



UFES



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

EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELO ORGANOFOSFORADO
TRIAZOFÓS SOBRE O PROCESSAMENTO DE RESPOSTAS AVERSIVAS
NO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO EM RATOS

VITÓRIA

2020

EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELO ORGANOFOSFORADO
TRIAZOFÓS SOBRE O PROCESSAMENTO DE RESPOSTAS AVERSIVAS
NO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO EM RATOS João Vitor Ferreira
Rodrigues

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nivea Sampaio

VITÓRIA

2020

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

F383e Ferreira Rodrigues, João Vitor, 1993-
Efeito da Intoxicação Aguda pelo Organofosforado Triazofós Sobre o Processamento de Respostas Aversivas no Medo Condicionado ao Contexto / João Vitor Ferreira Rodrigues. - 2020.
83 f. : il.

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

1. Memória. 2. Organofosforado. 3. Triazofós. 4. Comportamento. 5. Medo condicionado ao contexto. 6. Extinção. I. Harres, Vanessa Beijamini. II. Nívea Sampaio, Karla. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 615.1

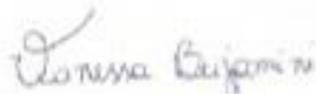
João Vitor Ferreira Rodrigues

**EFEITO DA INTOXICAÇÃO AGUDA PELO
ORGANOFOSFORADO TRIAZOFÓS SOBRE O
PROCESSAMENTO DE RESPOSTAS AVERSIVAS NO
MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO EM RATOS**

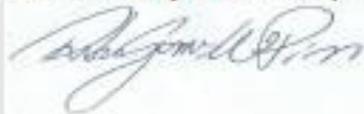
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado(a) em 21 de agosto de 2020.

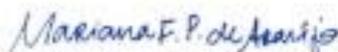
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr.ª Vanessa Beijamini Harres (orientadora) - UFES



Prof. Dr.ª Rita Gomes Wanderley Pires - UFES



Prof. Dr.ª Mariana Ferreira Pereira de Araújo - UFES

Vitória/ES
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus** pelo acompanhamento e força de vontade que me dá a cada dia.

Aos meus pais **Ramon** e **Vera** por terem me dado toda oportunidade que tive de estar até aqui, desde o início da graduação até este final do mestrado. Sempre me guiando e ensinando a ser gentil, honesto e batalhar por meus desejos e uma vida melhor. É Graças a vocês que souberam ser os melhores pais que um filho pode ter, com grande amor no coração que sou o que sou e serei o que posso, não existem palavras para dizer como são bons para mim.

A meu irmão **Luiz Felipe** que sempre esteve ao meu lado, meu melhor amigo e que sempre estendeu a mão para tudo, sem seu suporte não poderia ter conseguido chegar aqui com certeza.

A minha gentil namorada **Francieli Lucas** que está sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais distantes. Você entrou na minha vida pra me mostrar que um bom amor sempre conforta o coração. Te amo...

Aos meus familiares que me mostraram que uma família unida é um laço que traz grande estabilidade e vontade de continuar. A minha outra família que são meus grandes amigos **Pedro**, **Rafael Brum**, **Gustavo Guita**, **Raphaella** e **Genilson** que sempre estiveram ao meu lado desde muito tempo, estão nesta trajetória e só tenho a agradecer pela amizade.

A **Vanessa** pela grande orientação e ensinamentos no decorrer desta estrada, sua paciência e sabedoria me mostraram uma ótima maneira de ser, sua dedicação como professora e orientadora faz valer todo o caminho mostrado, mesmo eu não tendo experiência anterior, ela se dedicou bastante para que seus ensinamentos fossem passados. Mostrando que um trabalho nunca é sozinho, juntos podemos construir grandes coisas.

Aos amigos que fiz no **laboratório de psicofarmacologia**, sem sua colaboração tal trabalho jamais poderia ser feito, desde os aprendizados de fazer cafés que **Anna** ensinou, companheirismo de **Cristina**, **Julia Ayub** e os “novatos” **Raphael** e **Gabriela**. Com todo o pessoal dando suporte não tinha como não aprender, a ajuda de cada um foi definitiva para realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz do “laboratório do lado”, vulgo **Laboratório de Investigação Fármaco-Toxicológica da Função Cardiovascular**, vocês ajudaram muito desde o início para uma melhor formação, a todos meu sincero obrigado.

Um agradecimento especial a minha co-orientadora **Karla Nívea Sampaio** que com seu vasto conhecimento pode direcionar este trabalho de maneira mais correta possível, é deveras importante sua presença nesta faculdade como um todo e especialmente neste trabalho.

Agradeço as professoras **Rita Gomes** e **Mariana Ferreira** pelo aceite da banca, suas contribuições com certeza serão de grande proveito para o crescimento do trabalho.

E por fim a **CAPES** e **FAPES** pelo apoio financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 AGROTÓXICOS	2
1.2 ORGANOFOSFORADOS	4
1.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS OF	5
1.2.2SINAIS E SINTOMAS DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR OF	9
1.3 OF E MEMÓRIA.....	10
1.4 ESTRESSES E OF	15
1.5 TRIAZOFÓS.....	17
2. HIPÓTESE.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 GERAL.....	21
3.2 ESPECÍFICOS	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 ANIMAIS	23
4.2 DROGA.....	23
4.2.1 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TZF	23
4.3 MODELOS COGNITIVO/COMPORTAMENTAIS.....	23
4.3.1 TESTE DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	23
4.3.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	25
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	E PROCEDIMENTO
	26
4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS	29
4.6 PREPARO DE AMOSTRAS E DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS	
COLINESTERASES.....	30
4.6.1 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE	30
4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	31
4.6.1 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA	31
4.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA	32
5. RESULTADOS	33
5.1 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	34
5.2 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL	37
5.3 BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA.....	39
5.3 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	43

7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS	52
9. ANEXO 1	62
10. APÊNDICE	64

RESUMO

Estudos pré-clínicos e clínicos sugerem que a exposição a compostos organofosforados (OF) provoca alterações emocionais e no aprendizado e memória, possivelmente relacionadas à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no sistema nervoso central. O triazofós (TZF) é um OF moderadamente tóxico cujo efeito sobre a memória de natureza aversiva ainda não foi investigado. Diante disso, nosso objetivo foi avaliar se a intoxicação aguda por TZF prejudicaria o processamento de memória aversiva no medo condicionado ao contexto (MCC). Ratos Wistar adultos foram submetidos ao protocolo de MCC (condicionamento, extinção e teste), no qual foi medida a resposta de congelamento. O TZF foi administrado nas doses de 7,5, 15 ou 30 mg/kg (i.p) após a sessão de condicionamento ou após a sessão de extinção do MCC. Ao final de cada protocolo, os animais foram sacrificados para coleta do hipocampo e da amígdala, estruturas nas quais foi medida a atividade da AChE, bem como para coleta de plasma para quantificar a atividade da butirilcolinesterase (BChE). De forma complementar, grupos independentes de animais foram tratados com TZF para avaliar sua influência sobre a memória associativa não aversiva no teste de reconhecimento de objeto (TRO). Os resultados mostraram que a dose de 15 mg/kg de TZF, administrada logo após a sessão de condicionamento do MCC, prejudicou a extinção da resposta de congelamento. Já a administração de TZF logo após a sessão de extinção não alterou a consolidação da extinção quando comparando ao grupo controle. Houve decréscimo da atividade da AChE no hipocampo 24 h e 48 h após a administração de TZF (15 e 30 mg/kg), e um decréscimo na amígdala 24 h após a intoxicação com a maior dose de TZF (30 mg/kg). A atividade da BChE plasmática se mostrou reduzida 24 h ou 48 h após a administração de TZF em todas as doses testadas. O TZF não alterou a discriminação do objeto novo no TRO. Em conjunto, nossos resultados sugerem que uma única exposição ao TZF prejudica a aquisição/consolidação da extinção do MCC sem afetar a memória não aversiva. Esse efeito parece estar relacionado com a inibição da AChE no hipocampo dos ratos expostos ao TZF.

Palavras-Chave: Memória. Organofosforado. Triazofós. Comportamento. Medo Condicionado ao Contexto. Hipocampo.

ABSTRACT

Pre-clinical and clinical studies suggest that exposure to organophosphate compounds (OP) causes emotional and memory changes, possibly related to the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the central nervous system. Triazophos (TZP) is a moderate hazardous OP whose effect on aversive memory has not yet been investigated. Therefore, our objective was to assess whether acute TZP intoxication would impair aversive memory in the contextual fear conditioning (CFC). For this, adult Wistar male rats were submitted to the CFC (conditioning, extinction and test), in which the freezing response was measured. TZP was administered at doses of 7.5, 15 or 30 mg/kg (i.p) after the conditioning or the extinction session. At the end of each protocol, the animals were sacrificed for collecting of the hippocampus and amygdala, structures in which AChE activity was measured, as well as for collecting plasma to quantify butyrylcholinesterase (BChE) activity. In addition, independent cohorts of animals were treated with TZP to assess their influence on non-aversive associative memory in the novel object recognition test (NORT). The results showed that the dose of 15 mg/kg of TZP, administered immediately after the conditioning session of CFC, impaired the extinction of freezing response. The administration of TZP immediately after the extinction session did not alter the consolidation of the extinction compared to the control group. There was a decrease in AChE activity in the hippocampus 24 and 48 h after the administration of TZP (15 and 30 mg/kg), and a decrease in the amygdala 24 h after intoxication with the highest dose of TZP (30 mg/kg). Plasma BChE activity was reduced 24 or 48 h after TZP administration in all tested doses. The TZP did not change the discrimination of the new object in the NORT. Together, our results suggest that a single exposure to TZP impairs the acquisition/consolidation of the extinction in the CFC without affecting non-aversive memory. This effect seems to be related to AChE inhibition in the hippocampus of rats exposed to TZP.

Keywords: Memory. Organophosphate. Triazophos. Behavior. Contextual Fear Conditioning.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos no Brasil.

Tabela 2: Número de casos de exposições/intoxicação por grupo de agentes no ES 2016.

Tabela 3: Sinais agudos de intoxicação por organofosforados.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do ácido fosfórico, ácido fosfônico e ácido fosfínico.

Figura 2: Estrutura geral dos organofosforados.

Figura 3: Neurotransmissão colinérgica demonstrando a inibição da AChE promovida por OF.

Figura 4: AChE ligada ao neurotransmissor ACh, em seu sítio esteárico a porção de serina ligada à carbonila.

Figura 5: Presença do OF se ligando a AChE promovendo a fosforilação da enzima.

Figura 6: Representação esquemática das sinapses colinérgicas no sistema nervoso periférico e sistema nervoso central.

Figura 7: Curso de eventos dos danos provocados pela intoxicação por OF.

Figura 8: Caixa de condicionamento para o teste de medo condicionado ao contexto.

Figura 9: Figura A demonstrando sessão treino e figura B sessão teste, no teste de reconhecimento de objetos.

Figura 10: Fluxograma do protocolo do teste do medo condicionado ao contexto com aplicação do TZF após a sessão de condicionamento.

Figura 11: Fluxograma do protocolo do teste do medo condicionado ao contexto com aplicação do TZF após a sessão de extinção.

Figura 12: Fluxograma do protocolo do teste de reconhecimento de objeto com aplicação pós habituação para avaliar **aquisição** da memória de longa duração.

Figura 13: Fluxograma do protocolo do teste de reconhecimento de objeto com aplicação pós treino para avaliar **consolidação** da memória de longa duração.

Figura 14: Representação da determinação da atividade de butirilcolinesterase plasmática.

Figura 15: Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes do teste), nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg em comparação ao grupo controle (salina) no teste do medo condicionado ao contexto.

Figura 16: Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de condicionamento (48h antes do teste) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg comparado ao grupo controle sobre os 6 primeiros minutos da sessão extinção no teste do medo condicionado ao contexto.

Figura 17: Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de extinção (24h antes do teste) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg comparado ao grupo controle no teste do medo condicionado ao contexto.

Figura 18: Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes do teste) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg comparado ao do grupo controle (salina) sobre a expressão do medo nos 6 primeiros minutos da sessão extinção no teste do medo condicionado ao contexto.

Figura 19: Atividade de AChE (expressa em $\mu\text{mol ATCh/h/mg}$ de proteína) na região do hipocampo em ratos tratados **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou com salina e; **(B)** imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou de salina.

Figura 20: Atividade de AChE (expressa em $\mu\text{mol ATCh/h/mg}$ de proteína) na região da amígdala em ratos tratados **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou com salina 1 ml/kg após a sessão de condicionamento no medo condicionado ao contexto (48h antes do teste) e; **(B)** imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou de salina 1 ml/kg após a sessão de extinção no medo condicionado ao contexto (24h antes do teste).

Figura 21: Atividade da BChE plasmática (U/L) em ratos tratados com TZF **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou com salina e; **(B)** imediatamente após a sessão

de extinção (24 h antes da eutanásia) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou de salina.

Figura 22: Efeito da intoxicação aguda por TZF, administrado imediatamente após a habituação, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg e do grupo controle (salina).

Figura 23: Efeito da intoxicação aguda por TZF, administrado imediatamente após o treino, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, comparado ao grupo controle (salina).

Figura 24: Certificado do comitê de ética e uso com animais (CEUA).

Figura 25: Efeito da intoxicação aguda por TZF, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, avaliando qualitativamente os sinais de salivação e lacrimejamento por 4 horas após a intoxicação.

Figura 26: Efeito da intoxicação aguda por TZF, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, avaliando qualitativamente os sinais de exoftalmia e coordenação motora por 4 horas após a intoxicação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

Acetil – Coa – Acetilcoenzima A

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BChE – butirilcolinesterase

ChAT – Colina Acetiltransferase

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DPN – Dia Pós-Natal

DFP - Diisopropilfluorofosfato

DL50 – Dose Letal

DG – Dia Gestacional

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ES – Espírito Santo

EUA – Estados Unidos da América

mAChR – Receptor Colinérgico Muscarínico

nAChR – Receptor Colinérgico Nicotínico

MLD – Memória de Longa Duração

MCD – Memória de Curta Duração

NMDA - N-metil D-Aspartato

OF – Organofosforado

PAG – Substância Cinzenta Periaquedutal

PIB – Produto Interno Bruto

RNAm – RNA mensageiro

SINAN – Sistema de Informações de Agravos de Notificação

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TEA – Transtorno do Estresse Agudo

TEPT – Transtorno de Estresse Pós-Traumático

TOXEN – Centro Toxicológico do Espírito Santo

TRO – Teste de Reconhecimento ao Objeto

TZF - Triazofós

VACHT – Transportador vesicular de acetilcolina

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

Agrotóxicos ou “defensivos agrícolas” são substâncias químicas usadas para proteger os plantios agrícolas de pestes ou pragas, por isso também são chamados de praguicidas ou pesticidas (MORAGAS, W.; SCHNEIDER e colab., 2003). Os agrotóxicos são globalmente utilizados, sendo categorizados como inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodenticidas, larvicidas, entre outros (O’MALLEY, 1997).

No Brasil a classificação toxicológica proposta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) segue os padrões de toxicidade oral aguda denominada dose letal 50 (DL₅₀) para ratos, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos no Brasil.

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa Colorida (Advertência)
I	Extremamente tóxico	<5mg/kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50mg/kg	Vermelha
III	Moderadamente tóxico	Entre 50 e 300mg/kg	Amarela
IV	Pouco tóxico	Entre 300 e 2000mg/kg	Azul
V	Improvável de Causa Dano Agudo	Acima de 2000mg/kg e 5000mg/kg	Azul
VI	Não classificado	Acima de 5000mg/kg	Verde

Fonte: Adaptado, ANVISA (2016).

