecimento de pragas resistentes, o que requer a criação de novos produtos para seu controle. Ao mesmo tempo, os predadores naturais das pragas são eliminados e algumas pragas, antes controladas e de pouca importância, passam a ser principais e apresentar crescimento descontrolado e ainda observamos que impactos ambientais como do ar, das águas e do solo são freqüentes (Impacto dos Agrotóxicos – Scientific American Ed°15).

Um dos exemplos mais bem descritos é o DDT que foi usado no Brasil para combate ao mosquito vetor da malária na década de 1970 a 1990 e grande parte da população conviveu de perto com o produto que era pulverizado nas residências em praticamente toda a região amazônica, sendo que as possíveis conseqüências deste contato para os indivíduos a longo prazo é um mistério dada a falta de estudos epidemiológicos na região. O que se sabe é que uma quantidade significativa de trabalhadores (aproximadamente 2000) envolvidos na pulverização do DDT desenvolveram ao longo dos anos diversos sintomas graves de intoxicaçao que já provocaram a morte de alguns deles.

Assim como outros organoclorados, o DDT faz parte de um grupo de compostos classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP’s). Tal atribuição deve-se a três características básicas: persistência ambiental, bioacumalação (com conseqüente biomagnificação trófica) e alta toxicidade (YOGUI et al, 2002). Os agrotóxicos em contato com o solo ou com a água podem ter três destinos diferentes. Podem ser completamente degradados, podem ser degradados parcialmente resultando em metabólitos não degradáveis e, finalmente, podem sofrer pouca alteração resultando alta persistência e acúmulo das substâncias contaminantes (Sethunathan apud Alencar et al, 1998).

Vários são os fatores que influem na menor ou maior degradação destas substâncias. Contribuem para a maior eliminação destes produtos, as próprias características intrínsecas ao produto (estrutura molecular, reatividade, concentração, volatilidade entre outros) e também as propriedades do ambiente em que ele é colocado. Quando um agroquímico chega ao solo, ele se divide entre os três estados encontrados neste ambiente, isto é, partículas sólidas, solução e gases (Glotfelty e Schomburg, 1989 apud Monteiro, 1997). Desta forma, o que determina a mudança do pesticida de uma forma para outra é um processo chamado adsorção. Na prática quer dizer que se um produto fica mais tempo no solo (alta adsorção) é maior sua possibilidade de degradar-se sem se espalhar para outros ambientes através da lixiviação ou percolação das substâncias, reduzindo o risco de contaminação aquática, por exemplo. Entretanto, é conveniente ressaltar que ele pode nota-se que os pesticidas com maior ou menor rapidez podem ser transportados dentro do próprio solo ou para fora deste ecossistema.

As formas mais comuns de transporte ou caminhos a serem seguidos, além da adsorção, são (Dores e Freire, 1999; Monteiro, 1997): volatilização, co-vaporização com a água, associação ao material particulado transportado pelo vento – leva o pesticida do solo para a atmosfera; lixiviação – é o movimento dos pesticidas dissolvidos ou adsorvidos a partículas da solução do solo da superfície. Este processo está relacionado à contaminação das águas subterrâneas; erosão – leva o pesticida junto com as partículas minerais do solo absorção pelas raízes das plantas e/ou por outros organismos vivos evaporação e transpiração – estes dois processos realizados pela água presente no solo e nas plantas, também leva os produtos nela dissolvidos; através dos macroporos do solo junto ao movimento das águas que penetram pelos canais abertos por minhocas e outros animais habitantes do ecossistema, bem como através das raízes das plantas; escoamento superficial ou runoff – é um dos principais processos de contaminação de águas de superfície. A água das chuvas ou irrigação movimenta-se transportando íons solúveis ou adsorvidos às partículas do solo (Monteiro, 1997, p.115). Além da degradação biológica, os pesticidas podem ser parcialmente degradados através de processos químicos ou fotoquímicos, sendo chamadas de processos abióticos de degradação como oxidação, redução, hidrólise e fotólise. Entretanto, a atividade microbiana é decisiva na degradação completa dos produtos.

Análises de resíduos realizadas recentemente em alimentos mostram muitas vezes que os valores ultrapassam os limites considerados toleráveis, indicando a grande bioacumulação gerada por estes compostos, aumentando o risco de contaminaçãodos alimentos e conseqüentemente dos consumidores. Nos Estados Unidos, o Departamento de Agricultura (*United States Department of Agriculture*) desenvolveu um programa chamado *Pesticid Data Program* que teve como objetivo verificar o índice de alimentos contaminados por pesticida, desde de 1990, o programa coletou dados de aproximadamente 60 tipos diferentes de alimentos e cerca de 400 tipos de pesticidas, sendo os primeiros resultados divulgados em 2004 (*Annual Summary Calendar Year 2004*)e alguns dados obtidos são mostrados na tabela 04 abaixo:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **FRUTA/**  **VEGETAL** | **Nº amostras analisadas** | **Amostras com resíduos detectados** | **% de amostras contaminadas** | **Diferentes pesticidas encontrados** | **Resíduos diferentes encontrados** |
| Maçã | 774 | 727 | 98 | 33 | 41 |
| Alface | 743 | 657 | 88 | 47 | 57 |
| Pêra | 741 | 643 | 87 | 31 | 35 |
| Suco de laranja | 186 | 93 | 50 | 3 | 3 |

**Tabela 4:** Indice (%) de alimentos contaminados por pesticidas

Muitos estudos realizados com agricultores com objetivo de determinar os efeitos nocivos à saúde resultantes do contato com pesticidas indicaram que a exposição a estes compostos está associada, a longo prazo, com vários problemas de saúde, tais como: dificuldades respiratórias, problemas de memória, problemas na pele, câncer, depressão. Desde maio de 2004, 151 países aceitaram a Convenção de Estocolmo e precisam desenvolver medidas efetivas para banir de seus cotidianos 12 compostos denominados de produtos orgânicos persistentes (POPs), que são os mais danosos ao meio ambiente. São nove pesticidas: aldrina, clordano, DDT, dieldrina, endrina, heptacloro, hexaclorobenzeno, mirex e toxafeno. Dois produtos químicos industriais - PCB (bifenilpoliclorado) e hexaclorobenzeno - e subprodutos não deliberados, como as dioxinas e os furanos. Todas essas substâncias, de forma comprovada por vários estudos científicos podem causar sérios distúrbios à saúde em seres humanos e até a morte. No caso nacional, a gestão pública responsável pelos riscos químicos ainda é realizada de forma desorganizada e as informações a respeito do tema ainda são muito vagas e confusas. Todas as substâncias que fazem parte da convenção permanecem décadas no ambiente antes de serem degradadas (Agência FAPESP 02/05/2005).

**2. JUSTIFICATIVA**

Dados da literatura evidenciam que os pesticidas s**ã**o capazes de causar sérios problemas à saúde humana. Estes agentes tóxicos est**ã**o também sendo apontados como agentes desencadeadores de quadros neurológicos graves ainda sem tratamento eficiente como o Mal de Parkinson e Doença de Alzheimer (Barbeau et al., 1986; Semchuk et al., 1991; Butterfield et al., 1993; Fleming et al., 1994). A ação dos pesticidas sobre vários outros órgãos também é bastante expressiva.

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas e a agricultura é o ramo onde mais se usa estes compostos, mas também com intenso emprego na saúde pública – combatendo vetores de doenças endêmicas –, nas indústrias, nas residências e até mesmo na higiene pessoal. “O uso de agrotóxicos hoje no país se constitui num dramático quadro de desrespeito à vida das pessoas; um verdadeiro genocídio silencioso cometido diariamente contra as crianças, mulheres, e adultos de um modo geral”. Este é um trecho do discurso pronunciado pelo Deputado Federal **Fernando Dantas Ferro (PT-PE) na Câmara dos Deputados em 1996, onde chamava a atenção para o uso descontrolado de pesticidas no estado de Pernambuco.**

Todos os pesticidas conhecidos podem causar problemas de saúde aos seres humanos e o que temos hoje são apenas estimativas sobre envenenamentos. Calcula-se que anualmente no Brasil 5 mil produtores são contaminados pelo uso de agrotóxicos, segundo a OMS, estima-se em 3 milhões as intoxicações agudas por agrotóxicos, com 20 mil óbitos ao ano, sendo que destes, somente nos países em desenvolvimento, ocorrem 2 milhões e cem mil casos agudos, com 14 mil óbitos, segundo relatórios anteriores mostrando que os dados atuais vêem crescendo regularmente.

Esses números nos dão uma idéia dos problemas que o uso descontrolado de pesticidas podem gerar, sua difusão e deposição no meio ambiente, somado ao fato de que essas substâncias provocam efeitos nocivos ao sistema nervoso humano, sendo os mecanismos de ação neurotóxica grandemente desconhecidos, além de serem relacionados ao aparecimento de doenças neurodegenerativas, tornam interessante o estudo dos efeitos neuroquímicos de pesticidas sobre o sistema nervoso central de mamíferos.

Os pesticidas podem ser bastante úteis na produção agrícola, especialmente quando o clima favorece o desenvolvimento de pragas. Contudo, o seu uso deve ser corretamente orientado por profissionais da área, respeitando-se a legislação vigente e a saúde da população. Para esses fins, as pesquisas na área de pesticidas vêm caminhando na direção da obtenção de compostos cada vez menos tóxicos para os seres vivos ou ainda como neste trabalho, investigar e avaliar o(s) possível(eis) efeito(s) e tentar inferir o mecanismos de ação neurotóxica sobre o Sistema Nervoso Central de ratos, com testes realizados com as quatro principais classes aplicados amplamente na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas (inseticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas), como forma de se chegar talvez em um futuro próximo a uma medida profilática e/ou terapêutica para reverter suas ações lesivas aos sistemas humanos.

**3. OBJETIVOS**

**3.1. Objetivos gerais**

Avaliar os possíveis efeitos comportamentais e bioquímicos da exposição crônica e aguda de sete formulações comerciais de pesticidas utilizados no Brasil, o Deltaphos, que é uma associação entre triazofós (organofosforado) e deltametrina (piretróide), usado na formulação comercial de 1% de deltametrina para 35% de triazofós (Deltaphos, da Bayer CorpScience Ltda); o inseticida Metil Paration (organosfosforado)- Bravik 600®; os organoclorados DDT, lindano e dicofol, Paraquat (dipiridilo) e o Maneb (ditiocarbamato), esses que abrangem as principais classes de pesticidas (inseticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas) aplicados na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas.

**3.2. Objetivos específicos**

**1.** Avaliar a atividade da acetilcolinesterase do hipocampo de ratos no último dia de intoxicação dos animais com metil paration (1, 3 e 6 mg/Kg), em tratamento sub-crônico que durou 7 dias.

**2.** Avaliar a ação do tratamento sub-crônico dos dois pesticidas utilizados, Deltaphos (10 ou 20 mg/kg) e Bravik (1, 3 e 6 mg/kg) sobre a atividade motora através do campo aberto.