Esta classificação que recentemente sofreu alteração pela ANVISA, onde produtos “extremamente tóxicos” ou “altamente tóxicos” serão assim

considerados somente quando causem morte se ingeridos ou entrem em contato com olhos e pele. Essa modificação leva a uma redução do número de produtos identificados como tarja vermelha. Essa mudança reflete maior fragilidade nas leis que regulamentam o registro e venda de pesticidas (ANVISA, 2019).

Dados do consumo de pesticidas no Brasil mostram que nosso país apresentou o maior uso de agrotóxicos em 2012, ultrapassando os Estados Unidos. No ano seguinte, agrotóxicos no Brasil representaram 20% do total de uso mundial, com um produto interno bruto (PIB) de 10 bilhões. Isso gera danos à saúde dos trabalhadores rurais, uma vez que fazem uso inadequado do equipamento de proteção individual (EPI), o manuseio se torna inseguro, bem como uma maneira de descarte irregular (REUTERS, 2015).

No Espírito Santo, refletindo o que ocorreu no Brasil, também houve um grande aumento de uso de agrotóxicos entre 2007 e 2013. De fato, o Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) mostra que entre os anos de 2007 e 2015 houve maior número de notificações que envolviam intoxicações por agrotóxicos, com destaque para o Espírito Santo (SINAN, 2019). Já o Centro Toxicológico do Espírito Santo (TOXCEN) apresentou dados nos quais mostra que os agrotóxicos de uso agrícola foram o 3º maior grupo de agentes responsáveis por intoxicações em humanos no ano de 2016, representando 6,83% do total (Tabela 2). Neste mesmo ano, foram registradas 359 tentativas de suicídios com uso de agrotóxicos no estado do Espírito Santo (TOXCEN, 2016).

Tabela 2. Número de casos de exposições/intoxicação por grupo de agentes no ES 2016.

Agente	Total nº de Casos	Total %
Animais	4528	36,29
Peçonhentos		
Medicamentos	3929	31,49
Agrotóxicos/Uso Agrícola	852	6,83
Outros	3167	25,39

Fonte: Modificado de TOXCEN (2016).

1.2 ORGANOFOSFORADOS

Os primeiros compostos OF começaram a ser usados no século 20. A compreensão de suas estruturas químicas avançou com os estudos de Lassaigue em 1820, que demonstrou a esterificação do ácido fosfórico. Um melhor entendimento sobre a atividade inseticida dos compostos de fósforo OF foi demonstrada por Shrader em 1930, levando à criação de novos compostos OF para a indústria (STODDARD apud SANTOS e colab., 2007). No ano de 1965 foi registrada a entrada dos principais OFs no mercado e, no final da década de 60, eles já eram os principais agrotóxicos disponíveis (CASIDA e DURKIN, 2013).

Os OF são ésteres ou tióis derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico ou fosfínico, estruturas representadas na figura 1 (ČOLOVIĆ e colab., 2013). Um organofosfato que tenha seu átomo de enxofre ligado ao fósforo na dupla ligação é, então, denominado tiofosforado, enquanto se tiver um oxigênio será organofosforado, estrutura representada na figura 2 (GOEL e AGGARWAL, 2007).

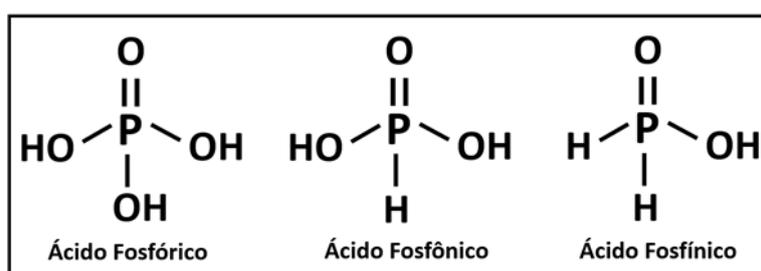


Figura 1. Estrutura do ácido fosfórico, ácido fosfônico e ácido fosfínico (VIDIGAL, 2018).

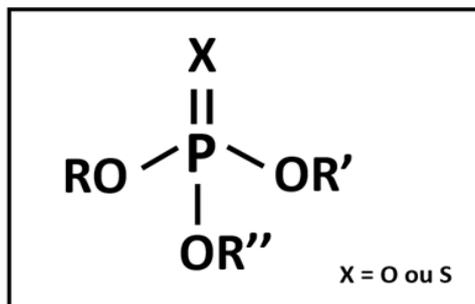


Figura 2. Estrutura geral dos organofosforados (VIDIGAL, 2018). **R1 e R2** = São grupos arila ou alquil ligados ao átomo de fósforo, formando fosfinatos. **X** = Grupo também ligado ao átomo de fósforo através do átomo de oxigênio ou enxofre, podendo pertencer a uma variedade de grupos halogênicos, alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos. **Fonte:** (ČOLOVIĆ e colab., 2013).

Os OF são mais utilizados na agricultura devido a sua atividade inseticida, mas também exercem função herbicida, fungicida, entre outras. Os OF também são utilizados na prevenção de doenças, por eliminarem vetores, como o *Anopheles gambiae*, transmissor da malária, na África, e o *Aedes aegypt*, transmissor da dengue, Zika vírus e chikungunya, em países como o Brasil e os EUA (“Center for Disease Control and Prevention (CDC)”, 2019; NAUGHTON e TERRY, 2018a).

A absorção dos OF acontece principalmente através da inalação ou ingestão, já que seu caráter lipofílico faz com que sua absorção seja rápida por essas vias. Já o contato com a pele resulta em uma absorção por via dérmica de forma mais lenta, assim como a gravidade da intoxicação por essa via parece ser menor (VALE, 1998).

A maioria dos OF são metabolizados pelo sistema citocromo P450 (CYP450) presente no fígado, indo da forma tiol (P=S) não metabolizada, para a forma oxon (P=O), um metabólito ativo (BURATTI e colab., 2005; EYER e colab., 2006).

1.2.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS OF

As colinesterases, especialmente a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE), são enzimas alvo dos OF. A AChE é encontrada no sangue, músculos, sistema nervoso central e periférico, onde usualmente está acompanhada de uma pequena porção de BChE (BAJGAR, 2004 apud

POHANKA, 2011). A BChE é mais predominante no fígado e no plasma, não tendo um papel fisiológico completamente elucidado. Também referida como pseudoacetilcolinesterase, é normalmente utilizada como marcador de intoxicação por OF (POHANKA, 2011 apud BAJGAR, 2004).

Os OF inibem a AChE e a BChE através da fosforilação não-reversível das esterases, levando a um acúmulo da acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas (ČOLOVIĆ e colab., 2013).

A ACh é sintetizada no citosol dos terminais dos neurônios colinérgicos pela acetilação da colina promovida pela acetiltransferase (ChAT) e na presença de um doador do grupo acetil, a Acetil-CoA. A ACh é captada por um transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) e armazenada em vesículas até o momento de ser liberada na fenda sináptica, onde pode interagir com os receptores colinérgicos pós ou pré-sinápticos. A AChE, presente na fenda sináptica, tem a função de degradar a ACh em colina, que é recaptada para o terminal pré-sináptico e acetato, conforme ilustrado na figura 3 (PARSONS e colab., 1993 apud MARTINS e SILVA, 2008).

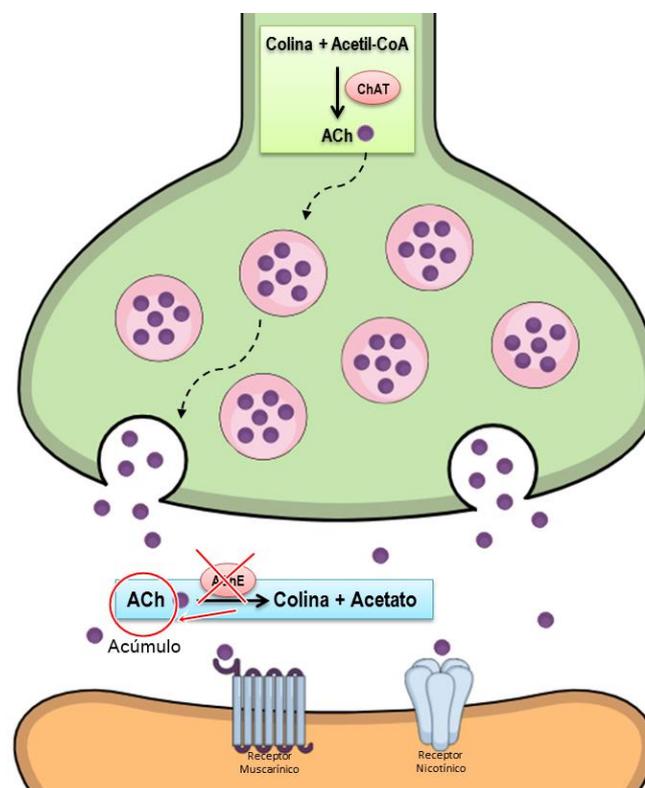


Figura 3. Neurotransmissão colinérgica demonstrando a inibição da AChE promovida por OF.

Fonte: Modificado de VIDIGAL, (2018).

Para que a hidrólise promovida pela AChE aconteça, é necessário que um resíduo de serina interaja com a carbonila da ACh (Fig. 4). Com a presença de um OF no meio, a serina será fosforilada, o que impede a hidrólise da ACh (Fig. 5). A serina fosforilada pode reagir com a água, um processo lento seguido de uma desalquilação do grupo alcóxila, ligada ao átomo de fósforo, processo esse conhecido como “envelhecimento”(LIN e colab, 1995 apud SANTOS e colab., 2007).

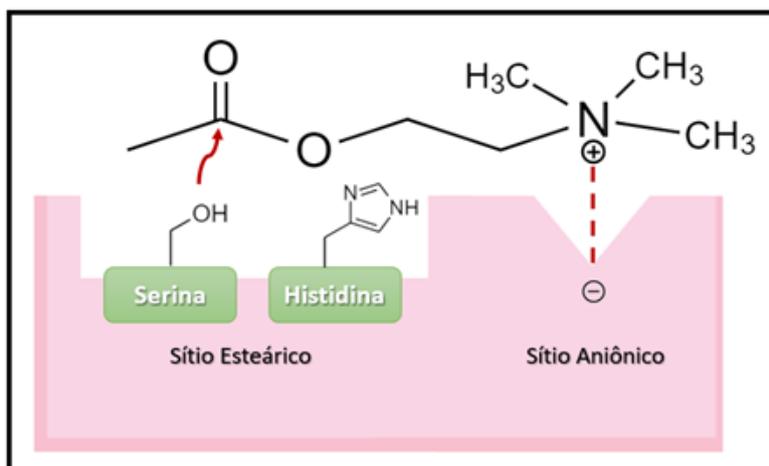


Figura 4. AChE ligada ao neurotransmissor ACh, em seu sítio estereário a porção de serina ligada à carbonila. **Fonte:** (VIDIGAL, 2018).

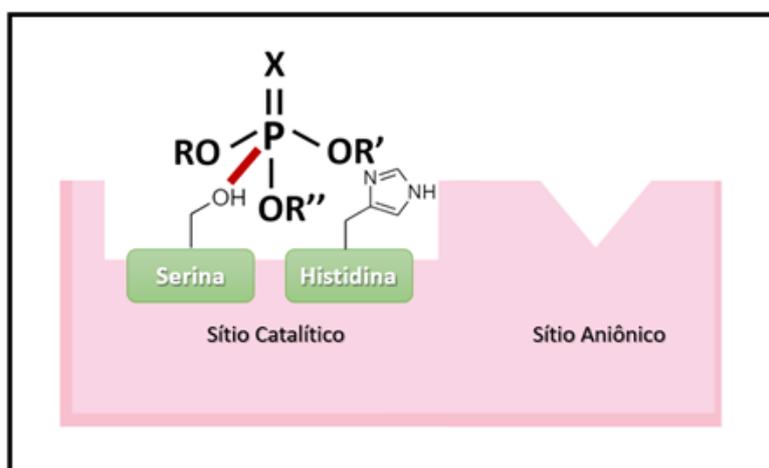


Figura 5. Presença do OF se ligando a AChE promovendo a fosforilação da enzima. **Fonte:** (VIDIGAL, 2018).

Quando ocorre o envelhecimento da AChE, o tratamento com oximas, antídotos padrão nos casos de intoxicação por OF, não surte mais efeito. Porém, cada composto OF se comporta de maneira particular quanto ao tempo em que esta

reação ocorre. Um OF como o soman tem um envelhecimento enzimático médio de 6,3 minutos após a inibição enzimática, enquanto VX tem um tempo médio de 1,5 dias (MASSON e colab., 2010; WOREK e colab., 2008).

O acúmulo de ACh nas sinapses colinérgicas faz com que ela ative excessivamente os seus receptores muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR). Os receptores muscarínicos são encontrados em órgãos inervados por fibras parassimpáticas pós-ganglionares e no SNC (CANNARD, 2006). Os receptores nicotínicos estão presentes nas junções neuromusculares do músculo estriado esquelético, em todos os gânglios autonômicos parassimpáticos e simpáticos, bem como também são encontrados no sistema nervoso central (SNC) (CANNARD, 2006). A figura 6 representa a distribuição de ACh e receptores colinérgicos no sistema nervoso periférico (SNP) bem como SNC.

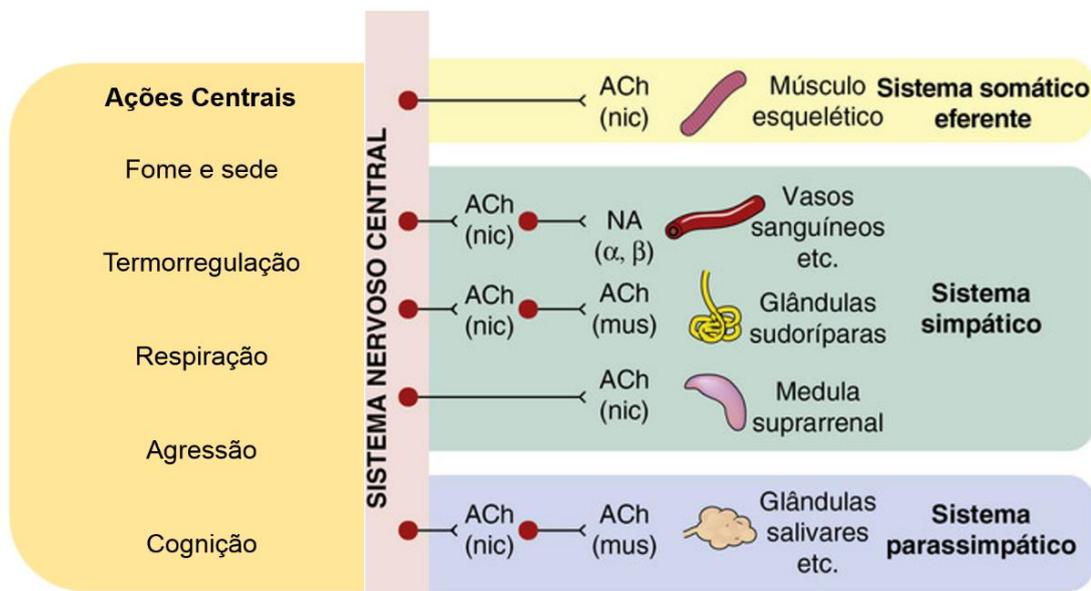


Figura 6. Representação esquemática das sinapses colinérgicas no sistema nervoso periférico **Nic:** Nicotínico. **Mus:** Muscarínico. **ACh:** Acetilcolina. **NA:** Noradrenérgico.

Fonte: Modificado de (MILESON, B E e colab., 1998).

A atuação dos OF como inseticidas acontece após a inibição da AChE. O excesso de ACh na junção neuromuscular dos insetos leva à dessensibilização dos receptores nicotínicos, ocasionando paralisia e morte (PADILHA e colab., 1994 apud SANTOS e colab., 2007).

1.2.3 SINAIS E SINTOMAS DA INTOXICAÇÃO AGUDA POR OF

Nos seres humanos, intoxicações crônicas por OF são as mais comuns, mas intoxicações agudas também podem ocorrer em diferentes circunstâncias. Por exemplo, a intoxicação aguda, pode ocorrer por contato ou ingestão acidental, vaporização aérea, terrorismo/guerra e pela ingestão deliberada em tentativas de suicídio, sendo essa última a mais comum (BURILLO-PUTZE e XARAU, 2016 apud EDDLESTON, 2018; NAUGHTON e TERRY, 2018b).

Os sinais e sintomas decorrentes da intoxicação aguda por OF se devem, inicialmente, à ativação excessiva de receptores muscarínicos e nicotínicos. Destaca-se o aparecimento de secreções (salivação, micção, lacrimejamento) e defecação, sinais que estão presentes logo no início da intoxicação, seguidos de broncoconstrição, dores de cabeça, visão borrada e diarreia (KAMANYIRE e KARALLIEDDE, 2004).

Os sinais da intoxicação por OF no sistema nervoso parassimpático são decorrentes da ativação dos receptores muscarínicos, localizados nos órgãos efetores, como glândulas salivares, olhos, sistema respiratório, trato gastrointestinal, coração e sangue, em eritrócitos, linfócitos e superfície de plaquetas (MILESON, B, 1998).

Já a ativação excessiva dos receptores nicotínicos que estão localizados nos gânglios das divisões parassimpáticas e simpáticas do sistema nervoso autônomo, bem como nas junções neuromusculares, gera sinais como taquicardia, hipertensão, tremores e outros (MILESON, B, 1998).

Após a hiperestimulação dos receptores nicotínicos pode ocorrer a dessensibilização, uma resposta fisiológica adaptativa, que resulta de alteração da conformação dos receptores e ausência de influxo de sódio. Nas junções neuromusculares isso pode gerar um declínio da função motora, levando à fraqueza muscular.

Os casos de morte por OF geralmente são resultado da parada respiratória devido a um conjunto de efeitos: paralisia do diafragma, depressão do sistema respiratório cerebral, secreção bronquial e broncoespasmos. Pode também haver falhas cardiovasculares em intoxicações por OF (EDDLESTON e colab.,

2008 apud BARELLI e colab., 2011). Sinais e sintomas decorrentes da intoxicação aguda por OF estão listados na tabela 3 (VENTURA e colab., 2010 apud SCHEFFEL e colab., 2018).

Tabela 3. Sinais agudos da intoxicação por organofosforados.

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

Fonte: Modificado de MILESON (1998).

Nos casos em que os pacientes sobrevivem à crise colinérgica aguda, alguns destes tendem a apresentar sinais mais tardios da intoxicação por OF, chamados de síndrome intermediária, que pode ocorrer em cerca de 24 a 96 h após a crise aguda e não é caracterizada pela inibição da atividade das colinesterases. Entre 20 a 50% dos pacientes são sintomáticos (SENANAYAKE e KARALLIEDDE, 1987). É comum ter sinais de fraqueza muscular nos músculos proximais dos membros e flexores do pescoço nestes casos e sua fisiopatologia ainda é desconhecida, mas é reconhecido seu envolvimento aos receptores nicotínicos (DE SOUSA e colab., 2009; WALKER e NIDIRY, 2002).

1.3 OF E MEMÓRIA

Memória é um dos processos primordiais para a formação da consciência, reconhecimento espacial e aprendizado. Ela advém de processos cognitivos corticais relacionadas a áreas do sistema límbico, como hipocampo e amígdala (BERNECKER, 1965).

Os processos de construção da memória são, resumidamente, a aquisição, consolidação e evocação. A *aquisição* é o primeiro passo, onde a sensação ou estímulo é recebida, levada para o SNC e processada (IZQUIERDO, 1989). A *consolidação* é o processo de armazenamento de uma memória, onde diferentes estímulos podem consolidar de maneira melhor ou pior uma memória, bem como também pode ser modulada. Pode ocorrer através de processos fisiológicos como aumento da extensão axonal dos neurônios e processos bioquímicos como síntese proteica a partir de reguladores como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). A *evocação* é identificada como o momento em que a memória é requerida para uso, sendo que pode ser espontânea ou voluntária (IZQUIERDO e colab., 2014; LEE e colab., 2017).

A memória pode ser classificada quanto a sua duração, em memória de trabalho (curtíssima duração), de curta e de longa duração. A memória de curta duração, dura de minutos a horas e envolve processos bioquímicos, como ativação de proteínas, para sua formação. A memória de longa duração pode durar dias, meses ou anos e está ligada a formação de novos neurônios, síntese proteica e expressão gênica (CONWAY, 2007).

As memórias também podem ser chamadas, quanto ao seu conteúdo, de declarativas (ou explícitas) ou não-declarativas (ou implícitas). Memórias declarativas são memórias acessíveis ao consciente, as quais podemos evocar enquanto estão presentes. As não-declarativas não dependem de nenhum tipo de conteúdo consciente da memória. Estas servem para ajudar no processamento passivo de algumas memórias, como andar de bicicleta, dirigir carro entre outras. Já as declarativas exigem comportamento ativo para recordar as mesmas. Lembrar nomes, locais e eventos se encaixam neste tipo de memória (IZQUIERDO e colab., 2014).

Na memória declarativa, existe um processo chamado de *extinção*. Este acontece quando uma resposta condicionada tende a diminuir gradativamente, devido ao contato regular com o estímulo condicionado na ausência do estímulo aversivo, a resposta condicionada é o comportamento exibido na lembrança da situação aversiva, pode ser luta ou fuga, como congelamento. Este processo então modula o comportamento da futura expressão da nova memória criada. Tal extinção é uma adaptação e possui fator importante quando se diz em

qualidade de vida e capacidade de modular o armazenamento das memórias (LEE e colab., 2017).

As memórias implícitas também se distinguem em associativas e não associativas. As associativas são geradas em um contexto de associação de estímulos e respostas. Podem servir para antecipar um evento a partir de um estímulo, como no medo condicionado ao contexto. A memória não-associativa por sua vez é independente de um aprendizado (ZAMEER e colab., 2019).

A memória também pode ser classificada através da natureza do estímulo em que é obtida. Por exemplo, o teste de reconhecimento de objeto é considerada uma tarefa não-aversiva, enquanto testes como o medo condicionado ao contexto caracterizam-se por gerar memória frente a um estímulo aversivo (ZAMEER e colab., 2019). Testes laboratoriais com animais tiveram seus primeiros experimentos para natureza aversiva com o modelo clássico de medo condicionado de Pavlov, onde um estímulo neutro (como o ambiente) é ligado a algum estímulo aversivo, assim podendo observar o comportamento defensivo de animais, tendo base para o futuro da pesquisa neurocomportamental desta área (FANSELOW e LEDOUX, 1999).

Para que a memória se forme, diferentes estruturas cerebrais são recrutadas. Destaca-se o envolvimento do hipocampo, do córtex e da amígdala no processamento de memórias (WINOCUR e MOSCOVITCH, 1990).

O hipocampo, após receber uma memória em particular, capacita o ser humano a recuperar a mesma e poder distinguir o que ocorreu e o que está prestes a ocorrer (SQUIRE, 2008). Frente a isto, esta região também foi avaliada por EICHENBAUM e colab., (2007) exibindo a relação entre as regiões do lobo temporal medial, onde se encontra o hipocampo, fluindo a informação para regiões do córtex.

Estímulos aversivos podem reforçar a aquisição e consolidação de memórias. O medo é uma emoção muito clara, reacional e que tende a gerar respostas comportamentais. LEDOUX (1993) descreveu o papel da amígdala como um dos pontos centrais de estudo do medo. O envolvimento da amígdala com o medo vem sendo explorado em métodos como o medo condicionado, no qual são usados estímulos aversivos como o choque nas patas de animais. LEDOUX,

(1998) sugeriu que, a partir do contato com o estímulo aversivo, a informação chega ao tálamo, passa para o córtex, levando a informação para a amígdala. A amígdala basolateral está envolvida na modulação da consolidação da memória de longa duração, principalmente em experiências emocionais aversivas (MCGAUGH, 2004; ROOZENDAAL e colab., 2008). A ACh tem um papel modulador sobre o processamento de memória na amígdala (AITTA-AHO e colab., 2018).

Diversos dados da literatura mostram que a exposição a OF pode causar danos para a memória e para o comportamento. Indivíduos expostos em situação de guerra, como na Guerra do Golfo em 1991 com o uso de OF nos soldados (HALEY e TUIE, 2013), ou trabalhadores rurais que tenham contato crônico com OF (WESSELING e colab., 2002), podem apresentar alterações cognitivas e emocionais. BOUCHARD e colab., (2011) mostraram haver associações entre a exposição a OF na gravidez e problemas cognitivos nos filhos em idade escolar. Embora a relação entre exposição crônica a OF e alterações cognitivas e psiquiátricas esteja mais bem estabelecida, a exposição aguda a OF também pode induzir alterações desse tipo. Por exemplo, já foram relatadas alterações como déficit de atenção e memória, depressão, confusão ou retraimento social em indivíduos que sofreram intoxicação aguda por OF (SAVAGE e colab., 1988). Além disso, indivíduos expostos ao sarin, um OF usado como arma química em um ataque terrorista no metrô de Tóquio, apresentaram déficit de memória e sintomas relacionados ao estresse pós-traumático quando avaliados posteriormente (MIYAKI e colab., 2005).

Também existem estudos em animais que apontam para uma relação entre exposição a OF, aguda ou crônica, e alterações cognitivas e comportamentais. Em relação a testes que avaliam memória não-aversiva, a aplicação repetida de diazinon (OF) por 4 dias consecutivos em camundongos durante o período neonatal induziu prejuízo na memória desses animais já na idade adulta, quando foram submetidos ao teste de reconhecimento de objeto (WIN-SHWE e colab., 2013). Já a exposição repetida ao clorpirifós (OF) em ratas durante a gestação prejudicou a memória de trabalho (armazenamento temporário de informação) da prole, especialmente das fêmeas, quando avaliada no labirinto radial na vida adulta (LEVIN e colab., 2002). A exposição repetida (14 dias) de ratos adultos

ao diisopropilurofosfato (DFP) também causou prejuízo na memória espacial no teste de alternância espontânea no labirinto em T, assim como inibiu a AChE e provocou perda significativa de receptores muscarínicos no córtex, hipocampo e estriado desses animais (MCDONALD e colab., 1988).

Com relação a testes que avaliam memória aversiva, LISCIA e colab., (2008) mostraram que a administração aguda, por via subcutânea, de soman (OF) induziu comportamento ansioso em ratos. A injeção de DFP em ratos na dose 9 mg/kg provocou atraso na capacidade de aprendizado e memória no teste do medo condicionado ao contexto, mesmo quando o teste era realizado 36 dias após a intoxicação (FLANNERY e colab., 2016).

Vale ressaltar que os prejuízos na cognição e nas emoções podem não estar relacionados somente com a inibição direta da AChE, e sim serem resultado da neurotoxicidade provocada por OF (DEL PINO e colab., 2015). Por exemplo, parece haver uma relação entre alterações cognitivas e morte neuronal na região da amígdala após intoxicação por soman (COLLOMBET e colab., 2008).

CHEN, Yun (2012) apresentou uma hipótese para explicar o possível curso de intoxicação por OFs, onde a inibição da AChE, hiperestimulando receptores muscarínicos e de glutamato, levam a excitotoxicidade e disfunção colinérgicas. Neste ponto, temos o surgimento de crises colinérgicas agudas, com seus sinais e sintomas. Mas em seu decorrer, um dano celular contínuo leva à apoptose e perda neuronal; esses eventos podem levar a danos neuronais secundários, este que são de longa duração e afetam processos cognitivos, neuropsiquiátricos, entre outros (Fig. 7).

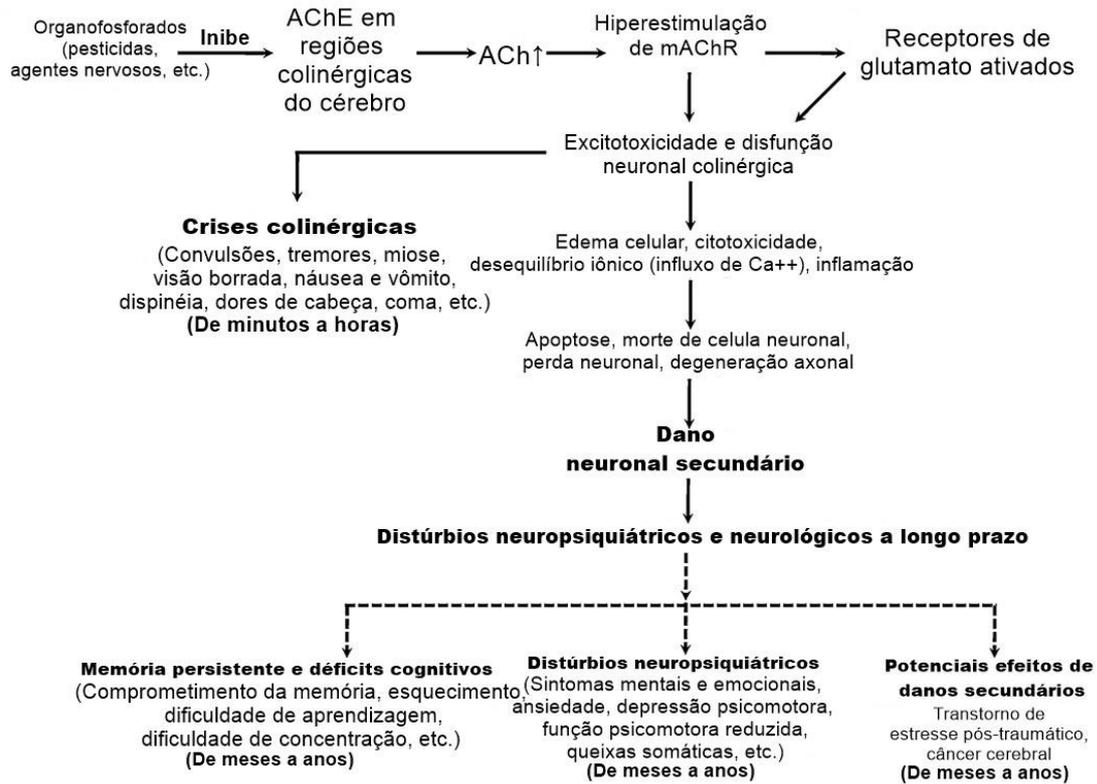


Figura 7. Curso de eventos dos danos provocados pela intoxicação por OF. **Fonte:** Modificado de CHEN, Yun (2012).