**3.** Avaliar a ação do tratamento sub-crônico em modelo de depressão no teste de nado forçado para Deltaphos (10, 20 mg/kg) e Bravik (1,3 e 6 mg/kg).

**4.** Avaliar os efeitos do tratamento sub-crônico em modelo de ansiedade com o teste do labirinto em cruz elevado também para Deltaphos (10, 20 mg/kg) e Bravik (1,3 e 6 mg/kg).

**5.** Analisar os efeitos da exposiçao aos organoclorados DDT, lindano e dicofol, administrados *in situ* no núcleo estriado sobre a liberação de dopamina e seus metabólitos.

**6.** Analisar os efeitos da exposiçao ao paraquat, administrado *in situ* no núcleo estriado sobre a liberação de dopamina e seus metabólitos.

**7.** Analisar os efeitos da exposiçao ao MANEB, administrados *in situ* no núcleo estriado sobre a liberação de dopamina e seus metabólitos.

**4. MATERIAIS E MÉTODOS**

**4.1. Animais**

Em todos os experimentos foram utilizados ratos machos adultos da raça Sprague-Dawley com peso compreendido entre 250 e 300 g provenientes do Laboratório de Neuroendocrinologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) , alimentados com ração comercial e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 + 2ºC) e iluminação (14 h: 10h, claro:escuro), aclimatados às condições do biotério durante, pelo menos quatro dias antes dos procedimentos experimentais e mantidos em gaiolas de polipropileno (215x465x145 mm) em um número de 4-5 por gaiola. Após o tratamento os animais foram alojados de acordo com seu grupo estipulado e os que passaram por operação, foram alojados em uma gaiola individual (220x220x145 mm).

**4.2. Tratamento com pesticidas**

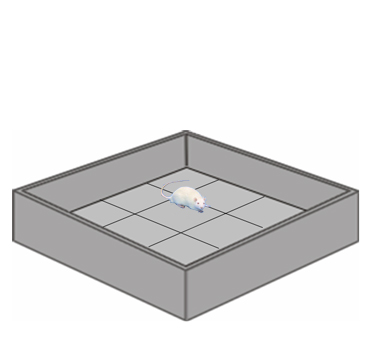
Os animais, que receberam tratamento com inseticidas organofosforados Deltaphos e Metil- Paration foram intoxicados por via intraperitoneal com uma solução contendo esses pesticidas em diferentes concentrações, por um período de 7 dias consecutivos e foram divididos em grupos de acordo com as doses administradas. Outro grupo de animais recebeu doses diárias do veículo nas mesmas condições de tempo, concentração e via de administração empregadas no grupo teste e estes mesmo grupos experimentais foram submetidos as análises comportamentais e avaliação da enzima AChe.

No outro grupo experimental, a administração dos diferentes pesticidas e a coleta das amostras foram feitas através da técnica de microdiálise cerebral para os animais tratados com os organoclorados fungicidas e herbicidas, DDT, Dicofol e Lindano além do Paraquat (dipiridilo) e Maneb (Ditiocarbamato).

**4.3. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS**

No último dia de tratamento, os animais foram submetidos a três avaliações comportamentais na seqüência de testes abaixo descrita.

**4.3.a Atividade locomotora no campo aberto**

O aparato do campo aberto consiste de uma arena (figura 05) feita de madeira (60x60x35 cm) com a base dividida em 9 (nove) quadrantes de mesmas dimensões. Os animais foram colocados no laboratório onde os experimentos ocorreram pelo menos uma hora antes para aclimatação e habituação após esse período são colocados no centro da caixa e então o seguinte parâmetro é avaliado: a freqüência com que os animais cruzarão, com as quatro patas, as linhas divisórias dos quadrantes, passando de um quandrante para o outro, em um período de 5 min. Após cada teste, a base da caixa será limpa com álcool 10% (v/v).

**60 cm**

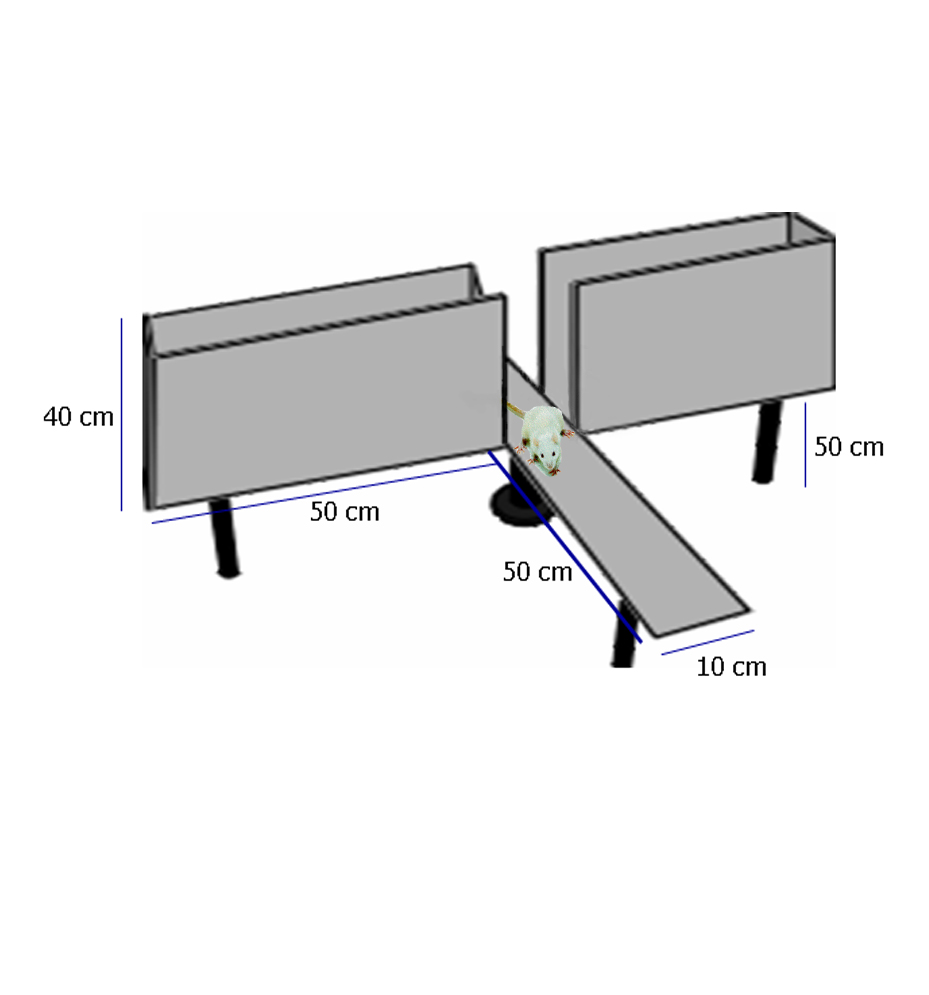
**60 cm**

## Fig 5: Aparato do Campo Aberto

**4.3.b Labirinto em cruz elevado (LCE)**

Este teste está baseado nos diferentes comportamentos que o rato exprime quando explora ambientes abertos e fechados, evitando, em situações normais, o primeiro e preferindo o segundo (Montgomery, 1955). No teste, o animal foi colocado no centro do aparato em forma de “cruz” com as seguintes dimensões: dois braços abertos (50x10 cm) e dois fechados (50x10x40 cm), opostos entre si, elevados a 50 cm do chão (Handley & Mithani, 1984; Ramos *et al*, 2002).

O rato foi solto de face para um dos braços fechados e deixado para explorar o ambiente por 5 min. Durante esse período, os seguintes registros foram feitos: número de entradas e tempo de permanência dos animais nos braços abertos e fechados. Os compostos ansiolíticos (que diminuem a ansiedade) fazem aumentar as porcentagens do número de entrada e tempo de exploração dos animais nos braços abertos; e os compostos ansiogênicos (que causam ansiedade), fazem o inverso (Andreatini & Bacellar, 1999; Pellow e cols., 1985 Rapha). A cada teste, limpar-se-á a base do aparato para eliminar interferentes.



#### Fig 6: Aparato do Labirinto em cruz elevado

### 4.3.c Nado forçado

O teste consiste em colocar o rato dentro de um aquário de vidro com 35 cm de profundidade, cujo nível seja de 20 cm abaixo da borda, a uma temperatura de 24  1°C por um período de 5 min e cronometrar o tempo que este fica imóvel na água (pára de nadar) nos três minutos finais. Isso pode mostrar o estado de depressão que o animal se encontra, onde quanto maior esse estado, maior será o tempo de imobilidade na água; e quanto menor o estado de depressão, menor será o tempo de imobilidade (Andreatini & Bacellar, 1999). A água do aquário será periodicamente trocada para se evitar qualquer interferente deixado pelos ratos.



***Fig 7:*** Aparato do Nado forçado

**4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA AChE EM HIPOCAMPO DE RATOS:**

A medida da atividade da enzima acetilcolinesterase foi feita em duas etapas. Três animais de cada grupo foram sacrificados no último dia do tratamento com pesticidas, após o término dos testes comportamentais e o restante foram sacrificados sete dias após o término do tratamento com o objetivo de se acompanhar a evolução temporal da atividade enzimática a partir do final da administração das substâncias.

**4.4.a Substâncias e equipamentos**

As substâncias são: 5-5’-Dithio-bis (2-Nitrobenzoic Acid) – DTNB (Sigma); Iodeto de propioniltiocolina (Sigma); Salicilato de Eserina (Sigma); NaOH (Sigma); NaCl (Nuclear); KH2PO4 (Nuclear) e Na2HPO4.7H2O (Nuclear). Equipamento: Leitor de Microplaca (Microplate Reader, Modelo 450 - Bio-Rad).

**4.4.b Ensaio enzimático em microplaca**

O protocolo a ser usado foi o mesmo de Trevisan & Macedo (2003), com algumas modificações. Este método baseia-se nos ensaios de Ellman *et al.* (1961), que consiste na hidrólise enzimática da acetiltiocolina ou propioniltiocolina (substrato) produzindo ácido acético e tiocolina ou propionato e tiocolina, respectivamente. A atividade de degradação da AChE pode ser medida com a adição de um reativo de cor (DTNB ou reagente de Ellman), o qual reage com a tiocolina produzindo um complexo amarelo (2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato). A intensidade da cor é proporcional à atividade enzimática e pode ser medida em espectrofotômetro a 450 nm. Nos poços da microplaca foram adicionados volumes fixos de DTNB (3 mM, pH 7,8 - 675 mg de NaCl, 37,5 mg de KH2PO4, 1,265 g de Na2HPO4.7H2O e 178,33 mg de DTNB em 150 mL de H2Od.) e amostra (125 μL e 25 μL, respectivamente). Para cada amostra, houve um poço destinado ao ensaio com o inibidor da enzima (eserina) e outro sem o inibidor, de maneira que no poço onde a enzima seria inibida colocou-se 25 μL de eserina (100 μM) e 50 μL de Tris HCl (50 mM, pH 8). No poço sem inibição foi adicionado somente Tris HCl (75 μL). Nesse momento, houve a medição da absorbância da solução a cada 1 min por três vezes. Em seguida, adicionou-se 25 μL do substrato (propioniltiocolina) (15 mM) a todos os poços, ficando a solução final com um volume de 250 μL. Agora outra medição da absorbância a cada 1 min por 5 vezes foi registrada. Cada amostra foi feita em duplicata. A análise estatística dos resultados feita através da análise de variância seguida do teste múltiplo de Student-Newman-Keuls, considerando como diferença significativa *P* <0,05.