1.5 ESTRESSE E OF

A exposição a eventos de natureza aversiva pode trazer mais que apenas reações fisiológicas características do medo. Tais traumas podem desenvolver comportamentos que estão ligados ao estresse, seja este adquirido de maneira aguda, um único evento traumático marcante, ou crônico, um estresse em frequência repetida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O transtorno em eventos agudos podem apresentar sintomas que duram de 2 dias até um mês, sinais autonômicos como taquicardia, tremor, boca seca; bem como sintomas psiquiátricos como déficit de memória, angústia e ansiedade também se mostram presentes, sendo assim chamado de transtorno do estresse agudo (TEA) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2020; BRYANT, 2018).

A exposição a eventos traumáticos de alta intensidade, como extrema violência sexual e acidentes, pode desencadear o transtorno de estresse pós-traumático

(TEPT) (CAREAGA e colab., 2016). A Associação Americana de Psiquiatria na quinta edição do seu livro “*manual diagnóstico e estatístico de transtorno mentais (DSM-5)*”, atualizou o diagnóstico para tal desordem como estresse e trauma. Entre os itens para diagnóstico, inclui o indivíduo reexperimentar os sintomas aversivos do evento, com uma memória intrusiva, “flashbacks” do evento, evasão de pensamentos, pessoas e locais relacionados, bem como sintomas como irritabilidade, falta de concentração e hiperventilação, sendo que esses sinais devem durar mais de um mês (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

Estas desordens, sejam de caráter agudo ou crônico, estão ligadas a estruturas cerebrais que estão envolvidas com processamento de memória aversiva, assim como suas reações autonômicas. A amígdala possui íntima relação com memórias relacionadas ao medo; SHIN e colab., (2006) demonstrou que esta região se encontra em alta responsividade durante estados sintomáticos de TEPT, podendo afetar o aprendizado ou mesmo extinção do medo. O mesmo pode estar relacionado a respostas de medo agudas (KALIN e colab., 2001).

A memória de medo relaciona-se também com o contexto a qual foi apresentada, numa condição de TEA ou TEPT muitas vezes o contexto envolvido é o fator que desencadeia sinais do transtorno, assim estruturas como amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo são fundamentais para tal processamento correto.

O medo condicionado ao contexto pode ser utilizado para investigar alguns aspectos do TEA e TEPT. Conforme mencionado anteriormente, a intoxicação aguda por DFP em ratos provocou um déficit no teste de medo condicionado ao contexto associada à inflamação no hipocampo mesmo 21 dias após a intoxicação por OF (FLANNERY e colab., 2016). De forma semelhante, a intoxicação aguda por soman levou à morte neuronal no hipocampo e amígdala, associada a um aumento da resposta de medo condicionado ao contexto (COUBARD e colab., 2008). Entretanto, nenhum dos estudos investigou, especificamente, a influência da intoxicação aguda por OF na extinção da resposta de medo condicionado ao contexto.

1.6 TRIAZOFÓS

O triazofós (TZF) (O,O-diethyl-O-1-phenyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl phosphorothioate) é um inseticida OF que entrou no mercado por sua eficiência, substituindo OFs mais tóxicos, comumente usados em diversas plantações como de arroz e algodão (NAVEED e JANAI AH, 2011).

O composto é classificado pela ANVISA como um pesticida de Classe II em classificação toxicológica. A principal rota de biotransformação da molécula é a conversão a 1-fenil-3-hidroxi-1,2,4-triazol, seja por hidrólise ao TZF oxon, seja pela clivagem do agrotóxico em si (ROBERTS, HUTSON, 1999).

No Egito, este composto foi encontrado junto a outros presentes na água de seus rios nos anos 90, proibindo então que tal classe fosse utilizada, uma vez que a contaminação pode chegar a humanos e espécies aquáticas da região (RANI e colab., 2001). Em 2002 a União Europeia fez a retirada de compostos comerciais que continham TZF, devido a sua toxicidade e meia vida longa (COMMISSION, 2002). TZF e clorpirifós foram juntamente banidos de comercialização no ano de 2013 na China afim de proteger a segurança agrícola, manter a qualidade dos produtos e salvar a saúde das pessoas (OF e 2032, 2013).

Testes com o produto comercial Hostathion (triazofós 40 EC) avaliaram a dissipação do mesmo em água, este que também é formulado pela Bayer, liberado para comércio no Brasil. Nesses testes, ele se mostrou presente nas amostras de água em até 90 dias com a taxa de dissipação de 91,7% (RANI e colab., 2001). Mesmo assim o TZF ainda é utilizado em grande escala nas plantações, sendo migração ou contaminação na água uma preocupação.

A DL50 do TZF (62% de pureza) em ratos é de 72,44 mg/kg quando administrado por via oral (CHANDRA e colab., (2014). SINGH e RISHI (2005) administraram TZF por via oral em ratos jovens e adultos e determinaram tanto a dose máxima tolerada quanto observaram sinais de intoxicação como convulsões e ataxia, além de observar haver maior sensibilidade em ratos jovens.

O TZF, após intoxicação crônica em ratos, administrado oralmente, parece causar disfunção cognitiva e perda de memória em roedores devido ao aumento no estresse oxidativo gerado pela intoxicação (JAIN e colab., 2013).

Entretanto, nenhum estudo avaliou, até o momento, o efeito da intoxicação aguda por TZF sobre processamento de memória aversiva, potencialmente relacionado ao TEA e ao TEPT, e, especialmente o sobre a extinção da resposta de medo.

2. HIPÓTESE

Considerando que o TZF pode induzir neurotoxicidade em áreas como o hipocampo, córtex e amígdala, a partir da inibição da AChE cerebral, é possível que a intoxicação aguda por doses sub-letais desse OF prejudique o processamento de respostas aversivas no medo condicionado ao contexto em ratos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar as possíveis alterações cognitivo/comportamentais e bioquímicas induzidas pela intoxicação aguda ao organofosforado TZF em ratos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar se a intoxicação aguda com doses sub-letais de TZF:
 - afeta a aquisição/expressão da memória de medo no medo condicionado ao contexto em ratos.
 - afeta a consolidação da extinção de memória aversiva no medo condicionado ao contexto em ratos.
 - reduz a atividade da AChE no hipocampo e na amígdala de ratos.
- Confirmar a efetividade da intoxicação aguda por TZF pelo monitoramento dos sinais de toxicidade aguda e pela redução da atividade da butirilcolinesterase plasmática.
- Avaliar se o potencial prejuízo à memória, induzido pelo TZF, também é detectado no teste de reconhecimento ao objeto, uma tarefa que envolve processamento de memória não aversiva.

MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos provenientes do Biotério Central da UFES, com idade entre 8 e 12 semanas, os quais foram mantidos em grupos de até 4 animais por caixa, na temperatura de 24 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12/12 horas com livre acesso de água e alimento. Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal. O projeto foi aprovado na Comissão de Ética para o uso de Animais (CEUA) sob número 29/2017. Para garantir a distribuição aleatória dos animais entre os grupos experimentais, foi realizado uma randomização com o uso da função “random” do programa Microsoft Excel 2016.

4.2 DROGA

A droga utilizada foi o triazofós (TZF, Hosthation 400 BR[®], 40% m/v), um OF de uso comercial, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg (doses sub-letais baseadas na dose máxima tolerada descrita no estudo de SINGH e RISHI (2005).

A administração do TZF na forma de solução comercial foi escolhida para garantir o aspecto translacional, haja visto que os pacientes normalmente são expostos às formulações comerciais.

4.2.1 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TZF

Para evitar variações nas doses administradas nos animais por possível evaporação da droga, as soluções administradas no tratamento foram preparadas sempre no dia da intoxicação dos animais. Todo o preparo foi feito em uma capela de exaustão e trajando os equipamentos de proteção individual adequados, a fim de evitar qualquer intoxicação acidental por inalação de vapores. O TZF foi diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% (salina) e administrado por via intraperitoneal (i.p.) na proporção de 1ml/kg de peso de rato. O grupo controle de cada experimento recebeu injeção i.p. de solução salina (1ml/kg).

4.3 MODELOS COGNITIVO/COMPORTAMENTAIS

4.3.1 TESTE DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

O medo condicionado ao contexto foi realizado em uma caixa nas dimensões de 25 cm altura x 22 cm largura x 22 cm de comprimento (Figura 8) e com assoalho composto por 18 hastes de aço inoxidável (2 mm de diâmetro e espaçamento de 1,5 cm) conectado a um gerador de choque (modelo MOP-101; MasterOne, Brasil). O procedimento foi dividido em 3 sessões, separadas por intervalos de 24 h: habituação/condicionamento, extinção e teste. No primeiro dia (sessão de condicionamento), os animais foram habituados à caixa durante 2 minutos e, imediatamente após, foram submetidos a sessão de condicionamento ao contexto constituída por emissão de 3 choques elétricos nas patas de 0,50 mA/2 s com intervalos randomizados de 30 s a 1 min. Essa sessão teve duração de 6 minutos, sendo que nos dois primeiros ocorreu a habituação e nos 4 minutos finais foram entregues os choques (adaptado de DOMINGOS e colab., 2018). Foi registrado o comportamento de congelamento, minuto a minuto, definido como a ausência completa de movimento na qual o animal assume uma postura característica de tensão. Vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, foi realizada a sessão de extinção, na qual os animais foram reexpostos ao contexto por 21 minutos. O tempo prolongado desta sessão se mostrou o suficiente para que o animal aprendesse e ocorresse extinção da resposta de congelamento (ULIANA e colab., 2018). Nessa sessão, os animais não receberam nenhum choque e o tempo de congelamento foi registrado em blocos de 3 minutos. Vinte e quatro horas depois, foi realizada a sessão teste (confirmação do aprendizado da extinção), na qual os animais foram reexpostos à caixa durante 5 min, sem a emissão de choque e o tempo de congelamento foi novamente registrado. Os ratos foram testados individualmente. A câmara foi limpa com etanol a 10% antes e depois de cada animal. Todas as sessões foram filmadas utilizando um smartphone (Xiaomi – Redmi 5 plus) fixado a um tripé. A análise dos vídeos foi realizada de forma cega pelo experimentador, pela codificação dos vídeos, para reduzir o viés do avaliador nos resultados. O tempo de congelamento foi representado em porcentagem do tempo total ou bloco de cada sessão.



Figura 8. Caixa de condicionamento para o teste de medo condicionado ao contexto.

4.3.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

O teste de reconhecimento de objetos foi realizado em 3 dias consecutivos, em 3 sessões com duração de 10 minutos, gravadas para posterior avaliação, seguindo o protocolo apresentado por VEDOVELLI e colab. (2011) com algumas alterações. A 1ª sessão consistiu na habituação ao aparato, realizada em duas sessões, com intervalo de 2 h entre cada exposição. Nessa etapa, o animal foi exposto à caixa do reconhecimento de objeto (sem a presença dos objetos) nas dimensões de 80cm altura x 47cm largura x 67cm comprimento (Figura 9), com fundo preto de borracha e paredes brancas. Vinte e quatro horas depois, iniciou-se a 2ª sessão, denominada treino, que consistiu na reexposição do animal à caixa, mas agora contendo dois objetos idênticos, duas garrafas d'água de 25cm (A,A, ambas de cor transparente), posicionadas em paralelo e distantes 10 cm da parede da caixa. Vinte e quatro horas depois, realizou-se a 3ª sessão, denominada teste, para avaliação da memória de longa duração (MLD). O animal foi colocado novamente na caixa com 2 objetos, um familiar (objeto A, transparente) e um novo (objeto B, cor laranja). O objeto B também consistiu em uma garrafa d'água com forma, textura e cor diferentes do objeto A, mas de dimensões semelhantes. As sessões treino e teste foram gravadas pelo software ANY-MAZE (Stoelting Co.) para posterior avaliação do tempo de exploração dos objetos. A exploração dos objetos A e B foi considerada quando o animal se orientou em direção ao objeto com comportamentos como farejar, tocar ou roer. A análise dos vídeos foi realizada de forma cega pelo experimentador, pela codificação dos vídeos para reduzir o viés do avaliador nos resultados. O índice de discriminação foi calculado de acordo com a seguinte equação: (tempo de

exploração do objeto novo - tempo de exploração do objeto familiar) / tempo total de exploração dos objetos.

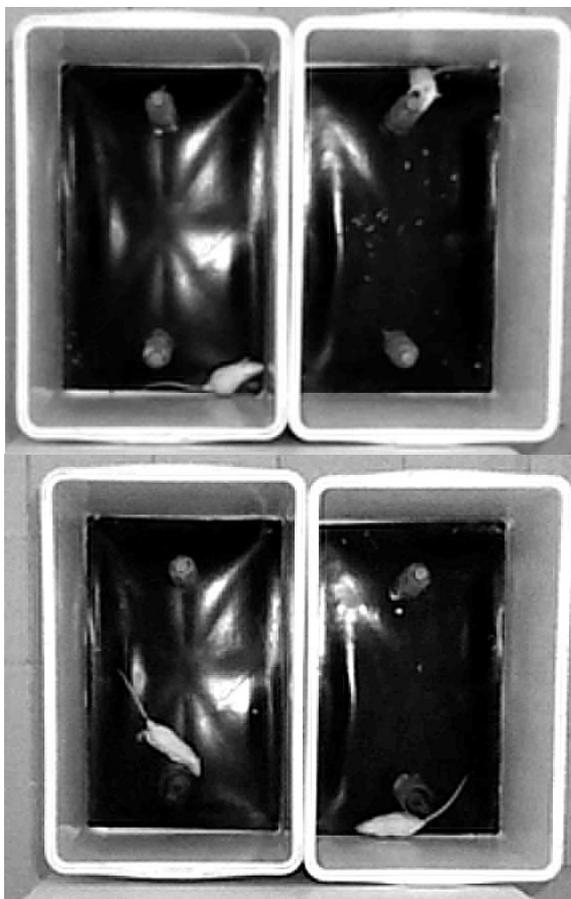


Figura 9. Figura A demonstrando sessão treino e figura B sessão teste, no teste de reconhecimento de objetos.

4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTO

4.4.1. Efeito da exposição aguda a doses sub-letais de TZF sobre a memória aversiva no medo condicionado ao contexto.

O efeito da exposição aguda a doses sub-letais de TZF no teste do medo condicionado ao contexto foi avaliado em dois momentos de administração: no experimento 1, o TZF foi administrado logo após a sessão de condicionamento para avaliar a consolidação da memória aversiva; no experimento 2, o TZF foi administrado imediatamente após a sessão de extinção para avaliar a consolidação/expressão da extinção da memória. O intervalo entre a

administração do TZF e a avaliação do comportamento de congelamento foi de 24 h, nos 2 protocolos, para evitar que um possível prejuízo motor, decorrente da intoxicação aguda, afetasse a expressão do comportamento.

No experimento 1, foi realizada a sessão de condicionamento e, imediatamente após, os animais foram intoxicados por via i.p. com doses de 7,5 (n=12), 15 (n=11) ou 30 (n=12) mg/kg de TZF ou salina (n=12) (grupo controle). Os animais foram monitorados quanto aos sinais de intoxicação aguda durante as primeiras 4 h após a administração do OF, em caixas individuais, conforme detalhado no apêndice 1. Vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, todos animais foram submetidos à sessão de extinção (exposição ao contexto durante 21 min) e, após novo intervalo de vinte e quatro horas, seguiu-se a sessão teste. Ao final, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras de plasma e de hipocampo e de amígdala. As amostras de plasma foram empregadas para quantificação da atividade da BChE (atividade 48 h após TZF). Nas amostras de hipocampo e amígdala foi determinada a atividade da AChE (Fig. 10).