**4.5. DOSAGEM DE PROTEÍNA**

Após cada experimento de medida da atividade da AChE, foram coletados 50 μL da fração sinaptossomal e colocados em uma solução contendo 400 μL de H2O destilada e 50 μL de NaOH 1N, para que a soda possa dissociar a proteína. Incubou-se por pelo menos 24 h para em seguida ser usado na quantificação protéica.

**4.5.a Soluções e equipamentos**

Soluções: Folin & Coicalteu’s Phenol Reagent (Sigma); Albumina sérica bovina – BSA (Sigma) e Reativo Cupro-Alcalino (RCA). Equipamento: espectrofotômetro (Spekol 1100 – Zeiss). O RCA é feito adicionando-se em 43 mL de H2Od, 5 mL de NaOH (1 N), 500 μL de CuSO4 1%, 500 μL de Tartarato Na+-K+ 2 % e 1g de Na2CO3.

**4.5.b Quantificação protéica**

A proteína de cada amostra foi quantificada pelo método de Lowry *et al.* (1951), pelo qual se utiliza a albumina sérica bovina (BSA) como curva padrão. Os valores de proteína servem para se corrigir possíveis discrepâncias, na medida em que resultados indicando baixa atividade enzimática, por exemplo, poderiam ser por quantidades diminuídas destas mesmas enzimas no ensaio.

Para a dosagem da proteína foram adicionados 200 L da amostra incubada com NaOH em 2 mL do RCA. Após 10 minutos, foi adicionado o reativo Folin 2N, realizando-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750 nm após 30 min. Para a determinação da concentração da amostra, houve a construção da curva padrão de proteína, através das concentrações conhecidas de 0 mg, 0,005mg, 0,01mg, 0,015mg e 0,02mg de proteína de albumina de soro bovino por tubo, efetuando-se a dosagem neste procedimento igual ao realizado para as amostras desconhecidas.

**5. MICRODIÁLISE CEREBRAL ACOPLADA À CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICÁCIA PARA TRATAMENTO COM OS FUNGICIDAS E HERBICIDAS, DDT, DICOFOL, LINDANO, MANEB e PARAQUAT**

**5.1. Reagentes e drogas utilizadas**

Para a análise cromatográfica foram utilizados reagentes próprios para HPLC. A água utilizada para a preparação dos reagentes, soluções padrão e solventes cromatográficos foi obtida a partir de um sistema MilliQ (Milllipore).

Os reagentes são: DDT, hidrato de cloral, fosfato de potássio diácido (KH2PO4), octanosulfonato de sódio (SOS) e ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) e o metanol. A soluçao *stock* de pesticidas foi preparada em DMSO, em uma concentraçao máxima de 2,5% e a soluçao de trabalho foi diluída no meio Ringer e administrada diretamente no núcleo estriado durante os experimentos.

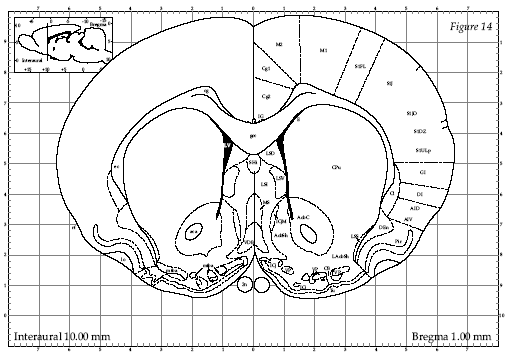
**5.2. Fundamentos da técnica**

A microdiálise cerebral é uma técnica neuroquímica utilizada para obter e quantificar níveis de neurotransmissores, metabólitos e outras substâncias endógenas, além de permitir a administração de drogas, fármacos ou tóxicos. Foi idealizada por Bitto e colaboradores (1966) e aperfeiçoada por outros pesquisadores (Ungerstedt, 1982; Westerink *et al.*, 1990).

Esta técnica permite o acesso ao líquido extracelular de determinadas áreas cerebrais de animais de experimentação conscientes e em livre movimento, uma vez que consiste basicamente na implantação, através de cirurgia estereotáxica, em uma determinada área cerebral, de um dispositivo metálico com um tubo de entrada e outro de saída, acoplado a uma membrana de diálise (sonda). Por um dos extremos administra-se um líquido de perfusão a um fluxo constante e pelo outro extremo coleta-se, a intervalos regulares, as amostras resultantes da difusão a favor de gradiente que se estabelece em ambos os lados

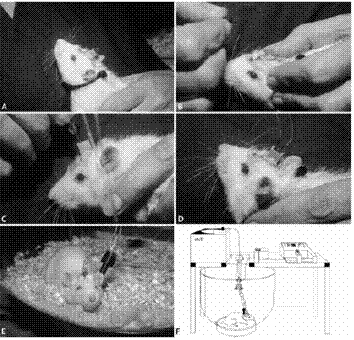
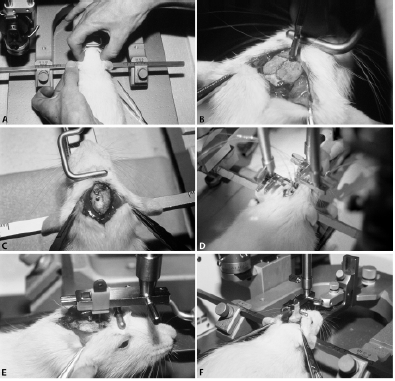
**5.3. Implantação da cânula guia**

Para a implantação da cânula-guia, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral na dose de 400 mg/kg via i.p. e fixados no aparelho estereotáxico (SR-6, NARISHIGE). Em seguida, o crânio foi exposto para a implantação estereotáxica da cânula guia (CMA/11) no estriado direito seguindo as seguintes coordenadas a partir do Bregma: A/P +2.0 mm; L +3.0 mm; V +6.0 mm, conforme observado na Figura 8 (Paxinos, 1998); nestas coordenadas o crânio do animal foi perfurado para a introdução da cânula guia. A cânula-guia assim implantada foi fixada ao crânio com cimento acrílico.



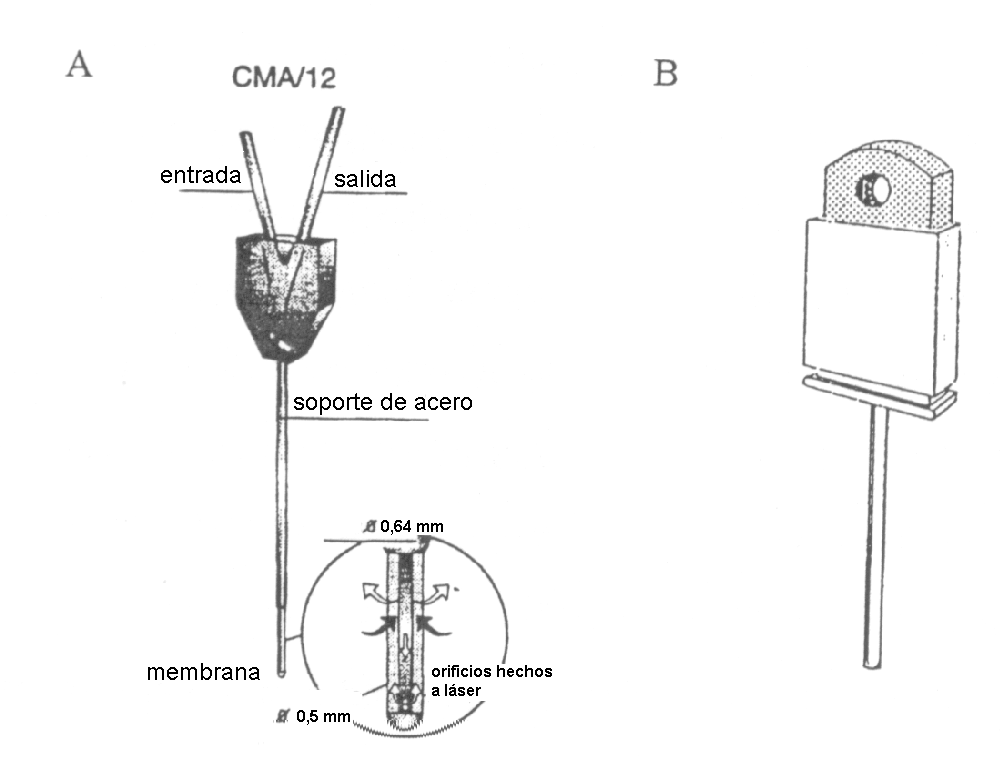
**Figura 8:** Corte coronal esquemático mostrando a inserção da sonda de microdiálise no estriado (Adaptado de Paxinos, 1998).

Após um período de 24 h, tempo dado para que o animal se recupere da cirurgia e assim evitar o efeito da implantação da cânula, a sonda com a membrana de diálise foi introduzida na cânula guia no início do experimento. As Figuras 9A – 9F mostram um esquema da implantação da cânula guia no estriado. Desde o momento da introdução da sonda na cânula guia a solução Ringer foi perfundida a um fluxo de 2 µl/min utilizando uma bomba de infusão contínua (CMA/102) e as amostras resultantes do processo de microdiálise foram recolhidas a cada 20 min utilizando um microcoletor de frações (CMA/142). Todas as experiências foram realizadas ao longo de quatro horas com os animais acordados e em livre movimento



**Figura 9:** Procedimento cirúrgico para a colocação da cânula-guia. Nas figuras pode-se ver a fixação da cabeça do animal no aparelho de estereotaxia **(A)**, a localização, a partir do Bregma, das coordenadas estereotáxicas **(B)**, a colocação dos parafusos de fixação **(C)**, a colocação da cânula **(D ,E)** e a sua fixação posteriormente com cimento acrílico **(F)**.

**5.4. Administração das substâncias e coleta das amostras**

Vinte e quatro horas após a intervenção cirúrgica, a sonda foi introduzida na cânula-guia para o procedimento de coleta das amostras. Foram utilizadas sondas comerciais CMA/12 (CMA/ Microdialysis, Suécia), com uma membrana de diálise de policarbonato de 3 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro externo. A parte metálica da sonda (comprimento = 14 mm, diâmetro externo = 0.64 mm e volume interno de 3 μL) foi conectada através de tubos de teflom (0,65 mm de diâmetro externo e 0,12 mm de diâmetro interno) a uma bomba de microdiálise (CMA/120) através da qual foi perfundida uma solução Ringer (composição: NaCl 147 mM, KCl 4 mM, CaCl2 3,4 mM, pH = 7.4) a um fluxo constante de 1,5 μL/min. 