O segundo protocolo foi executado da mesma forma, com exceção da intoxicação com TZF, que ocorreu imediatamente após a sessão de extinção (Fig. 11). Os grupos experimentais foram salina (n=11) ou TZF nas doses de 7,5 (n=12), 15 (n=12) ou 30 mg/kg (n=12) (Fig.11).

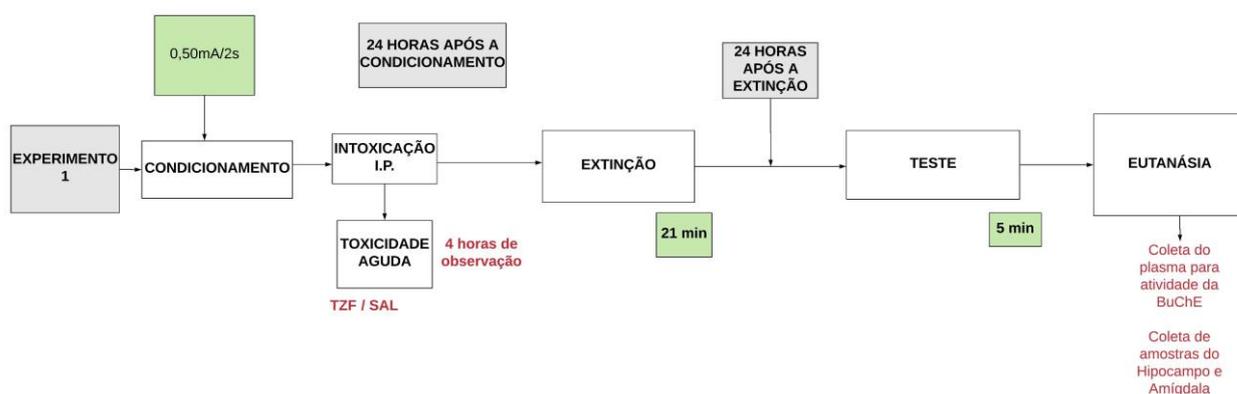


Figura 10. Fluxograma do protocolo do teste do medo condicionado ao contexto com aplicação do TZF após a sessão de condicionamento. TZF, triazofós; SAL, salina.

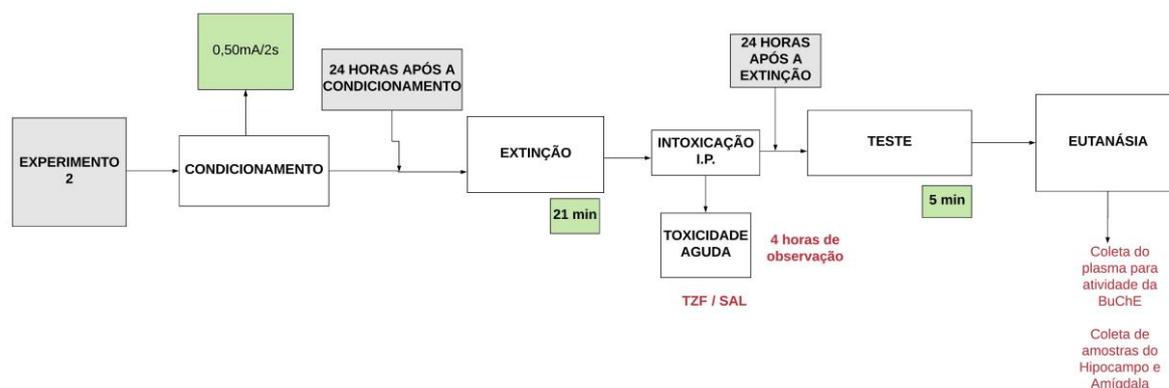


Figura 11. Fluxograma do protocolo do teste do medo condicionado ao contexto com aplicação do TZF após a sessão de extinção. TZF, triazofós; SAL, salina.

4.4.2. Efeito da exposição aguda a doses sub-letais de TZF sobre a memória não aversiva de longa duração no teste de reconhecimento de objeto.

No primeiro protocolo do teste de reconhecimento de objeto, foi realizada a aplicação de TZF por via i.p. nas doses de 7,5 (n=11), 15 (n=10) ou 30 mg/kg (n=11) ou salina (11) (grupo controle) logo após a sessão de habituação para avaliar a **aquisição** da memória não aversiva de longa duração (Fig. 12).

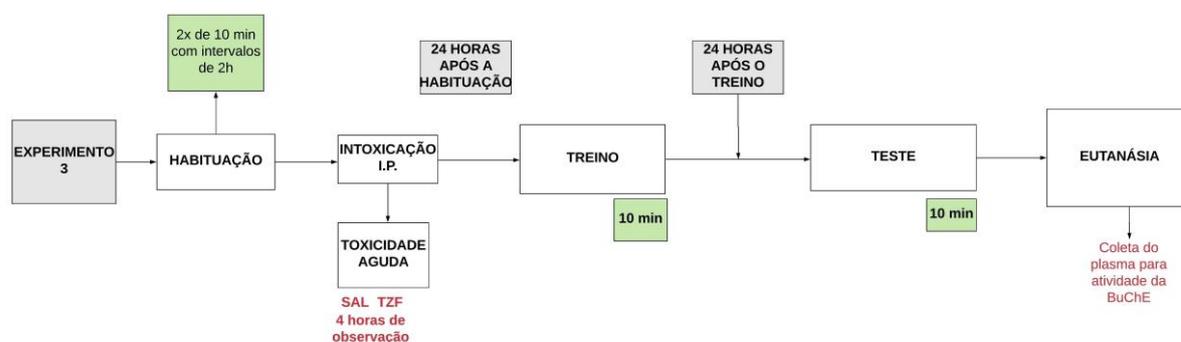


Figura 12. Fluxograma do protocolo do teste de reconhecimento de objeto com aplicação pós habituação para avaliar **aquisição** da memória de longa duração. TZF, triazofós; SAL, salina.

No segundo protocolo, a aplicação de TZF nas doses de 7,5 (n=11), 15 (10) ou 30 mg/kg (n=10) ou salina (n=11) (grupo controle) ocorreu após a sessão treino para avaliar a **consolidação** da memória não aversiva de longa duração no teste de reconhecimento de objeto (Fig. 13). Embora o teste de reconhecimento de objeto permita a avaliação da memória de curta duração, nós optamos por não

executar essa avaliação, uma vez que, nas doses escolhidas, o TZF provoca sinais de toxicidade aguda que prejudicariam o desempenho do animal nas primeiras 4 h.

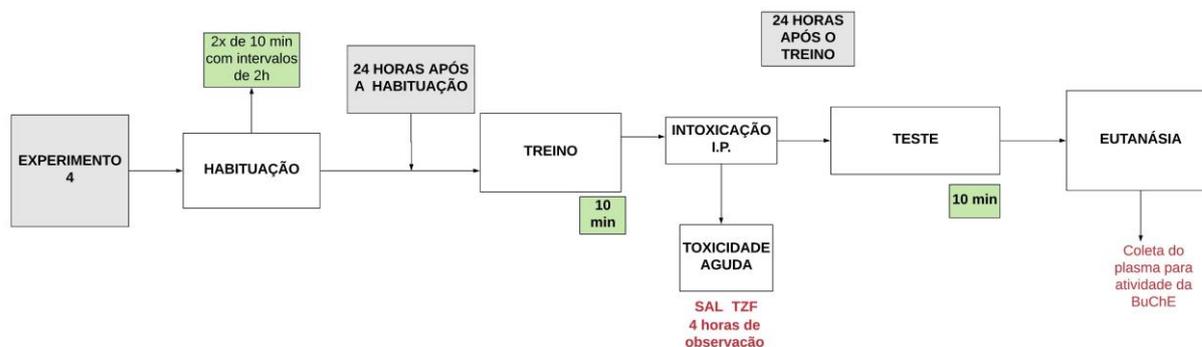


Figura 13. Fluxograma do protocolo do teste de reconhecimento de objeto com aplicação pós treino para avaliar **consolidação** da memória de longa duração. TZF, triazofós; SAL, salina.

4.5 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Os grupos submetidos à coleta de amostra foram eutanasiados por decapitação usando uma guilhotina (EB-271® Insight - Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP) sem anestesia e tiveram os encéfalos retirados, rapidamente dissecados em gelo e para coleta de amostras de hipocampo (dorsal e ventral) e de amígdala. Também foi coletado o sangue proveniente do tronco em microtubos heparinizados. O sangue coletado foi centrifugado (Universal 320R – Hettich; Tuttlingen, Alemanha) a 10.000 rpm por 10 minutos a -4° C. As amostras de hipocampo e de amígdala, bem como o plasma obtido após o processo de centrifugação foram armazenados a -80° C até o momento da execução das análises.

Ao final dos experimentos, os ratos não utilizados para coleta de amostras foram eutanasiados empregando-se superdosagem de tiopental sódico (120 mg/kg), por via i.p. Após confirmação da parada cardiorrespiratória, cianose e perda do reflexo podal, os mesmos foram acondicionados em sacos brancos leitosos com identificação de resíduo de saúde e armazenados em freezer -20° C até recolhimento pela empresa contratada pela UFES.

4.6 PREPARO DE AMOSTRAS E DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS COLINESTERASES

4.6.1 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE

A dosagem da atividade da AChE foi realizada no hipocampo e amígdala, conforme a método de ELLMAN *et al.* (1961) com adaptações propostas por PIRES *et al.*, (2001) e LASSITER *et al.*, (2003). Este método tem sido usado para estudar a atividade da AChE nas hemácias e em homogenatos de cérebro, rins, pulmões e músculos de ratos (ELLMAN *et al.*, 1961).

A atividade da enzima foi medida através de um método colorimétrico cinético, em que quanto maior a intensidade da coloração amarela produzida a partir da reação da tiocolina com o íon ditiobisnitrobenzoato (DTNB), maior é a atividade enzimática. O resultado obtido com acetiltiocolina (AChTh) como substrato é similar ao obtido com a ACh.

Para o preparo das amostras de hipocampo e amígdala, foi calculado o peso do eppendorf com a estrutura e sem a estrutura, sendo homogeneizada em tampão fosfato (pH= 8,0; 0,1M) e 1% de Triton (Triton X-100) (v/v) na proporção de 20 mg de tecido para cada 1 mL de tampão. Os tecidos foram homogeneizados (Potter-Elvehjem) e transferidos para tubo falcon, mantido em gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 4 °C, 8.400 RPM, 7.800 G durante 5 minutos. O sobrenadante do homogenato foi transferido para microtubos e armazenado em freezer – 80 °C até a dosagem da atividade da AChE (no máximo por 1 semana).

O procedimento consistiu em pipetar 820 µL de tampão triton, 35 µL do íon DTNB e 135 µL de amostra em cubeta para espectrofotômetro. A mistura foi deixada por 10 minutos em incubação, em temperatura ambiente. Para a calibração do espectrofotômetro, foi feito um branco repetindo-se o processo sem a adição da amostra. Após a incubação, foi adicionado 10 µL do substrato iodeto de acetiltiocolina (AChTh) 75 nM/ml à cubeta e, em seguida, feita a leitura no espectrofotômetro a 412 nm por 2 minutos. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas e, para fins de cálculo, foi utilizada a média da inclinação da reta gerada por cada duplicata. Os cálculos usados para determinação da atividade: – 1000 x média da absorção x 60min / 13,6 x 135 x concentração da proteína.

4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

A quantificação da proteína total, pelo método de Bradford, foi realizada para expressar a atividade enzimática da AChE por mg de proteína. Foi utilizada a albumina (1, 3, 5, 7 e 10 μg) para construir uma curva de calibração em duplicata. Para tanto, foi pipetado em microtubos, 1190 μL de água destilada, 10 μL do padrão de albumina e 300 μL do reagente de Bradford. O branco da curva de calibração consistiu em água e reagente de Bradford. Todo o processo de preparo foi realizado com luzes desligadas para evitar a deterioração do Bradford, que é fotossensível. As amostras também foram preparadas em duplicata com a adição de 1190 μL de água destilada, 10 μL do homogenato diluído e 300 μL do reagente de Bradford. O homogenato das amostras de hipocampo foi diluído na proporção 1:4 e o homogenato das amostras da amígdala foi diluído na proporção 1:2. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Evolution® 300 com Sistema Termostatizado por Peltier – Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, EUA), em cubetas descartáveis no comprimento de onda de 595 nm.

4.6.1 ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA

A atividade da BChE plasmática foi medida de acordo com o método colorimétrico descrito por Ellman et al., 1961, com pequenas modificações usando o kit fabricado pela Bioclin (SCHMIDT e colab., 1992).

As amostras dos grupos salina e grupos TZF foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas por 10 min. Foi preparado um branco para calibração do aparelho espectrofotômetro, contendo 10 μL de água destilada e 500 μL do reagente Nº 1 do kit (pirofosfato com pH 7,6, hexacianoferrato de potássio III). No caso das amostras, foi utilizado o mesmo volume do reagente Nº 1 e 10 μL do plasma. Os microtubos foram levados ao banho-maria a 37°C por 10 minutos. No momento imediatamente anterior à leitura, foi adicionado 125 μL do reagente Nº 2 contendo o substrato de butiriltiocolina. A leitura foi realizada sobre o decréscimo da absorbância em 405 nm e incubada na temperatura de 37°C por 2 minutos, seguido das leituras de 1, 2 e 3 minutos. Os resultados foram expressos em unidades por litro (U/L), uma unidade catalítica como a capacidade da enzima BChE de hidrolisar 1 μmol de butirilcolina, por minuto, por litro de reagente.

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da colinesterase sobre a butirilticolina, a qual é hidrolisada em tiocolina e butirato. Em uma segunda etapa, a tiocolina reduz o hexacianoferrato (III), de cor amarela, em hexacianoferrato (II), que é incolor. Reação detalhada na figura 14. A inibição na atividade dessa enzima permite a avaliação da efetividade da intoxicação com o TZF.



Figura 14. Representação da determinação da atividade de BChE plasmática (SCHMIDT e colab., 1992).

4.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados, representados como média \pm erro padrão da média (EPM), foram analisados com o programa de estatística SPSS para Windows® (Versão 20.0). Os dados da sessão teste do medo condicionado ao contexto, do teste de reconhecimento de objeto, da atividade da BChE e da AChE foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida de teste *post hoc* de Dunnett quando apropriado. Os dados do medo condicionado ao contexto referentes à sessão de condicionamento e de extinção foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, sendo o tratamento o fator independente e os blocos de 3 minutos a medida repetida. No caso de interação entre tratamento e tempo ou efeito do tratamento, foi realizado teste *post hoc* de Dunnett. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

No experimento 1, com aplicação de TZF pós condicionamento (48h antes da sessão teste) (Fig. 15), a ANOVA de 2 vias com medidas repetidas mostrou que durante a sessão de condicionamento, todos os animais de todos os grupos foram condicionados [$F_{(5,43)}=260,068$; $p<0,001$], não mostrando diferença entre os grupos [$F_{(3,43)}=1,249$; $p=0,237$]. Na sessão de extinção, a ANOVA de duas vias mostrou que houve extinção da memória aversiva [$F_{(6,43)}=38,528$; $p<0,001$], que o tratamento com o TZF prejudicou a extinção dessa memória [$F_{(3,43)}=3,120$; $p=0,014$], mas não houve interação entre os blocos de tempo e o tratamento [$F_{(18,258)}=0,635$; $p=0,832$]. O teste post-hoc de Dunnett evidenciou que a dose de 15 mg/kg de TZF prejudicou a extinção da memória aversiva se comparado ao grupo controle ($p=0,036$). A análise da sessão teste (confirmação da extinção) mostrou que o tratamento com TZF prejudicou a expressão da extinção [$F_{(3,43)}=3,335$; $p=0,028$]. Novamente, apenas a dose de 15 mg/kg de TZF aumentou o tempo de congelamento quando comparado com o grupo controle ($p=0,013$).

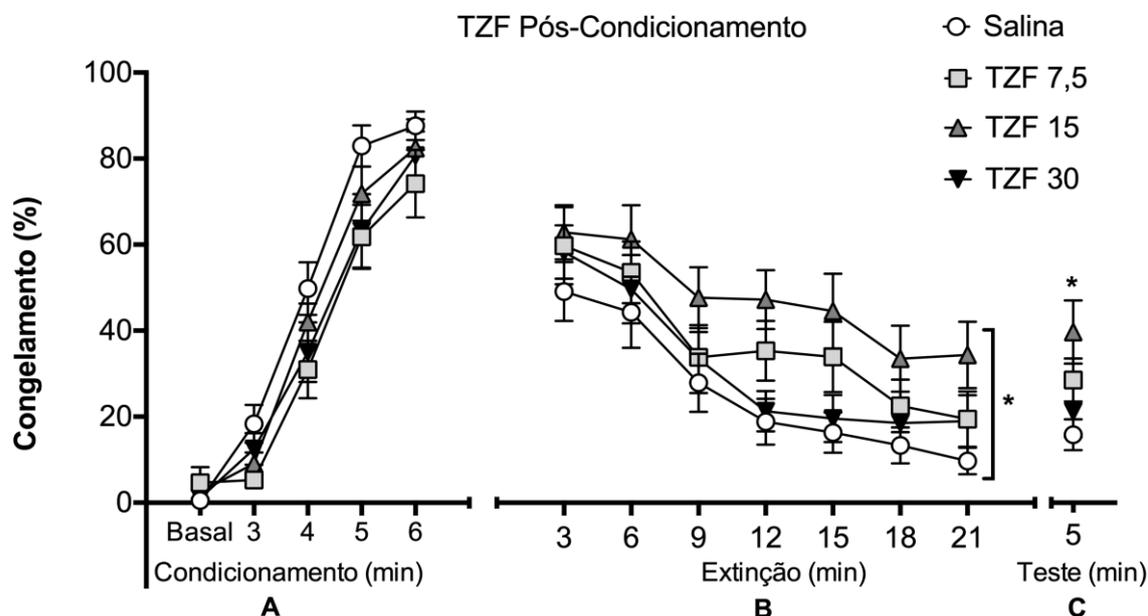


Figura 15. Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes do teste), nas doses de 7,5 (n=12), 15 (n=11) e 30 mg/kg (n=12) em comparação ao grupo controle (salina, n=12) no teste do medo condicionado ao contexto. **A** representa a % de tempo de congelamento durante a sessão de condicionamento, com habituação à caixa por 2 minutos (basal). **B** representa a % de tempo de congelamento durante

a reexposição ao contexto por 21 min (extinção em blocos de 3 minutos). **C** representa a % de tempo de congelamento durante a sessão teste (reexposição por 5 min). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (ANOVA de 2 vias seguida de teste post-hoc de Dunnett).

A figura 16 representa a análise dos 6 seis minutos iniciais da sessão de extinção. A ANOVA de 1 via mostrou que não houve diferença entre os grupos na expressão da memória aversiva [$F_{(3,43)}=0,843$; $p=0,478$].

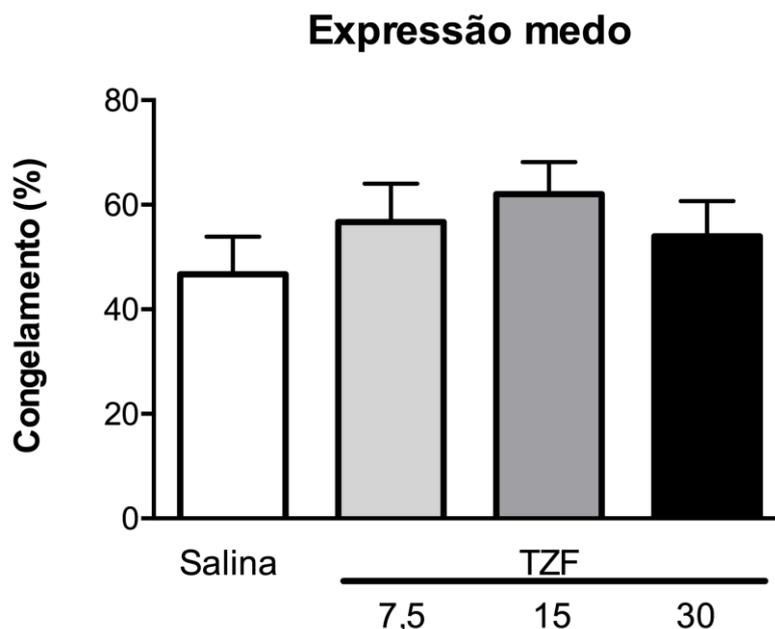


Figura 16. Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de condicionamento (48h antes do teste) nas doses de (n=12), 15 (n=11) e 30 mg/kg (n=12) comparado ao grupo controle (salina, n=12) sobre a % de tempo de congelamento nos 6 primeiros minutos da sessão extinção no teste do medo condicionado ao contexto.

No experimento 2, com aplicação de TZF imediatamente após a sessão de extinção (24h antes da sessão teste) (Fig. 17), a ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, mostrou que durante a sessão de condicionamento, todos os animais de todos os grupos foram condicionados [$F_{(5,42)}=376,326$; $p < 0,001$], não mostrando diferença entre os grupos [$F_{(3,42)}=0,2809$; $p=0,839$]. A ANOVA de 2 vias da sessão de extinção demonstrou extinção da memória aversiva [$F_{(6,42)}=43,374$; $p < 0,001$], mas, conforme esperado, não houve diferença entre os grupos [$F_{(3,42)}=0,522$; $p=0,670$], assim como não houve interação entre os blocos de tempo e os grupos [$F_{(18,252)}=0,667$; $p=0,577$]. A análise da sessão teste

(confirmação da extinção) mostrou que o tratamento com TZF não prejudicou a expressão da extinção [$F_{(3,42)}=0,213$; $p=0,887$].

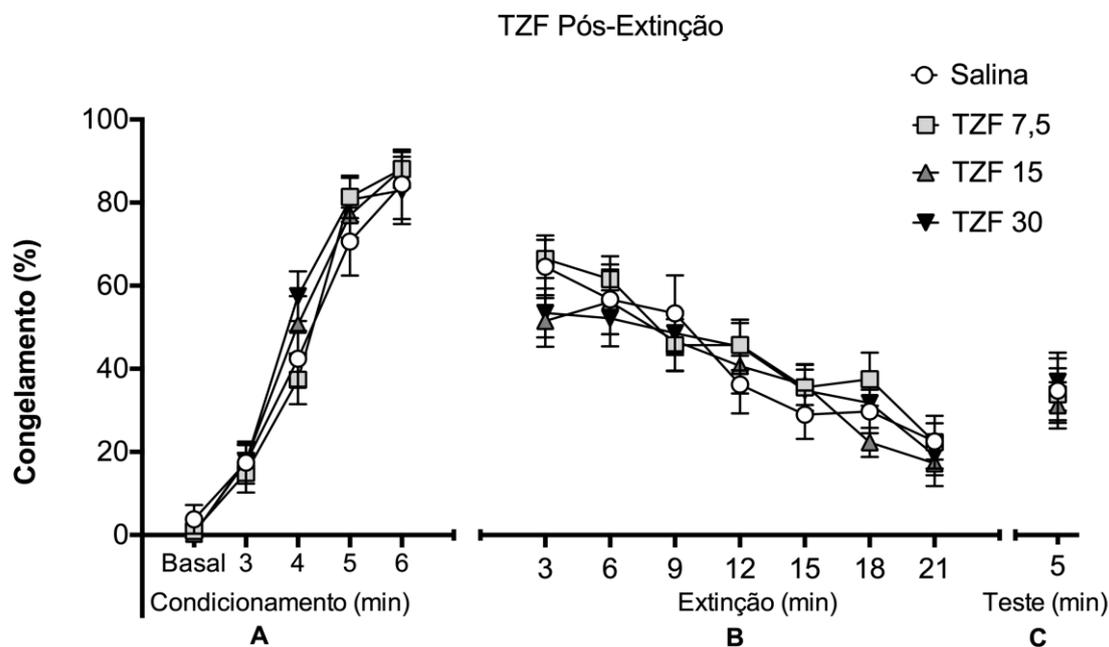


Figura 17. Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de extinção (24h antes do teste) nas doses de 7,5 (n=12), 15 (n=12) e 30 mg/kg (n=12) comparado ao grupo controle (salina, n=10) no teste do medo condicionado ao contexto. **A** representa a % de tempo de congelamento durante a sessão de condicionamento, com habituação à caixa por 2 minutos (basal). **B** representa a % de tempo de congelamento durante a reexposição ao contexto por 21 min (extinção em blocos de 3 minutos). **C** representa a % de tempo de congelamento durante a sessão teste (reexposição por 5 min). (ANOVA de 2 vias).

A figura 18 representa a análise da expressão do medo condicionado durante os 6 seis minutos iniciais da sessão de extinção. A ANOVA de 1 via mostrou que não houve diferença entre os grupos na expressão da memória aversiva [$F_{(3,42)}=1,413$; $p=0,252$].

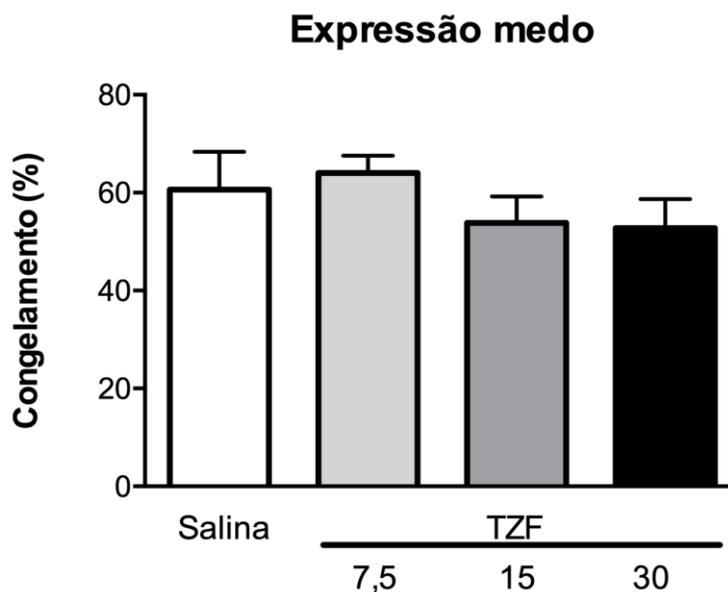


Figura 18. Efeito da intoxicação aguda por TZF administrado imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes do teste) nas doses de 7,5 (n=12), 15 (n=12) e 30 mg/kg (n=12) comparado ao do grupo controle (salina) sobre % de tempo de congelamento nos 6 primeiros minutos da sessão extinção no teste do medo condicionado ao contexto.

5.2 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL

Foi observada queda da atividade da AChE [$F_{(3,34)} = 3,920$; $p = 0,017$] no hipocampo de ratos tratados com TZF imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) (figura 19). A análise post hoc mostrou que as doses de 15 ($p = 0,012$) e 30 mg/kg ($p = 0,026$) de TZF reduziram a atividade quando comparado com o grupo controle.

Quando o TZF foi administrado imediatamente após a sessão de extinção também houve redução da atividade da AChE hipocampal [$F_{(3,28)} = 4,417$; $p = 0,012$] (figura 19). As doses de 15 ($p = 0,01$) e 30 mg/kg de TZF ($p = 0,017$) reduziram de forma significativa a atividade da AChE comparado com o grupo controle.

Hipocampo

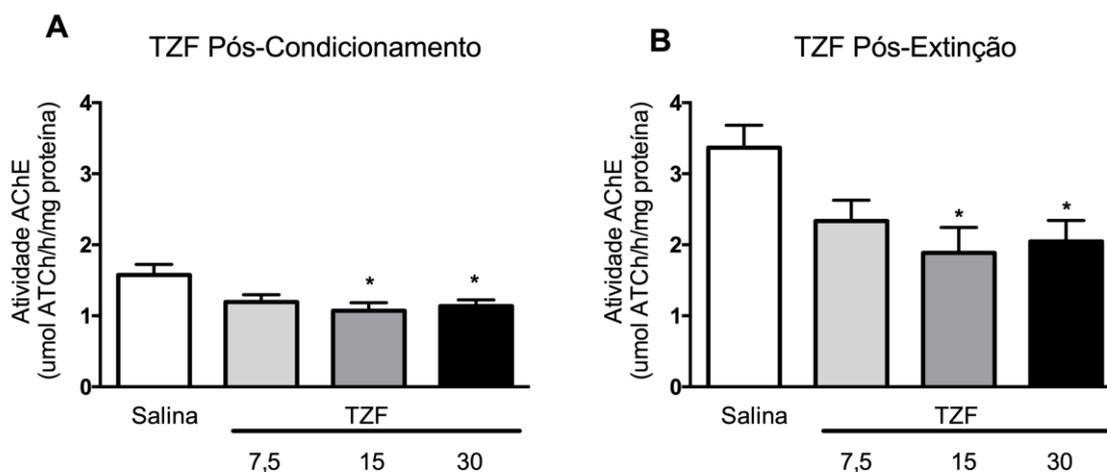


Figura 19. Atividade da AChE (expressa em umol ATCh/h/mg de proteína) no hipocampo de ratos tratados **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5 (n=9), 15 (n=9) e 30 mg/kg (n=10) ou com salina (n=10) e; **(B)** imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5 (n=8), 15 (n=8) e 30 mg/kg (n=8) ou de salina (n=8) e submetidos ao medo condicionado ao contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (ANOVA de 1 via seguida de teste post-hoc de Dunnett).

Já na amígdala, a maior dose de TZF (30 mg/kg) diminuiu a atividade da AChE 24 h [$F_{(3,27)} = 4,462$; $p = 0,011$; Dunnett $p = 0,04$] após a eutanásia (intoxicação após a sessão de extinção). Entretanto, a atividade da AChE na amígdala estava recuperada 48 h após a intoxicação, ou seja, nos animais que receberam TZF imediatamente após a sessão de condicionamento [$F_{(3,26)} = 1,055$; $p = 0,385$] (figura 20).