**Figura 10:** Representação das sondas (A) e cânulas de microdiálise

(B) utilizadas nos experimentos (CMA/12, CMA Microdialysis).

O protocolo de administração *in situ* dos pesticidas será o seguinte:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Tempo de administração | 60 minutos | 60 minutos | 60 minutos |
| Tratamento | Meio Ringer | Pesticida  (diferentes concentraçoes) | Meio Ringer |

**5.5. Rendimento das sondas de microdiálise**

Em uma experiência de microdiálise não se coleta 100% das substâncias presentes no meio extracelular em torno à sonda, mas sim apenas uma parte da fraçao total; isto depende de fatores tais como o tipo de membrana de diálise, o tamanho da substância e o fluxo de perfusão. Denomina-se recuperação à relação entre a concentração de uma substância medida no dializado e sua concentração no meio externo à membrana de diálise, neste caso o meio extracelular. A recuperação de todas as sondas utilizadas foi á determinada *in vitro* colocando-as em um meio no qual encontram-se presentes as substâncias a serem determinadas (DA, DOPAC, HVA) em uma concentração conhecida. Depois de perfundir a sonda com meio Ringer ao mesmo fluxo e durante o mesmo tempo usado nos experimentos, foi calculada a porcentagem que representa as quantidades coletadas em relaçao à quantidade total no meio externo à sonda.

As recuperações calculadas para cada uma destas substâncias são:

- DA = 11.3%

- DOPAC = 11.15%

- HVA = 19.26%

**5.6. DETERMINAÇÃO DA DOPAMINA E SEUS METABÓLITOS NO DIALIZADO**

As amostras obtidas por microdiálise foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC) com detecção eletroquímica.

**5.6.a Fundamentos da técnica**

A cromatografia líquida é uma técnica analítica cujo objetivo é a separação dos distintos componentes de uma mistura de substâncias baseando-se nas diferentes retenções dos componentes desta ao passar através de uma fase estacionária levados por uma fase móvel líquida. Desta forma, a separação dos componentes da amostra produz-se devido à suas interações entre uma fase móvel líquida e uma fase estacionária sólida retida em uma coluna cromatográfica. Nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, a fase estacionária é de natureza apolar enquanto que a fase móvel é polar. Portanto, o critério que regula a retenção das substâncias é sua polaridade, de tal forma que as substâncias mais apolares serao retidas mais fortemente pela fase estacionária da coluna e irao eluir mais tarde que as substâncias polares. Este tipo de cromatografia recebe o nome de cromatografia em fase reversa. Além disso, como a composição da fase móvel permanece constante ao longo tempo, diz-se que a separação realiza-se em condições isocráticas.

Uma vez que os componentes da amostra estejam separados, pode-se quantificá-los através de distintos métodos de detecção (espectrofotometria UV, fluorimetria, detecção eletroquímica...), em função das características das moléculas analisadas. Através destes métodos pode-se fazer tanto uma análise quantitativa quanto qualitativa. O registro resultante da separação dos distintos componentes da amostra, na saída da coluna cromatográfica e após sua passagem pelo sistema de detecção, origina um cromatogramano qual cada componente da amostra gera um pico cromatográfico.

Para a identificação dos componentes da amostra no cromatograma foram utilizados padrões das substâncias a serem detectadas, que permitem determinar a ordem de eluição e o tempo de retenção, característico de cada substância em condições cromatográficas determinadas. A posterior quantificação das substâncias pode ser feita através da comparação das alturas ou áreas dos picos cromatográficos obtidos nas análises com os das soluções padrão de concentração conhecida.

**5.6.b Análise cromatográfica**

Assim, as amostras obtidas no processo de microdiálise foram injetadas em um cromatógrafo de líquidos (Series 1050, HP) por meio de uma válvula de injeção Rheodyne 7125 (volume de injeção de 20 µl). A separação das substâncias de interesse (DA e seus metabólitos ácidos DOPAC e HVA) foi realizada em condições isocráticas de fase reversa. Para isso, foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-1 com partículas de 10 µm e fase móvel composta de uma solução de fosfato de potássio (KH2PO4) com EDTA 1 mM, usando como agente formador de pares iônicos o ácido octanosulfônico (SOS); a concentração de metanol utilizada foi de 9%, pH=3,4 e o fluxo de 2 ml/min, de acordo com o protocolo descrito por Durán e colaboradores(1998).

A detecção das substâncias foi feita com um detector eletroquímico (Coulochem 5100A, ESA) a um potencial de oxidação de +400 mV, utilizando uma célula de detecção 5011. O registro dos cromatogramas foi feito em um registrador Omniscribe de duplo canal.

Os cromatogramas obtidos nas condições cromatográficas descritas podem permitir a quantificação das substâncias analisadas (DA, DOPAC e HVA) em um tempo aproximado de 15 min, sem interferência de nenhum outro composto.

**5.6.c Cálculo da Concentração de Substâncias**

A concentração das diferentes substâncias foi calculada a partir de soluções padrão externas de concentração conhecida. Por exemplo, para a dopamina os cálculos foram feitos a partir de uma solução padrão de concentração de 1 ng/Injeção ou 1 ng/20 l, então:

Padrão: 1 ng/Inj  X cm

Amostra: C ng/Inj  H cm, portanto,

C ng/Inj = H/X onde,

X = altura do cromatograma obtida para o padrão

C = concentração da amostra a ser calculada

H = altura do cromatograma obtida para a amostra

Este valor obtido mede a concentração de substância por 20 l. Para calcularmos a concentração de substância por 30 l, que é o volume recuperado em um tempo de 20 min de microdiálise temos:

C ng/20 min = H/X x 1,5

Os cálculos obtidos nas equações acima nos fornecem a quantidade de substância recuperada por microdiálise. A quantidade recuperada é sempre menor que a quantidade total no meio extracelular. Então, o procedimento para o cálculo da concentração total da substância liberada no estriado (concentração no líquido extracelular do tecido) seria:

C ng liberada/20 min = H/X x 1,5 x 100/R onde,

R = rendimento da sonda.

**5.7. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos nos experimentos de microdiálise nos períodos de 20 minutos estão expressados como porcentagem de liberação em relação ao basal. Os valores basais são determinados calculando-se a média das três amostras anteriores à administração dos diferentes tratamentos sendo consideradas como 100% de liberação. A primeira amostra é descartada uma vez que os níveis de dopamina e metabólitos encontram-se alterados pela colocação da sonda e tardam aproximadamente 20 minutos em estabilizar-se.Os resultados foram corrigidos considerando-se a porcentagem de recuperação de cada sonda e calculados para cada substância analisada. Estes foram expressos como a média + E.E.M. para grupos de 4-5 animais. A análise estatística será feita através da análise de variância (ANOVA) e do teste de comparação múltipla de Student Newman-Keuls. Os níveis de significancia considerados foram: \* P<0,05, \*\* P<0,01 e \*\*\* P<0,001, em relação ao basal.

**6. RESULTADOS**

As diferentes concentrações de Deltaphos (10, 20 mg/Kg) não provocaram mortalidade entre os animais tratados, nem produziram sintomas visíveis de intoxicação, vistos através de avaliações como tremores, elevação da temperatura corporal e ingestão excessiva de água.Entretanto o grupo tratado com 6mg/kg de metil paration observou-se morte de animais, além de tremores e elevação da temperatura corporal.

**6.1. DELTAPHOS (10, 20 e 40 mg/kg).**



***Gráfico 01***. **Deltaphos e atividade locomotora**. Atividade locomotora de ratos

em tratamento subcrônico com Deltaphos, nas doses 10,20 e 40 mg/kg

(Controle: 60±5,1; 10 mg: 35,3±3,5 e; 20 mg: 25±2,11, P<0,05)



***Gráfico 02:*** **Deltaphos e Comportamento de ansiedade.** Tratamento subcrônico com Deltaphos, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg. O painel superior representa a % de Entrada nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado (Controle: 23,04±3,57; 10 mg: 23±3,25 e; 20 mg: 6,12±1,01, p<0,05); o painel central representa a % de Tempo que os mesmos animais passaram nos Braços Abertos do LCE (Controle: 23,04±3,57; 10 mg: 23±3,25 e; 20 mg: 6,12±1,01, p<0,05); O painel inferior representa a freqüência com que os animais ficavam nos braços fechados do equipamento. As barras representam a média±e.pm. de 9-10 animais por tratamento. \* p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais controles (ANOVA, teste de Dunnett).



***Gráfico 03:* Deltaphos e Tempo de imobilidade**. Tratamento subcrônico com Deltaphos, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, no Teste do Nado Forçado. As barras representam a média±e.pm. de 9 animais por tratamento.

**6.1.a METIL PARATION ( 1, 3 e 6 mg/kg).**



***Gráfico 04.*** **Metil Paration e atividade locomotora**. Atividade locomotora de ratos em tratamento subcrônico com Bravik, nas doses 1 (BRK1), 3 (BRK3) e 6 (BRK6) mg/kg. O referido comportamento foi avaliado em uma arena demarcada em 9 quadrantes. As barras representam a média±e.pm. de 9 animais por tratamento.



***Gráfico 05.*** **Metil Paration e Labirinto em cruz elevado**. Comportamento de ansiedade avaliado em ratos em tratamento sub-crônico com metil paration (Bravik 600), nas concentrações de 1 (BRK1), 3 (BRK3) e 6 (BRK6) mg/kg. O painel superior representa a % de Entrada nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado; o painel central representa a % de Tempo que os mesmos animais passaram nos Braços Abertos do Labirinto em Cruz Elevado; O painel inferior representa a freqüência com que os animais ficavam nos braços fechados do equipamento. As barras representam a média±e.pm. de 9 animais por tratamento. \* p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais controles tratados com salina (ANOVA, teste de Dunnett).



***Gráfico 06.*** **Metil paration e teste do nado forçado**. Tempo de imobilidade avaliado em ratos em tratamento subcrônico com Bravik, nas doses 1 (BRK1), 3 (BRK3) e 6 (BRK6) mg/kg, no Teste do Nado Forçado. As barras representam a média±e.pm. de 9 animais por tratamento. \* p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais controles tratados com salina (ANOVA, teste de Dunnett).

##### 6.1.b EFEITOS BIOQUÍMICOS

Atividade da acetilcolinesterase no hipocampo

##### Metil paration

Nesta etapa foi avaliado o efeito do pesticida metil paration (Bravik) sobre a atividade da enzima AChE do hipocampo de ratos. Os resultados obtidos indicam que, no último dia de tratamento, não houve alterações significativas na atividade da enzima para as três concentrações do metil paration (1, 3 e 6mg/Kg) quando comparado com o controle (Gráfico 07).