Amígdala

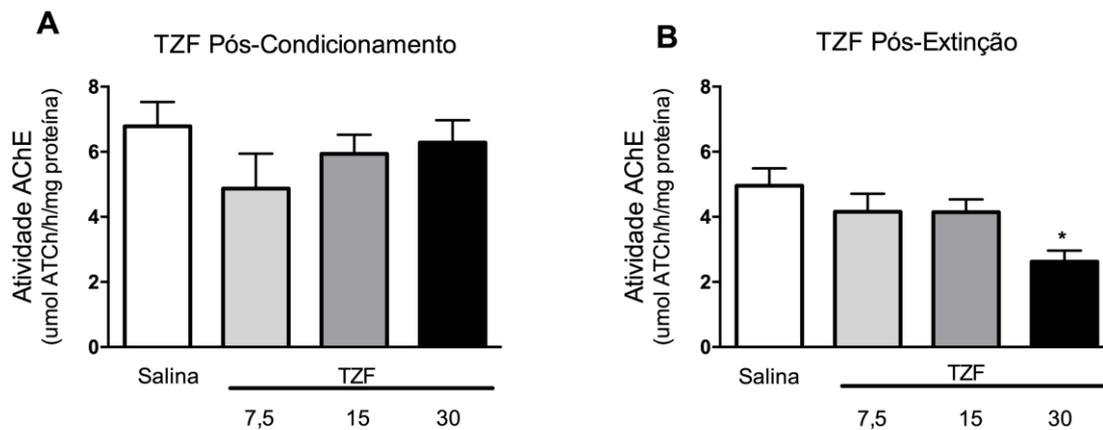


Figura 20. Atividade da AChE (expressa em umol ATCh/h/mg de proteína) na amígdala de ratos tratados **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5 (n=7), 15 (n=8) e 30 mg/kg (n=7) ou com salina (n=8) e; **(B)** imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes da eutanásia) com TZF nas doses de 7,5 (n=8), 15 (n=8) e 30 mg/kg (n=8) ou de salina (n=7) e submetidos ao medo condicionado ao contexto. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (ANOVA de 1 via seguida de teste post-hoc de Dunnett).

5.3 BUTIRILCOLINESTERASE PLASMÁTICA

Nos animais intoxicados com TZF após o condicionamento (48 h antes da eutanásia), a atividade da BChE plasmática foi reduzida [$F_{(3,28)} = 4,211$; $p = 0,014$]. Todas as doses de TZF testadas inibiram a BChE ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle, como mostrado na figura 21A.

A intoxicação por TZF após a sessão extinção (24h) também diminuiu a atividade da enzima BChE plasmática [$F_{(3,28)} = 12,338$; $p < 0,001$]. Novamente, todas as doses de TZF inibiram a BChE quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 21B)

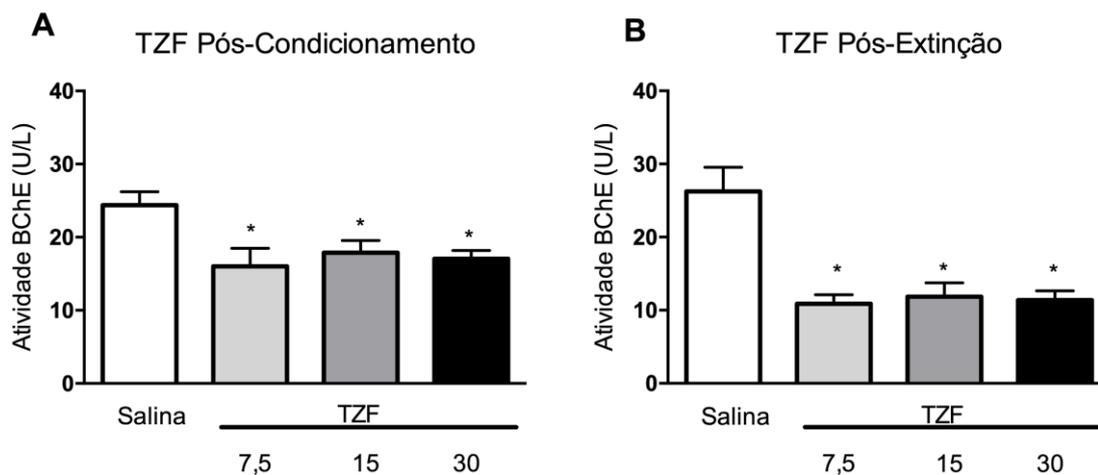


Figura 21. Atividade da BChE plasmática (U/L) em ratos tratados com TZF **(A)** imediatamente após a sessão de condicionamento (48 h antes da eutanásia) nas doses de 7,5 (n=8), 15 (n=8) e 30 mg/kg (n=8) ou com salina (n=8) e; **(B)** imediatamente após a sessão de extinção (24 h antes da eutanásia) nas doses de 7,5 (n=9), 15 (n=7) e 30 mg/kg (n=8) ou de salina (n=8). * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina (ANOVA de 1 via seguida de teste post-hoc de Dunnett).

5.3 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Conforme ilustrado na figura 22 (A e B), a administração de doses sub-letais de TZF logo após a habituação (48h antes do teste) não alterou o índice de discriminação do objeto novo [$F_{(3,40)}=0,171$; $p= 0,915$] e o tempo total de exploração dos objetos [$F_{(3,40)}=1,456$; $p= 0,241$] no teste de reconhecimento de objeto.

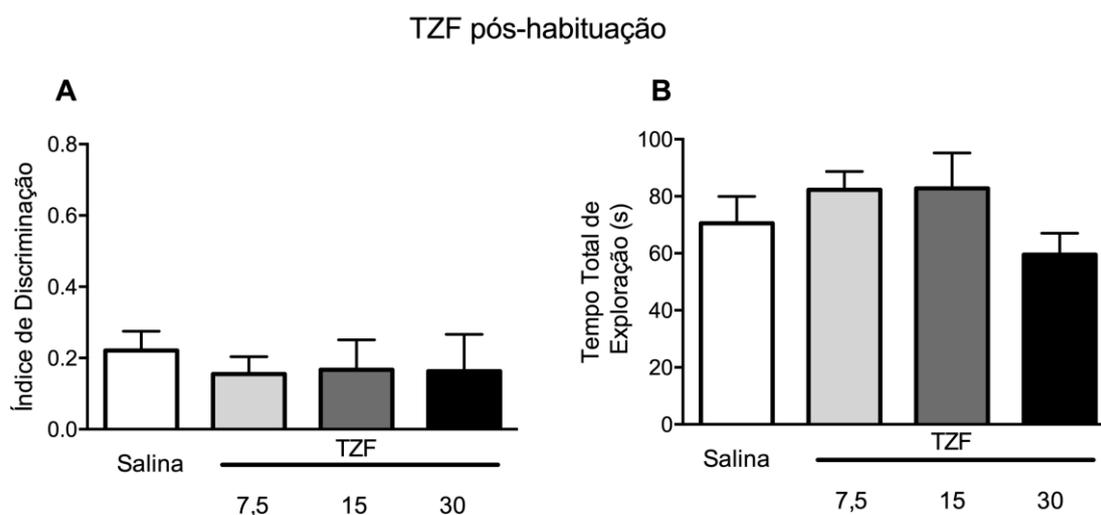


Figura 22. Efeito da intoxicação aguda por TZF, administrado imediatamente após a habituação, nas doses de 7,5 (n=11), 15 (n=10) e 30 mg/kg (n=11) e do grupo controle (salina, n=12) sobre

o índice de discriminação (A) e tempo total de exploração de objetos (B) no teste de reconhecimento de objeto.

A intoxicação por TZF, administrado após o treino (24 h antes do teste), também não interferiu na discriminação dos objetos [$F_{(3,38)}=1,221$; $p=0,315$] e no tempo de exploração total dos objetos TZF [$F_{(3,38)}=1,314$; $p=0,284$] no teste de reconhecimento de objetos (Fig. 23).

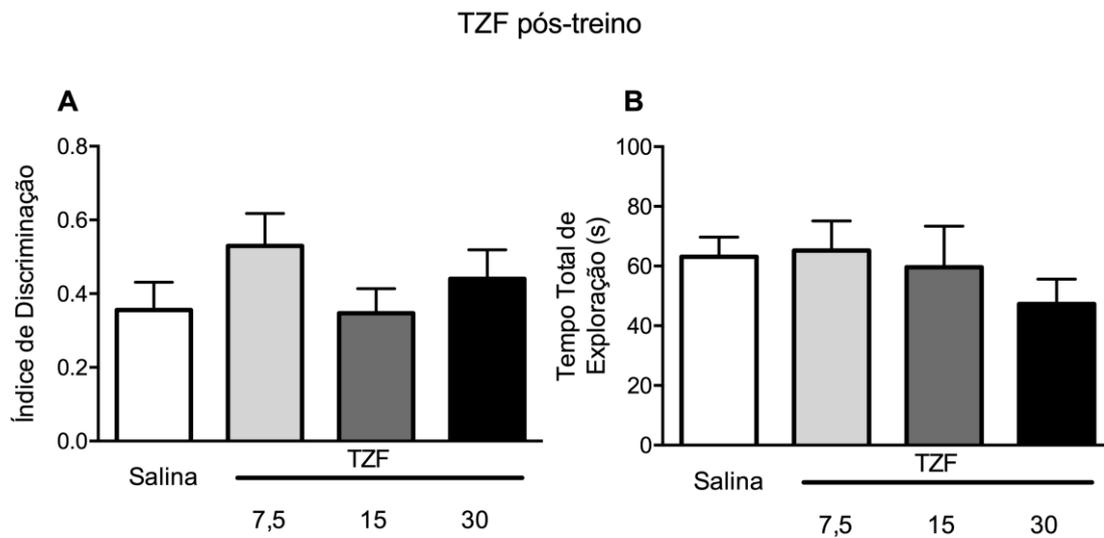


Figura 23. Efeito da intoxicação aguda por TZF, administrado imediatamente após o treino, nas doses de 7,5 (n=11), 15 (n=10) e 30 mg/kg (n=10), comparado ao grupo controle (salina, n=11) sobre o índice de discriminação (A) e tempo total de exploração de objetos (B) no teste de reconhecimento de objeto.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a intoxicação aguda por TZF na dose de 15 mg/kg, imediatamente após o condicionamento ao contexto, foi capaz de prejudicar a extinção, mas não a expressão da memória aversiva no teste do medo condicionado ao contexto. Quando a aplicação do TZF foi realizada imediatamente após a extinção da memória aversiva, o TZF não prejudicou a consolidação e expressão desse aprendizado. Em ambos os experimentos, nossos dados mostraram que os animais adquiriram o comportamento de medo, o congelamento, durante a sessão de condicionamento. A atividade enzimática da AChE se encontrou reduzida no hipocampo, após administração de TZF nas doses de 15 e 30 mg/kg, tanto 24 quanto 48 h após a intoxicação. Já na amígdala, houve redução significativa da atividade da AChE apenas 24 h após a administração da dose de 30 mg/kg de TZF, mostrando uma recuperação da atividade 48 h após a intoxicação. A redução da atividade da BChE plasmática em todas as doses de TZF, tanto no pós-condicionamento quanto no pós-extinção confirmou a intoxicação. Os animais tratados com TZF também apresentaram sinais e sintomas característicos da síndrome colinérgica nas primeiras horas após a administração, confirmando, portanto, a intoxicação. Finalmente, o protocolo de intoxicação aguda por doses sub-letais de TZF, administrado pós treino ou pós habituação, não afetou a memória associativa não aversiva de ratos sujeitos ao teste do reconhecimento de objeto.

Até o momento, há poucos dados na literatura que tenham investigado o efeito dos OF sobre memórias aversivas e, mais especificamente, sobre a extinção do medo condicionado ao contexto. Por exemplo, FLANNERY e colab. (2016) administraram (i.p.) agudamente DFP em ratos e avaliaram seu efeito sobre o medo condicionado ao contexto por até 36 dias após a intoxicação. Os animais intoxicados exibiram uma queda significativa no tempo de congelamento 9 e 20 dias após a intoxicação. GUIGNET e colab. (2020) administraram também DFP em dose aguda (4 mg/kg) em ratos e observam um déficit dos animais no medo condicionado. Eles mostraram que os efeitos persistiram por até 2 meses pós administração, tendo presença de neuroinflamação e estresse oxidativo neste mesmo período, validando mais teoria de que estes mecanismos podem ser

responsáveis pelos déficits. Por outro lado, a intoxicação aguda por soman, um OF utilizado como arma química, provocou maior expressão de congelamento no medo condicionado ao contexto 30 dias após a intoxicação (COUBARD e colab., 2008), mas uma menor expressão de congelamento 10 dias após a intoxicação (MOFFETT e colab., 2011). Já COLE e colab. (2012) aplicaram clorpirifós-oxon (doses de 0,15-0,25 mg/kg) entre o 4 e 21º dias após o nascimento de camundongos e não observaram alteração no aprendizado e memória no teste do medo condicionado ao contexto. Os resultados contraditórios possivelmente estão relacionados com os diferentes protocolos empregados e aos diferentes OF estudados. Vale ressaltar, ainda, que em nenhum desses trabalhos foi averiguada a extinção de memória aversiva.

Em nosso trabalho, a extinção da memória aversiva foi afetada apenas quando o TZF foi aplicado imediatamente após o condicionamento (48 h antes da sessão teste). Esse dado sugere que o TZF interferiu na aquisição dessa nova memória. Além disso, o TZF não alterou a expressão do medo durante os 6 primeiros minutos da sessão de extinção. Da mesma forma, o TZF administrado imediatamente após a sessão de extinção não afetou a expressão desse aprendizado. Em outro estudo do nosso laboratório utilizando o mesmo protocolo de intoxicação, o TZF não alterou a ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado, bem como não alterou a atividade locomotora no campo aberto 24 h após a intoxicação (VIDIGAL e colab., 2019). Dessa forma, o prejuízo observado na extinção da memória aversiva no teste do medo condicionado ao contexto não parece ter sido causado por alteração na atividade locomotora dos animais.

O prejuízo da extinção da memória de medo induzido pelo TZF se assemelha ao prejuízo que se observa na extinção da memória traumática em pacientes com TEA ou TEPT. Uma ligação entre o surgimento de PTSD em humanos posterior a uma intoxicação por OFs como sarin e ciclosarin já foi vista em veteranos de guerra, bem como outros problemas de memória, sendo comum presumir que há possibilidade de problemas no aprendizado, eventual generalização de memória e conseqüente TEPT (CHAO, 2017). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a intoxicação aguda por OF associada ao protocolo de medo condicionado ao contexto apresenta um caráter translacional e pode ser utilizada como um modelo de estudo da relação entre intoxicação por OF e TEA/TEPT.

O medo condicionado ao contexto é um método pavloviano desenvolvido para investigar aprendizado e memória aversiva em animais. Já existem várias evidências de que estruturas como o hipocampo, o córtex e a amígdala estão envolvidas com o controle dessas emoções e dos aspectos de aprendizado e memória que as envolvem (CHAAYA e colab., 2018; RUSTAY e colab., 2008). As doses de 15 e 30 mg/kg de TZF inibiram a atividade da AChE no hipocampo, tanto 24 h quanto 48 h após a intoxicação. Já na amígdala, foi observado uma inibição da AChE apenas na maior dose (30 mg/kg) e 24 h após a exposição. É possível, então, que as alterações no aprendizado e memória sejam provocadas por mecanismos secundários à inibição da AChE e acúmulo de ACh em regiões e sub-regiões tanto do hipocampo, como da amígdala.