***Gráfico 07.*** **Metil paration e AChE no término do tratamento**. Atividade da AChE do hipocampo de ratos tratados subcronicamente com metil paration a 1 (BRK1), 3 (BRK3) e 6 (BRK6) mg/Kg. Os resultados são de amostras de hipocampo coletadas no último dia de tratamento. As barras representam a média±e.pm. de 6 animais por tratamento. \*p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais controles tratados com salina (análise de variância e teste múltiplo de Student-Newman-Keuls).

Após uma semana de intoxicação com metil paration, mediu-se a atividade da AChE (Gráfico 08). As concentrações de 1 e 3 mg/Kg do pesticida mostraram-se capaz de inibir significativamente a enzima, com um maior efeito da segunda concentração (BRK3). Não foi possível fazer o ensaio para o grupo com a maior concentração (BRK6), uma vez que os ratos morriam antes de alcançarem uma semana pós-intoxicação.

***Gráfico 08.*** **Metil paration e AChE uma sema depois do tratamento**. Atividade da AChE do hipocampo de ratos tratados subcronicamente com metil paration a 1 (BRK1) e 3 (BRK3) g/Kg. Os animais do grupo BRK6 morreram, fato pelo qual não constam nesta análise. Os resultados são de amostras de hipocampo coletadas uma semana após o tratamento dos animais. As barras representam a média±e.pm. de 6 animais por tratamento. \*p<0,05 representa diferença estatística em relação aos animais controles tratados com salina (análise de variância e teste múltiplo de Student-Newman-Keuls).

**6.2. RESULTADOS MICRODIÁLISE CEREBRAL ACOPLADA AO HPLC PARA TRATAMENTO COM OS FUNGICIDAS E HERBICIDAS, FLUTRIAFOL, DDT, DICOFOL, LINDANO, MANEB e PARAQUAT**

As condições cromatográficas utilizadas permite uma boa separação das substâncias analisadas em um curto período de tempo (menos de 15 min), sem a observação de interferências por parte de outras moléculas estruturalmente relacionadas.

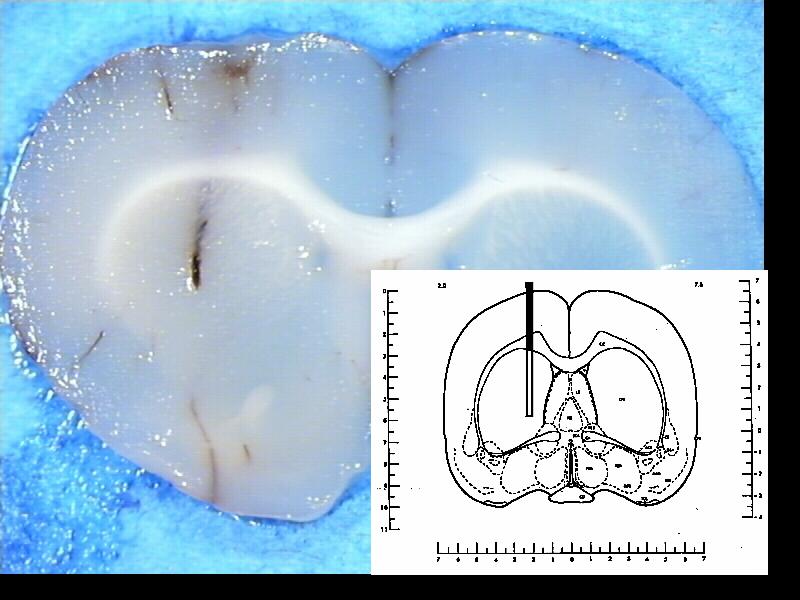
A Figura 9 mostra um cromatograma representativo da separação das substâncias puras estudadas nas condições de análise utilizadas. Neste caso, a fase móvel utilizada está composta por uma solução de fosfato potássico (KH2PO4) com EDTA 1 mM, usando como agente íon-par o SOS, metanol a 7%, o pH 3,4 e fluxo de 2 ml/min.. Os tempos de retenção, para cada substância analisada são os seguintes: DOPAC 2,9 min, DA 4,2 min, 5-HIAA 8,0 min, HVA 12,8 min.

**6.2.a – LOCALIZAÇÃO DA SONDA DE MICRODIÁLISE**



**Figura Figura 9:** Cromatograma representativo mostrando os picos registrados para as diferentes substâncias estudadas: A) DOPAC, B) DA, C) 5 - HIAA, D) HVA.

A Figura 10 mostra um secção a fresco do núcleo estriado de um animal usado nos experimentos. Na imagem pode-se observar o local de implantação da sonda de microdiálise e uma figura esquemática comparativa mostrando aproximadamente a região do estriado onde a sonda foi inserida.



**FFigura 10:** Secção coronal a fresco de um animal utilizado nos experimentos de implantação da sonda de microdiálise. O local de implantação da sonda no estriado está indicado pela seta laranja. Ao lado e abaixo está uma representação esquemática do local no cérebro do rato. Aumento de 10X.

**6.3. NÍVEIS BASAIS**

Todos os resultados estão corrigidos de acordo com a porcentagem de recuperação de cada sonda de microdiálise, que é bastante similar para as diferentes sondas: 14 ± 1% para a DA, 20 ± 2% para o DOPAC e 22 ± 2% para o HVA.

Os valores dializados basais de Dopamina e seus metabólitos no estriado são obtidos pela concentração média das substâncias nas 3 primeiras amostras coletadas antes da administração do pesticida; estes valores são: DA = 0.18 ± 0.02 (ng/20 min), DOPAC = 15 ± 0.60 (ng/20 min) e HVA = 10 ± 0.8 (ng/20 min).

**6.4. EFEITOS DA ADMINISTRAÇAO DE 1 MM DE PARAQUAT, MANEB, DDT, DICOFOL, LINDANO E FLUTRIAFOL SOBRE OS NÍVEIS EXTRACELULARES DE DOPAMINA**

Para investigar os efeitos do Paraquat sobre os níveis extracelulares de dopamina, este pesticida foi administrado diretamente no núcleo estriado através da sonda de microdiálise. A perfusão intraestriatal de 1 mM de paraquat produziu aumentos nos níveis extracelulares de dopamina para 956 ± 80 %, em relação aos níveis basais (Gráfico 09). Esse aumento foi observado 80 min após o início da infusão de paraquat e os valores retornaram ao basal 140 min após o final dessa infusão.

Para determinar se a liberação *in vivo* de dopamina induzida pelo paraquat era concentração-dependente, outras concentrações deste pesticida (além de 1 mM) foram aplicadas através da sonda de microdiálise. A infusão de 0,5 ou 7 mM de paraquat produziu aumentos na liberação de dopamina para 245 ± 43 % e 11980 ± 55 %, em relação aos níveis basais, respectivamente. Esses aumentos foram obsevados 80 min após o início da infusão de paraquat (Tabela 05).

A administração intraestriatal de 1 mM de maneb também produz aumento nos níveis extracelulares de dopamina. Os efeitos deste pesticida está mostrado no Gráfico 09. A infusão de maneb durante 60 min induziu um aumento máximo de 791 ± 87 %, em relação aos níveis basais. Esse aumento ocorre 20 min após o início da perfusão de maneb e os valores voltam ao basal 100 min após o seu término.

A infusão intraestriatal de 1 mM de flutriafol durante 60 min também produziu um pequeno aumento nos níveis de dopamina estriatal para 218 ± 51 %, 40 min após o começo da infusão do fungicida e os valores basais recuperaram-se 120 min após. Esse aumento foi estatisticamente significativo quando comparado como os níveis basais como está mostrado no Gráfico 09.

Para comparar os efeitos produzidos pelo paraquat e maneb com aqueles produzidos pelos pesticidas organoclorados, 1 mM de DDT, lindano ou dicofol foram perfundidos no núcleo estriado e os níveis extracelulares de dopamina foram medidos *in vivo* (Gráfico 10). A infusão de 1 mM de DDT durante 60 min produz um aumento máximo nos níveis extracelulares de dopamina de 779 ± 32 %, em relação aos níveis basais. Esse aumento foi observado 60 min após o início da perfusão de DDT e os valores basais recuperaram-se 100 min após.

Da mesma maneira, a infusão de 1 mM de lindano durante uma hora produziu efeitos significativos sobre os níveis extracelulares de dopamina no estriado. O gráfico 10 mostra que a administração de lindano produziu um aumento nos níveis extracelulares de dopamina de 290 ± 54 % em relação aos níveis basais. Esse aumento foi observado 40 min após o começo da perfusão de lindano e os valores basais recuperaram-se 80 min após.

Os níveis extracelulares de dopamina nao foram significativamente alterados pela administração de 1 mM de dicofol durante 60 min (Gráfico 10). Da mesma forma que o observado com o paraquat, nesse caso foi investigado os efeitos de outras concentrações de dicofol (5 e 10 mM) administrado diretamente no estriado. A Tabela 05 mostra que somente a concentração de 10 mM desse pesticida produziu aumentos nos níveis extracelulares de dopamina.

Uma abordagem da potência relativa comparando os efeitos dos 6 pesticidas, usados aqui em uma mesma concentração e em idênticas condições experimentais também foi feita. Essa abordagem pode ser vista no Gráfico 11, que mostra uma “Escala Comparativa de Potência - ECP” dos diferentes pesticidas sobre os níveis extracelulares *in vivo* de dopamina. O paraquat, o maneb e o organoclorado DDT produziram os principais efeitos sobre a liberação de dopamina, cerca de 10, 8 e 7 (em uma escala de 10); o flutriafol e o organoclorado lindano produziram aumentos intermediários na liberação de dopamina (cerca de 3 e 2, respectivamente) e o dicofol, na mesma concentração, nao induziu qualquer efeito sobre a liberaçao de dopamina.



***Gráfico 09.*** Efeitos da perfusão intraestriatal de 1 mM de Maneb, Paraquat e Flutriafol sobre os níveis extracelulares de dopamina no núcleo estriado de ratos. A seta indica o início da infusão dos pesticidas que durou 60 min. Os resultados são mostrados como a média ± S.E.M., expressados como a porcentagem dos níveis basais (100%). Os níveis basais foram considerados como a média da concentração de dopamina nas três primeiras amostras coletadas antes da administração dos pesticidas. Diferenças significativas: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 em relação aos níveis basais. A avaliação estatística dos resultados foi feita utilizando-se a ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls..



***Gráfico 10***. Efeitos da perfusão intraestriatal de 1 mM de DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de dopamina no núcleo estriado de ratos. A seta indica o início da infusão dos pesticidas que durou 60 min. Os resultados são mostrados como a média ± S.E.M., expressados como a porcentagem dos níveis basais (100%). Os níveis basais foram considerados como a média da concentração de dopamina nas três primeiras amostras coletadas antes da adminsitração dos pesticidas. Diferenças significativas: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 em relação aos níveis basais. A avaliação estatística dos resultados foi feita utilizando-se a ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **PESTICIDa** | **Concentração** | **Basal** | **Aumento Máximo** |
| **PARAQUAT** | 0.5 mM (n = 4)  7 mM (n = 4) | 105 ± 16%  108 ± 9% | **245 ± 43%\***  **11980 ± 55%\*\*\*** |
| DICOFOL | **5 mM (n = 4)**  **10 mM (n = 4)** | **109 ± 5%**  **108 ± 2%** | **152 ± 43%**  **1981 ± 338\*\*\*** |

**Tabela 5.** Efeitos máximos observados com a perfusão intraestriatal de diferentes concentrações de paraquat e dicofol sobre os níveis extracelulares de dopamina do núcleo estriado.

Os resultados sao mostrados como a média ± S.E.M., expressados como a porcentagem dos níveis basais (100%). Os níveis basais foram considerados como a média da concentração de dopamina nas três primeiras amostras coletadas antes da adminsitração dos pesticidas. Deferenças significativas: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 em relaçao aos níveis basais. A avaliação estatística dos resultados foi feita utilizando-se a ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls.



***Gráfico 11***. Os efeitos da administração de paraquat, maneb, DDT, lindano, dicofol e flutriafol os níveis extracelulares de dopamina in vivo são expressados como uma Escala Comparativa de Potência (ECP), de base 10, com o objetivo de comparar os efeitos desses pesticidas sobre o sistema dopaminérgico estriatal, sendo os grupos basal e veículo considerados como 1 (sem efeito) e o grupo tratado com paraquat considerado como 10 (máximo efeito).

**6.5. EFEITOS DA ADMINISTRAÇAO DE 1 MM DE PARAQUAT, MANEB, DDT, DICOFOL, LINDANO E FLUTRIAFOL SOBRE O METABOLISMO DA DOPAMINA**

Foi realizada a representação dos efeitos dos diferentes pesticidas sobre os níveis extracelulares de DOPAC (Gráfico 12) e HVA (Gráfico 13), mostrando os aumentos máximos induzidos pelos pesticides em relaçao aos níveis basais.

O gráfico 12 mostra que a infusão de 1 mM de paraquat, DDT, lindano e flutriafol induziu aumentos significativos nos níveis extracelulares de DOPAC para 214 ± 2 %, 229 ± 21 %, 291 ± 6 % e 180 ± 32 %, em relação aos níveis basais, respectivamente. Neste caso, a administração intrastriatal de 1 mM de maneb ou dicofol nao induziu alteraçoes significativas nas concentrações extracelulares desses metabólitos.

Em relação aos efeitos dos pesticidas sobre os níveis extracelulares de HVA, o gráfico 13 mostra que a infusão de 1 mM de DDT, lindano ou flutriafol induziu aumentos significativos nos níveis extracelulares de HVA para 185 ± 3 %, 308 ± 4 % e 146 ± 11 %, em relação aos níveis basais, respectivamente, enquanto a perfusão de paraquat e maneb induziu diminuições significativas nos níveis extracelulares desse metabólito to 56 ± 3 % e 58 ± 6 %, em relação aos basal, respectivamente.



***Gráfico 12.*** Efeitos máximos observados com a perfusão intraestriatal de 1 mM de paraquat, maneb, flutriafol, DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de DOPAC no núcleo estriado de ratos. Os resultados sao mostrados como a média ± S.E.M., expressados como a porcentagem dos níveis basais (100%). Os níveis basais foram considerados como a média da concentração de DOPAC nas três primeiras amostras coletadas antes da adminsitração dos pesticidas. Diferenças significativas: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 em relação aos níveis basais. A avaliação estatística dos resultados foi feita utilizando-se a ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls.



***Gráfico 13.*** Efeitos máximos observados com a perfusão intraestriatal de 1 mM de paraquat, maneb, flutriafol, DDT, lindano e dicofol sobre os níveis extracelulares de HVA no núcleo estriado de ratos. Os resultados são mostrados como a média ± S.E.M., expressados como a porcentagem dos níveis basais (100%). Os níveis basais foram considerados como a média da concentração de HVA nas três primeiras amostras coletadas antes da adminsitração dos pesticidas. Diferenças significativas: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001 em relação aos níveis basais. A avaliação estatística dos resultados foi feita utilizando-se a ANOVA e o teste de Student–Newman–Keuls.

**7. DISCUSSÃO**

O metodo cientifico ultilizado serviu para demonstrar o que a literatura já vem evidenciando através de varios estudos que mostram que a intoxicação por pesticidas, principalmente nas áreas rurais onde a exposição é substancialmente maior que nas populações urbanas, que também não estão isentas de níveis elevados destas substâncias em seus alimentos (Tabela 04) e em diversos outros produtos comercializados sem qualquer vigilância do estado, substâncias essas que de forma aguda ou crônica são capazez de provocar serios danos a saúde de varios organismos inclusive o humano.

Os resultados obtidos mostram que todas as formulações comercializadas atualmente no Brasil e no mundo são capazes de causar um déficit a nível locomotor (físico) ou molecular (Bioquímico) ou ainda os dois, concordando com os dados da literatura que mostram que intoxicação por pesticidas tem provocado déficits de cognição e funções psicomotoras, diminuição da sensibilidade e redução na condução de impulsos nervosos mesmo após anos de uma única exposição (Stokes *et al*., 1995; London *et al.,* 1997; Ohayo-Mitoko *et al.,* 2000; Alavanja *et al.,* 2004).

Os organofosforados testados (Deltaphos e Bravik) foram capazes de causar déficit motor em praticamente todas as doses ultilizadas para o Deltaphos e para doses intermediárias do Bravik. Como podemos ver os resultados indicam uma diminuição significativa na atividade locomotora (diminuição na frequência de cruzamento das linhas divisórias da arena - Controle: 60±5,1; 10 mg: 35,3±3,5 e; 20 mg: 25±2,11, P<0,05). Quanto à ansiedade, a maior dose utilizada (40 mg/kg) produziu um comportamento ansiogênico, ou seja, que causam ansiedade, caracterizado por uma redução na freqüência de entrada nos braços abertos do LCE (Controle: 23,04±3,57; 10 mg: 23±3,25 e; 20 mg: 6,12±1,01, p<0,05) e no tempo de permanência nesses braços (Controle: 9,15±2,3; 10 mg. A maior dose utilizada foi capaz de produzir alterações significativas diminuindo o tempo de imobilidade do animal, isto é, no tempo pelo qual o animal flutua, parando de nadar e mantendo somente pequenos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

Já quando administrado Metil-paration não vemos nenhuma interferência significativa a nível locomotor sendo que no LCE quando comparados ao grupo controle, os animais tratados com 3 mg/kg de metil paration, reduziram a percentagem de entradas nos braços abertos e a percentagem de tempo naqueles braços o que pode indicar que o tratamento está produzindo uma resposta ansiogênica nos animais. O tratamento nas três concentrações utilizadas (1, 3 e 6 mg/kg) também foi capaz de produzir uma diminuição no tempo de imobilidade, isto é, no tempo pelo qual o animal flutua, parando de nadar e mantendo somente pequenos movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

Podemos constatar através destes resultados o que já é bem descrito na literatura a respeito dos efeitos agudos e crônicos dos organofosforados que podem ocorrer dentro de alguns minutos e muitos casos incluem dores de cabeça, vertigem, náusea, podendo se desenvolver em fraqueza muscular, contração muscular, mudanças na taxa de batimentos cardíacos, broncoespasmo progredindo para convulsões e coma.

Muitos dos sintomas citados foram observados no momento da administração da droga em alguns animais, sugere-se que estes sintomas são conseqüência de interações moleculares da droga em questão, os organosfosforados, que ocorrem no SNC principalmente em células do sistema colinérgico, região a qual se da o principal efeito desta classe de pesticidas. Estes compostos causariam então um desequilíbrio na transmissão de impulsos nervosos na sinapse colinérgica.

As interações ocorrem principalmente nas células do sistema colinérgico central muito bem descrito como um sistema intrinsecamente ligado a aprendizagem, memória e ações sobre as uniões mioneurais dos músculos esqueléticos. Este fato explicaria os efeitos motores observados e ainda os sintomas agudos observados no momento da administração da droga, como espasmos e contrações musculares, os déficits locomotores e bioquímicos observados seriam em conseqüência destas interações ocorridas no SNC entre a droga e receptores de membrana das células colinérgicas.

Assim as duas formulações de organofosforados apesar de apresentarem formulas estruturais diferentes têm o mecanismos de ação principal bem similares e já bem descritos pela literatura, com uma ação principal sobre as colinesterases, em especial Acetilcolinesterase (AChE), enzima que degrada a acetilcolina evitando que haja uma superestimulação do terminal colinérgico. Estes compostos ligam-se irreversivelmente à enzima AChE, envolvida na transmissão de impulsos nervosos entre as células nervosas causando sinais típicos de distúrbio colinérgico, podendo dependendo da gravidade, levar a uma falência cárdio-respirtória e a morte. (STOCKER, SEAGER, 1985)

Esta superestimulação dos receptores colinérgicos pós-sinápticos, seguida de inibição da acetilcolinesterase, já tem sido bem observada em estudos realizados com metil-paration. Segundo os resultados obtidos vemos que todas as doses, após uma semana do tratamento foram capazes de causar um déficit na atividade da enzima Ache sugerindo que a via de toxicidade destes compostos esta de acordo com a descrita em outros trabalhos, visto que os organosfosforados têm sido os mais bem estudados até o presente o momento (Keifer *et al.,*1997).

Estudos mais recentes têm sugerido uma associação intrínseca entre a exposição crônica a algumas formulações, principalmente organoclorados, como DDT, e doenças crônico degenerativas como doença de Alzheimer, Coréias e a doença de Parkinson (Langston,1996; Le Couter *et al.,*1999; Behari *et al.,*2001; Priyadarshi *et al.,* 2001; Bloomquist *et al.,*2000). Estudos iniciais mostraram que ratos alimentados com 50ppm de dieldrin por 10 semanas apresentaram redução no conteúdo de dopamina (DA) total do cérebro após 4 semanas, mas não houve mudanças na quantidade de DA estriatal (Wagner,1974) este fato foi reforçado quando níveis de organosclorados (Dieldrin, DDT e seus metabólitos) foram encontrados mais elevados em cérebros de indivíduos portadores de Parkinson em relação a indivíduos normais (Fleming *et al.,*1998; Corrigan *et a.,1998*).

Os resultados mostram certa concordância com a literatura, pois as formulações utilizadas quase em sua totalidade foram capazes de produzir um aumento significativo dos níveis de DA extracelular. De acordo com estes resultados podem-se propor alguns mecanismos de ação para explicar a maneira pela qual a administração intraestriatal destas drogas organoclorados, fungicidas e herbicidas são capazes de aumentar os níveis de dopamina extracelular.

A possível via de toxicidade destes compostos poderia ser uma indução aumentada na liberação do neurotransmissor a partir das vesículas sinápticas, o agente poderia também estar inibindo a monoamina oxidase, enzima responsável pela degradação da DA e posterior recaptação deste neurotransmissor para que seja feita sua reciclagem, ou seja, uma nova síntese do neurotransmissor a partir dos substratos recaptados. Este composto ainda poderia estar induzindo uma inibição desta recaptação, ou seja, estaria inibindo o principal mecanismo de eliminação deste neurotransmissor da fenda sináptica.

Estas vias de toxicidade explicariam os efeitos observados nos resultados obtidos, estes pesticidas causariam então uma superestimuação dos terminais dopaminérgicos através da interação destes com moléculas transportadoras e enzimas de degradação, o que traria ao sistema dopaminérgico central um desequilíbrio muito significativo atingindo sistemas importantes como sistemas: motor, de cognição, recompensa e regulação endócrina. Estes efeitos foram observados em quase todas as formulações utilizadas, porém algumas formulações produziram efeitos muito mais acentuados do que outras. Por exemplo, podemos ver no gráfico 11 em uma Escala Comparativa de Potencia que os pesticidas que podem causar maiores efeitos são respectivamente o herbicida, fungicida e inseticida (Paraquat, Maneb e DDT) sendo os que produziram os maiores aumentos nos níveis de DA extracelular.

Os resultados mostram também que algumas formulações causam pouco ou quase nenhum efeito significativo sobre a liberação de DA, podendo ser utilizadas com maior freqüência de modo a causar menor impacto aos organismos humanos, sendo que destes o organoclorado dicofol e o fungicida Flutriafol foram os que produziram menores efeitos sobre os níveis de DA extracelular, porém o Flutriafol foi capaz de produzir variações significativas, como aumento dos níveis extracelulares dos catabólitos da dopamina (DOPAC e HVA), seguido de outras drogas que produziram aumento importante destes catabólitos, como lindano, que provocou o maior aumento nos níveis tanto de DOPAC como de HVA, o organoclorado DDT que também provocou um aumento significativo de ambos e ainda o herbicida paraquat que provocou grande aumento dos níveis do catabólito DOPAC, mas observou-se uma diminuição significativa nos níveis de HVA.

Entretanto variações nos níveis extracelulares dos catabólitos da dopamina (DOPAC e HVA) são frequentemente difíceis de ser interpretadas. Processos como a síntese, o metabolismo, a conjugação e a taxa de efluxo são etapas que podem contribuir para os valores basais destes catabólitos. Estes seriam então indicadores mais lentos da atividade neuronal e representariam mais propriamente mudanças a longo prazo na liberação destes neurotransmissores (Westerink, 1995). Para se discutir os efeitos do tratamento sobre os níveis de DOPAC e HVA devem-se primeiro considerar a origem deste DOPAC extracelular, tem sido descrito na literatura que a fonte de DOPAC é primariamente vinda do metabolismo, pela MAO, dos estoques de DA recém sintetizada, e não a partir da DA que é liberada no espaço extracelulare recaptada pára dentro do terminal pré-sináptico (Zetterstrom *etal.,* 1988; Gazzara e Andersen, 1994).

Portanto o DOPAC extracelular parece refletir o nivel de síntese de DA em curso nos terminais nervosos e não a DA liberada. Esta idéia é apoiada por estudos que demostram que os níveis de DOPAC extracelular não são singnificamente afetados por bloqueadores da captação de DA, tais como metilfenidato, a cocaína e a nomifensina (Nomikos *etal.,* 1990; Gazzara e Andersen, 1994). A partir dos resultados, pode-se então sugerir que os pesticidas utilizados em especial os já citados (lindano, flutriafol, DDT e paraquat) são capazes de provocar alterações no catabolismo da DA, comparando-se com os dados da literatura, pode-se inferir que a liberação de DA induzida por estes pesticidas leva a uma aceleração no índice de renovação da DA (turnover).

Pode-se afirmar também, de acordo com os resultados, que o aumento nos níveis extracelulares de DA, induzidos pela administração *in situ* dos pesticidas DDT, lindano e paraquat não se deve a uma inibição da enzima monoamina oxidase, uma vez que se ocorre-se tal inibição, estas substancias não estariam provocando uma elevação dos níveis de catabólitos DOPAC e HVA. Aumentos estes, que podem ser atribuídos a um possível acumulo intracelular de DA com conseqüente aumento “compensatório” de seu catabolismo.

Em um trabalho subseqüente observou-se uma possível intervenção destes compostos sobre as moléculas transportadoras dos terminais dopaminérgicos, foi observado que tanto organoclorados quanto piretróides afetaram a expressão do transportador de dopamina (DAT) e a quantidade de DA liberada no estriado (Kirby *etal.,* 1999; Karen *etal.,* 2001). Este aumento no transporte de DA acompanhada pelo aumento da expressão do DAT em membranas do tecido estriatal, assim como aumento do estresse oxidativo na célula dopaminérgica provocado pelo dieldrin, levam a ativação de fatores pró-apoptóticos e a uma disfunção mitocondrial culminando na morte celular por apoptose induzida o que seria uma possível via de toxicidade dopaminérgica destes pesticidas.

**8. CONCLUSÕES**

Os resultados mostram que a administração aguda de Deltaphos® em todas as doses utilizadas alterou o comportamento locomotor dos animais, causando um déficit da atividade locomotora. Entretanto o tratamento feito com Bravik® não foi capaz de produzir nenhuma alteração significativa na atividade locomotora.

Para os testes de ansiedade realizados no LCE vemos que o Deltaphos® foi capaz de produzir um efeito ansiogênico apenas na maior dose propondo que a maior dose deste composto é capaz de causar ansiedade nos animais. Para o tratamento realizado com Bravik®, vemos que apenas doses intermediarias (3mg/kg) foram capaz de produzir comportamentos de ansiedade nos animais.

Os testes de nado forçado para avaliação de depressão não apresentaram efeitos significativos para o tratamento com Deltaphos® sendo que apenas a maior dose (40mg/kg) causou diminuição no tempo de imobilidade dos animais sugerindo também uma diminuição proporcional da depressão. Para o tratamento com pesticida Bravik®, todas as doses, causaram uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais, mostrando que não foi produzido estado depressivo nestes animais.

A análise de atividade da enzima Acetilcolinesterase através do tratamento com Bravik® mostrou que após uma semana do tratamento houve uma diminuição significativa da atividade da enzima mostrando uma possível ação inibitória do pesticida sobre a enzima principalmente em intoxicações crônicas ou sub-crônicas.

Os resultados mostram que a infusão intraestriatal de 1 mM dos diferentes pesticidas induziu efeitos diferenciais sobre os níveis extracelulares de dopamina e seus metabólitos, DOPAC e HVA.

Praticamente todos os pesticidas usados aqui induziram aumentos nos níveis extracelulares de dopamina, sendo o paraquat, maneb e o DDT os pesticidas que induziram os principais efeitos. Por outro lado, o dicofol (1 mM) não produziu nenhum efeito significativo sobre os níveis extracelulares de dopamina.

Considerando-se os efeitos observados em termos de uma escala comparativa de potência, pode-se inferir que o paraquat seguido pelo maneb e o DDT são os pesticidas mais potentes em induzir a liberação *in vivo* de dopamina, enquanto que o dicofol, lindano e o flutriafol mostraram pequena potência em induzir esse efeito sobre a liberação de dopamina nas condições experimentais aqui utilizadas.

**9. REFERENCIAS**

ANDREATINI, R., Bacellar, L.F.S. The relationship between anxiety and depression in animal models: a study using the forced swimming test and elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 32: 1121-1126, 1999.

ANDEF. Manual do uso correto e seguro de produtos fitosanitários/Agrotóxicos. São Paulo, 2001

ARNERIC, S.P., Sullivan, J.P., Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., Briggs, C.A., Donnelly-Roberts, D., Radek, R.J., Marsh, K.C., Kyncl, J. Potential treatment of Alzheimer disease using cholinergic channel activators (ChCAs) with cognitive enhancement, anxiolytic-like, and cytoprotective properties. **Alzheimer Disease Associated Disorders**, 9: 50-61, 1995.

ATWEH, S., Simon, J.R., Kuhar, M.J. Utilization of sodium-dependent high affinity choline uptake in vitro as a measure of the activity of cholinergic neurons in vivo. **Life Science**, 17: 1535-1544, 1975.

BAIRD, C.**Química Ambiental**. **2ª ed.**, Porto Alegre, Bookman, 2002. 622p.

BARBEAU, A., Roy, M., CloutieR, T., Plasse, L., Paris, S. Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson’s disease. **Advances in neurology**, 45:

299-306, 1986.

BARKER, L.A., Downdall, M.J., Mittag, T.W. Comparative studies on synaptosomes: high-affinity uptake and acetylation of N-(Me-3H)choline and N-(Me-3H)n-hydroxyethylpyrrolidinium. **Brain Research**, 86: 343-348, 1975.

BITTO, L., Davson, H., Lavin, E., Murray, M., Snider N. The concentrations of amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysates of brain, and blood plasma of the dog. **Journal of Neurochemistry** 13: 1057 – 1067, 1996.

BRADFORD, H. F. Fundamentos de Neuroquímica. Ed. Labor. Barcelona, 1988.

BROOKS, A.I., Chadwick, C.A., Gelbard, H.A., Coryslechta, D.A., Federoff, H.J. Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. **Brain Research**, 823 :1-10, 1999.

BOYD, C.A., Weiler, M.H., Porter, W.P. Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixture. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 30: 209-221, 1990.

BUS, J.S., Gibson, J.E. Lipid peroxidation and its role in toxicology. In: **Reviews in Biochemical Toxicology**. Hodgson E, Bend JR, Philpot RM (eds) Elsevier, North-Holland, New-York, 125–149.

BUTTERFIELD, P.G., Valanis, B.G., Spencer, P.S., Lindeman, C.A., Nutt, J.G. Environmental antecedents of young-onset Parkinson’s disease. **Neurology**, 43: 1150-1158, 1993.

CALDAS, E.; SOUZA, L. C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira*.* ***R. Saúde Pública,*** *São Paulo, v.34, n. 5, p. 529-537, 2000*).

CANNAS, A., Costa, B., Tacconi, P., Pinna, L., Fiaschi, A. Dementia of Alzheimer Type (DAT) in a Man Chronically Exposed to Pesticides. **Institute of Neurology**, Univ. Of Calgary, 1991.

CARLTON, F.B., SIMPSON, W.M. & HADDAD, L.M. The Organophosphate and Other Insecticides. In: Haddad, L.M., Shannon, M.W., Winchester, J.F. Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose, Philadelphia, Pensylvania, USA. **WB Saunders Company, 3° ed**., 836-850, 1998.

CHINTA, S. J., ANDERSEN, J. K. Cell in focus: Dopaminergic neurons **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 37: 942-946, 2005

COOPER, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. Acetylcholine. In: **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 191-219, 1991.

COSTA, L.G., 1988. Interactions of neurotoxicants with neurotransmitter systems. **Toxicology** 49:359-366.

DAVIS, P., Maloney, J.R. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease. **Lancet**, 2: 1403, 1976.

DEFAZIO, G., Do Soleo, L., Zefferino, R., Livrea, P. Manganese toxicity in serumless dissociated mesencephalic and striatal primary culture. **Brain Research Bulletin**, 40: 257-262, 1996.

DRISS, M.R.; HENNION, M. C.; BOUGUERRA, M. L. **Journal of Chromatography A**, 639, 1993, p. 352-358.

DURÁN, R., Alfonso, M., Arias, B. Determination of bioegnic amines in rat brain dialysates by high performance liquid chormatography. **Journal of Liquid Cromatography & Related Technology** 21: 2799 – 2811, 1998.

ELLMAN, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7: 88–95, 1961.

ERIKSSON P., NORDBERG A. The effects of DDT, DDOH- palmitic acid, and a chlorinated paraffin on muscarinic receptors and the sodium-dependent choline uptake in the centraç nervous system of immature mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, 85: 121-7, 1986.

FAROOQUI, A.A., Horrocks, L.A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. **Journal of Neuroscience Research**, 38: 6-11, 1994.

FELDMAN, R. S., Meyer, J. S., Quenzer. L. F., Principles of neuropsychopharmacology. **Sunderland Sinauer**. 277-344, 1997.

FITSANAKIS, V.A., Amarnath, V., Moore, J.T., Montine, K.S., Zhang, J., MOntine, T.J. Catalysis of catechol oxidation by metal-dithiocarbamate complexes in pesticides. **Free Radical Biology and Medicine**, 33: 1714-1723, 2002.

FLEMING, L., Mann, J.B., Bean, J., Thomas, B., Sanchez- Ramos, J.R. Parkinson’s disease and brain levels of organochlorine pesticides. **Annais of Neurology**, 36: 100-103, 1994.

FROLICH, L., Riederer, P. Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. **Arzhneimittel-Forschung**, 45: 443-446, 1995.

GAGNAIRE. F, SIMON. P, BONNET. P, et al. 1986. The influence of simultaneous exposure to carbon disulfide and hydrogen sulfide on the peripheral nerve toxicity and metabolism of carbon disulfide in rats. **Toxicol Lett** 34: 175-184.

GAUVREAU, D. Le paradigme de la maladie d’Alzheimer. **Interface**, 8: 16-21, 1987.

GALLO, M & LAWRYK, N. Organic Phosphorus Pesticides. In Hayes, W.J, Laws, E. R. Handbook of Pesticides Toxicology. San Diego, California, USA. Academic Press, Inc., 2, p.917-1124, 1991.

GERFEN, C. R. The Neostriatal Mosaic: Multiple Levels of Compartmental Organization in the Basal.

HANDLEY, S.L, Mithani, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists in a maze-exploration model of “fear”-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**., 327: 1-5, 1984.

HOLDEN, A.V. Organochlorines – an overview. **Marine Pollution Bulletin**, 12: 110-115, 1981

HONORÉ, P., Hantson, P.H., FauvillE, J.P.H., Peeters A., Mahieu P. Paraquat poisining: State of the Art. **Acta Clinica Belgica**, 49:5, 1994.

IKONEM, S. The role of the septohippocampal cholinergic system in cognitive functions. 2001. **Dissertation (Doctoral) in Neuroscience and Neurology** - University of Kuopio, Finland

JEAN, H., Emard, J.F., Thouez, J.P., Houde, L., Robitaille, Y., Mathieu, J., Boily, C., Daoud, N., Beaudry, M., Cholette, A., bouchard, R., Veilleux, F., Gauvreau, D. Alzheimer’s disease: Preliminary study of spatial distribution at birth place. **Social Science & Medicine**, 42:871-878, 1996.

JOHNSTON, A. E. "Soil organic-matter, effects on soils and crops". Soil use management. 1986, p. 97-105

KACKAR, R., Srivastava, M.K., Raizada, R.B. Assement of toxicological effects of mancozeb in male rats after chronic exposure. **Indian Journal of Experimental Biology**, 37:553-559, 1999.

KAKKO, I., Toimela, T., Tähti, H. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. **Chemosphere**, 51: 475-480, 2003.

LETZ R., Green, R. C., Woodard, J.L. Development of a computer-based battery designed to screen adults for neuropsychological impairment. **Neurotoxicology and Teratology** 18: 365-70, 1996.

LEVIEL, V., Gobert, A., Guibert, B., Direct observation of dopamine compartmentation in striatal nerve terminals by ‘in vivo’ measurement of the specific activity of released dopamine. **Brain Research** 499, 205-213, 1989.

LOPES DA SILVA, F.H., Arnolds, D.E.A.T. Physiology of the huppocampus and related structures. **Annual Review of Physilogy**. 40: 185-216, 1978.

LOEWI, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pfluegers Archives, 189: 239-242, 1921.

LOWRY, O.H., Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent**.** **J Biol Chem**1951; 193:265-75.

LUNDBERG I., Hogberg, M. Michelsen, H., Nise, G. Hogstede, C. Evaluation of the Q16 questionnaire on neurotoxic symptoms and a review of its use. **Occupational Envirommental Medicine** 54: 343 – 50, 1997.

MARRS, T.C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & Therapeutics**, 5: 51– 66, 1993.

MESULAM, M., Mufson, E.J., Wainer, B.H., Levey, A.I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). **Neuroscience**, 10: 1185-201, 1983.

MOLLACE, V., Lannone, M., Muscolia, C., Palma, E., Granato, T., Rispoli, V., Nisticò, R., Rotiroti, D., Salveminic, D. The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic. **Neuroscience Letters**, 335: 163-166, 2003.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 48: 254-260, 1955.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacology and Toxicology**, 78: 1–14, 1996.

NEDERGAARD, O.A. Catecholamine: Regulation, release and inactivation. **Pharmacology Toxicology** 63: 5-8, 1998.

NITSCH, R.M., Wurtman, R.J., Growdon, J.H. A biochemical cell membrane lesion specific to Alzheimer’s disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 69: 1671-l675, 1992.

OPAS/ OMS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Organização Pan-Americana de Saúde (Representação do Brasil)/ Organização Mundial de Saúde, Brasília, 1996.

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. **Journal of Neuroscience Methods**, 14: 149-167, 1985.

PENTYALA, S.N., Chetty, C.S. Comparative study of the changes in AchE and ATPase activities in neonate and adult rat brains under thiobencarb stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 13:39-42, 1993.

RAY, D.E. Pyrethroid insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning syndromes, paresthesia, and therapy. In: **Handbook of Pesticide Toxicology**: Vol 2: Agents (Krieger R, Doull J, Ecobichon D, eds). San Diego:Academic Press, 1289–1303, 2001.

RACKÉ, K., Matthiesen, S. The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, 17: 181-198, 2004.

SCOVILLE, W.B, Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampus

REIDY, T.J., Bowler, R.M., Rauch, S.S., Pedroza, G.I. Pesticide exposure and neuropsychological impairment in migrant farm workers. **Archives of Clinical Neuropsychology**, 7: 85-95, 1992.

SAVOLAINE, R., Hervonen, H. Dithiocarbamate fungicides decrease histochemical reactivity of cholinesterase in the gut wall of the rat. **Archives of Toxicology. Supplemen**, 8: 272-276, 1985.

SCOVILLE, W.B, Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampus lesions. **The Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, 20: 11-21, 1957.

SEMCHUK, K.M., Love, E.J., Lee, R. Parkinson’s disease and exposure to rural environmental factors: A population based case-control study. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, 18: 279-286, 1991.

SHAFER, T.J., Meyer, D.A., Crofton, K.M. Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. **Environmental Health Perspectives**, 113: 123-136, 2005.

SHIBAYAMA, H., Kasahara, Y., Kobsayashi, H. Prevalence of dementia in japanese elderly population. **Acta Psychology Scand**, 74: 144-151, 1986.

STEENLAND, K., Jenkins, B., Ames, R.G., O’Malley, M., Chrislip, D., Russo, J. Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. **American Journal of Public Health**, 84: 731-736, 1994.

STEPHENS, R., Spurgeon, A., Calvert, I.A., Beach, J., Levy, L.S., berry, H., Harrington, J.M. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphate in sheep dip. **Lancet**, 345: 1135-1139, 1995.

SILVA, P. Farmacologia. 7 ed. Ed. Guanabara Koogan. RJ: 2006

SIMON, J.R., Kuhar, M.J. Impulse flow regulation of high affinity choline uptake in brain cholinergic nerve terminals. **Nature**, 255: 162-163, 1975.

STOCKER, H.S.; SEAGER, S.L., **Química Ambiental, Contaminación del aire y del agua**. Barcelona: Editorial Reverté, 1985.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In Goodman and Gilman’s The Pharmacological Bases of Therapeutics *(*Gilman, A.G., Goodman, L.G., Rall, T.W., Murad, F. Eds.) 110-129, 1985.

TREVISAN, M.T.S., Macedo, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinasterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Quimica Nova**, 26: 301-304, 2003.

UNGERSTEDT, U. Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis, In: Measurement of neurotransmitter release *in vivo* (Mardsen, C. A., ed.) p.81 – 107, Wiley and Sons, New York, 1982.

VERSCHOYLE, R.D., Aldridge, W.N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. **Archives of toxicology**. 45: 325–329, 1980.

WHITEHOUSE, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delong, M.R. Alzheimer’s disease: Evidence for the selective loss of cholinergic neurones in the nucleus basalis. Ann. **Neurology**, 10: 122–126, 1981.

YAMAMURA, H.I, Snyder, S.H. High affinity transport of choline into synaptosomes of rat brain. **Journal of Neurochemistry**, 21: 1355-1374, 1973.

YOGUI. Ocorrência de compostos organoclorados (pesticidas e PCBs) em mamíferos marinhos da costa de São Paulo (Brasil) e da Ilha Rei George (Antártica). Dissertação (Mestrado). **Instituto de Oceonografia da Universidade de São Paulo**, 2002, 157p.

YOSHIMURA, Y., Watanabe, Y., Shibuya, T. Inhibitory effects of calcium channel antagonists on motor dysfunction induced by intracerebroventricular administration of paraquat. **Pharmacology and Toxicology**, 72: 229–35, 1993.

ZAPATA, A., Capdevila, J.L., Trullas, R. Role of High-Affinity Choline Uptake on Extracellular Choline and Acetylcholine Evoked by NMDA. **Synapse**, 35: 272-280, 2000.