De fato, existe um conjunto robusto de evidências de que a inibição da AChE por OF possa levar à neurotoxicidade (CHEN, Yun, 2012). FLANNERY e colab., (2016) em seu trabalho administrou de forma aguda DFP em ratos, observando o desenvolvimento de neuroinflamação nas regiões ventral e dorsal do hipocampo e em outras áreas cerebrais, como tálamo e córtex; quando os animais foram submetidos ao teste do medo condicionado, demonstrou afetar o aprendizado e a memória, sem afetar a locomoção. Dano neuronal no hipocampo (COLLOMBET e colab., 2006) e na amígdala (COLLOMBET e colab., 2008) foi exibido após intoxicação aguda de camundongos por soman, um OF utilizado como agente químico em guerras. Conforme já mencionado anteriormente, essa neurotoxicidade foi associada à maior expressão de congelamento no medo condicionado ao contexto mesmo 30 dias após a intoxicação por soman (COUBARD e colab., 2008). Por outro lado, a menor expressão de congelamento, 10 dias após a intoxicação por soman, só ocorreu em animais que não convulsionaram anteriormente, bem como não apresentaram neurodegeneração evidente na amígdala e hipocampo (MOFFETT e colab., 2011). Já a intoxicação aguda de ratas Wistar com fenthion provocou morte neuronal na região CA1 do hipocampo 24 h após a exposição (BAŞ e colab., 2019). Além disso, a intoxicação aguda por soman resultou em aumento da ansiedade, neurotoxicidade e redução da atividade enzimática de AChE na amígdala somente de animais que apresentaram convulsões (PRAGER e colab., 2013, 2014). Dessa forma, é possível que o

prejuízo na extinção da memória aversiva observado em nosso estudo, após a intoxicação por triazofós, esteja relacionado com dano neuronal leve secundário à inibição da AChE especialmente no hipocampo. De fato, o hipocampo parece ter um papel central na modulação da expressão do medo condicionado ao contexto por OF, já que a administração de soman (OF) na porção dorsal do hipocampo de camundongos, promoveu a redução do congelamento mesmo após 60 dias após a intoxicação, quando comparado com grupo controle (PERNOT e colab., 2009). Por outro lado, em nosso trabalho, como aparentemente o TZF não induziu convulsões nas doses testadas, é possível que tenha ocasionado dano discreto ao hipocampo e à amígdala, o que explicaria a ausência de alteração da expressão do medo condicionado ao contexto.

De qualquer forma, esses estudos mencionados acima não explicam por que somente a dose intermediária de TZF induziu prejuízo da extinção do medo condicionado. Outros trabalhos, tanto do nosso grupo quanto de outros grupos, já evidenciaram que os efeitos comportamentais induzidos por OF podem não apresentar uma curva dose-resposta (CHEN, W.Q. Wen-Qiang e colab., 2014; CHEN, Wen Qiang e colab., 2011; SIQUEIRA e colab., 2019). Os OF, em diferentes doses, parecem modular, por inibição direta da AChE ou por mecanismos independentes, diferentes neurotransmissores (GUBERT e colab., 2011; JUDGE e colab., 2016; MORENO e colab., 2008). Já administração de agonistas nicotínicos em camundongos gera uma estreita curva em U invertido na resposta do medo condicionado ao contexto, que parece ser resultado de papéis opostos desses receptores no hipocampo dorsal e ventral (GOULD e HIGGINS, 2003; KENNEY e colab., 2012). Adicionalmente, Santos e colab. (2003) relataram que o OF soman pode interagir diretamente com receptores muscarínicos pré-sinápticos no hipocampo, reduzindo a neurotransmissão GABAérgica. Ainda, a administração crônica de uma dose baixa de diclorvos reduziu a expressão de receptores muscarínicos M2, predominantemente pré-sinápticos, no hipocampo de ratos, a dose maior reduziu também a expressão dos receptores M1 e M3, predominantemente pós-sinápticos (VERMA e colab., 2009). Embora não possamos extrapolar as informações desses estudos diretamente para nossos resultados, uma vez que foram utilizados diferentes OF,

espécies e protocolos de exposição, eles mostram que os efeitos dos OF e dos ligantes de receptores colinérgicos podem ser bastante complexos e dependentes da dose utilizada. Dessa forma, é possível que a dose intermediária de TZF tenha afetado determinados neurotransmissores ou receptores em regiões como o hipocampo os quais contribuíram para o prejuízo da extinção da resposta de medo condicionado ao contexto.

Em nosso trabalho, o protocolo de intoxicação com o TZF prejudicou apenas a memória aversiva, uma vez que com as mesmas doses administradas não houve efeito na memória não aversiva no TRO. O protocolo do TRO utilizado é semelhante ao de VEDOVELLI e colab., (2011), no qual foi verificada a interferência dos OF sobre a memória de longa duração, onde o intervalo entre as sessões foi de 24 h. Corroborando nossos resultados, no trabalho de VALVASSORI e colab., (2007), no qual o malation, outro OF, foi administrado de forma aguda e repetida em ratos Wistar, também foi observado déficit em teste de memória aversiva, mas não em memória não aversiva (TRO), possivelmente associado à inibição enzimática de AChE no hipocampo. Já o trabalho de DESHPANDE e colab., (2014) descreveu que uma única dose de paraoxon induziu prejuízo na memória de curta duração no TRO 12 semanas após a intoxicação.

Em ambos os protocolos do TRO executados no nosso trabalho, a avaliação da memória de curta duração se tornou inviável, uma vez que nas doses sub-letais utilizadas, os animais apresentaram síndrome colinérgica e hipolocomoção nas primeiras horas. Por outro lado, vários trabalhos relatam que o índice de discriminação após 24 h ou mais, que reflete a memória de longa duração, pode ser baixo (ŞIK e colab., 2003; MATHIASSEN e DICAMILLO, 2010; AKKERMAN e colab., 2012). De fato, nos protocolos do TRO realizados em nosso trabalho, se observou um baixo índice de discriminação nos animais dos grupos controles, o que pode ter dificultado a detecção de algum efeito do TZF.

A administração do TZF na forma de solução comercial foi escolhida para garantir o aspecto translacional neste trabalho, visto que os pacientes normalmente são expostos às formulações comerciais. Porém, não podemos descartar a possibilidade de que os solventes presentes na formulação tenham contribuído de alguma forma para a toxicidade observada. Nesse sentido,

EDDLESTON e colab., (2012) mostrou que o uso de dimetioato, outro OF, em sua forma comercial com solventes, dentre estes o ciclohexano, induziu sinais de intoxicação mais severos que sua forma pura, sugerindo a participação dos solventes na toxicidade desse composto. Uma das explicações seria a de que os solventes aumentam a absorção do composto ativo.

Neste estudo, houve outras limitações que precisam ser mencionadas. Por exemplo, não foi realizada a dissecação e análise separada das regiões dorsal do hipocampo, que tem maior função sobre atividades cognitivas e a ventral do hipocampo, estando ligada ao estresse e emoções e bem como das sub-regiões da amígdala como a amígdala lateral, exerce sua função na compreensão do medo, ou a basolateral, comumente associada em papéis na ansiedade e que faz projeções para o hipocampo (YANG e WANG, 2017). Além disso, não foi investigada a atividade da AChE em outras estruturas encefálicas importantes para a mediação da resposta de medo condicionado ao contexto, tais como o córtex pré-frontal. Também não foi verificado se a administração de TZF antes da sessão de condicionamento afetaria a expressão da memória aversiva.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A exposição ao TZF promoveu prejuízo da extinção, mas não da expressão da resposta aversiva dos animais no teste do medo condicionado ao contexto, dependente da dose e do momento de administração. Esse efeito pode estar ou não relacionado, direta ou indiretamente, ao declínio da atividade da AChE no hipocampo. O prejuízo parece ser seletivo para memórias associativas aversivas, já que o mesmo protocolo de intoxicação não afetou a memória no TRO. Maior aprofundamento sobre a influência de OF na extinção de memória deve ser investigado, devido ao seu possível impacto na indução de transtornos pós traumáticos agudos ou mesmo crônicos.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AITTA-AHO, Teemu e colab. **Basal Forebrain and Brainstem Cholinergic Neurons Differentially Impact Amygdala Circuits and Learning-Related Behavior**. *Current Biology*, v. 28, n. 16, p. 2557- 2569.e4, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.064>>.

AKKERMAN, Sven e colab. **Object recognition testing: Statistical considerations**. *Behavioural Brain Research*, v. 232, n. 2, p. 317–322, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.024>>.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. fifth ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **What Is Posttraumatic Stress Disorder?** Disponível em: <<https://www.psychiatry.org/patients-families/ptsd/what-is-ptsd>>. Acesso em: 26 mar 2020.

ANVISA. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/5578706>. Acesso em: 21 ago 2019.

BAJGAR, Jirí. **Organophosphates/Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment**. *Advances in Clinical Chemistry*, v. 38, p. 151–216, 2004.

BARELLI, A. e colab. **New experimental Oximes in the management of organophosphorus pesticides poisoning**. *Minerva Anestesiologica*, fala sobre self-poisoning, v. 77, n. 12, p. 1197–1203, Dez 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799476>>.

BAŞ, Orhan e colab. **The effect of acute organophosphate intoxication on female rat hippocampus cornu ammonis region pyramidal neuron numbers, biochemistry and morphology**. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 100, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101652>>.

BERNECKER, Sven. **The Concept of Memory**. *Memory*, n. 15, p. 329–368, 1965.

BOUCHARD, Maryse F. e colab. **Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children**. *Environmental Health Perspectives*, v. 119, n. 8, p. 1189–1195, 2011.

BRYANT, Richard A. **The Current Evidence for Acute Stress Disorder**. Springer Science, 2018.

BURATTI, Franca M. e colab. **Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms**. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 33, n. 3, p. 295–302, 2005.

CANNARD, Kevin. **The acute treatment of nerve agent exposure**. Journal of the Neurological Sciences, v. 249, n. 1, p. 86–94, 2006.

CAREAGA, Mariella Bodemeier Loayza e GIRARDI, Carlos Eduardo Neves e SUCHECKI, Deborah. **Understanding posttraumatic stress disorder through fear conditioning, extinction and reconsolidation**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 71, p. 48–57, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.08.023>>.

CASIDA, John E. e DURKIN, Kathleen A. **Anticholinesterase insecticide retrospective**. Chemico-Biological Interactions, v. 203, n. 1, p. 221–225, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.002>>.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/public-health-partners/vector-control-us.html>>. Acesso em: 16 abr 2019.

CHAAYA, Nicholas e BATTLE, Andrew R. e JOHNSON, Luke R. **An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus**. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, v. 92, n. May, p. 43–54, 2018.

CHANDRA, Mohineesh e colab. **Determination of median lethal dose of triazophos with DMSO in wistar rats**. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, v. 7, n. 4, p. 64–67, 2014.

CHAO, Linda L. **Evidence of Objective Memory Impairments in Deployed Gulf War Veterans With Subjective Memory Complaints**. Military Medicine, v. 182, n. 5, p. e1625–e1631, 2017.

CHEN, W.Q. Wen-Qiang e colab. **Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos**. Neuroscience letters, v. 570, p. 76–80, 6 Jun 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708925>>. Acesso em: 11 ago 2014.

CHEN, Wen Qiang e colab. **Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety**. NeuroToxicology, v. 32, n. 4, p. 355–361, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453723>>.

CHEN, Yun. **Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies**. NeuroToxicology, v. 33, n. 3, p. 391–400, 2012.

COLE, Toby B. e colab. **Neurobehavioral assessment of mice following repeated postnatal exposure to chlorpyrifos-oxon**. Neurotoxicology and Teratology, v. 34, n. 3, p. 311–322, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2012.02.003>>.

COLLOMBET, Jean Marc e colab. **Long-term consequences of soman poisoning in mice. Part 1. Neuropathology and neuronal regeneration in the amygdala**. Behavioural Brain Research, v. 191, n. 1, p. 88–94, 2008.

COLLOMBET, Jean Marc e colab. **Neuronal regeneration partially compensates the delayed neuronal cell death observed in the hippocampal CA1 field of soman-poisoned mice.** *NeuroToxicology*, v. 27, n. 2, p. 201–209, 2006.

ČOLOVIĆ, Mirjana B. e colab. **Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology.** *Current Neuropharmacology*, v. 11, n. 3, p. 315–335, 2013.

COMMISSION, European. **REGULAMENTO (CE) N.º 2076/2002 DA COMISSÃO de 20 de Novembro de 2002.** *Europeias, Jornal Oficial das Comunidades*, n. 7, 2002.

CONWAY, M.A. **Remembering: A process and a state.** 1th. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2007.

COUBARD, Stéphanie e colab. **Long-term consequences of soman poisoning in mice. Part 2. Emotional behavior.** *Behavioural Brain Research*, v. 191, n. 1, p. 95–103, 2008.

DE SOUSA, Fernanda Vieira e colab. **Intoxicação por compostos organofosforados e síndrome Intermediária.** *Rev Med Minas Gerais*, v. 19, p. 50–57, 2009.

DEL PINO, Javier e colab. **Acute and long-term exposure to chlorpyrifos induces cell death of basal forebrain cholinergic neurons through AChE variants alteration.** *Toxicology*, v. 336, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2015.07.004>>.

DESHPANDE, Laxmikant S. e colab. **Chronic behavioral and cognitive deficits in a rat survival model of paraoxon toxicity.** *NeuroToxicology*, v. 44, p. 352–357, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.008>>.

DOMINGOS, L. B. e colab. **P2X7 purinergic receptors participate in the expression and extinction processes of contextual fear conditioning memory in mice.** *Neuropharmacology*, v. 128, p. 474–481, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.005>>.

EDDLESTON, Michael e colab. **A role for solvents in the toxicity of agricultural organophosphorus pesticides.** *Toxicology*, v. 294, n. 2–3, p. 94–103, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2012.02.005>>.

EDDLESTON, Michael. **Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 59, n. 1, p. 341–360, 2018.

EICHENBAUM, H. e YONELINAS, A.P. e RANGANATH, C. **The Medial Temporal Lobe and Recognition Memory.** *Annual Review of Neuroscience*, v. 30, n. 1, p. 123–152, 2007.

ELLMAN, G.L. e colab. **A new and rapid colorimetric determination of**

acetylcholinesterase activity. Biochemical pharmacology, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>>.

EYER, Florian e colab. **Human Parathion Poisoning.** Toxicological Reviews, v. 22, n. 3, p. 143–163, 2006.

FANSELOW, Michael S e LEDOUX, Joseph E. **Why We Think Plasticity Underlying Viewpoint Pavlovian Fear Conditioning Occurs in the Basolateral Amygdala in the ABL is temporarily disrupted only during learning. Each of these conditions has been satisfied. Destruction of the ABL before Training Preve.** Neuron, v. 23, p. 229–232, 1999.

FLANNERY, Brenna M. e colab. **Persistent neuroinflammation and cognitive impairment in a rat model of acute diisopropylfluorophosphate intoxication.** Journal of Neuroinflammation, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0744-y>>.

GOEL, Ashish e AGGARWAL, Praveen. **Pesticide poisoning Review Article Pesticide poisoning.** the National journal of ildia, v. 20, n. 4, p. 182-, 2007.

GOULD, Thomas J. e HIGGINS, J. Stephen. **Nicotine enhances contextual fear conditioning in C57BL/6J mice at 1 and 7 days post-training.** Neurobiology of Learning and Memory, v. 80, n. 2, p. 147–157, 2003.

GUBERT, Priscila e colab. **Low concentrations of methamidophos do not alter AChE activity but modulate neurotransmitters uptake in hippocampus and striatum in vitro.** Life Sciences, v. 88, n. 1–2, p. 89–95, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.031>>.

GUIGNET, Michelle e colab. **Persistent behavior deficits, neuroinflammation, and oxidative stress in a rat model of acute organophosphate intoxication.** Neurobiology of Disease, v. 133, n. March 2019, p. 104431, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.03.019>>.

HALEY, Robert W. e TUIITE, James J. **Epidemiologic evidence of health effects from long-distance transit of chemical weapons fallout from bombing early in the 1991 Persian Gulf War.** Neuroepidemiology, v. 40, n. 3, p. 178–189, 2013.

IZQUIERDO, Iván Antonio e colab. **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes.** Revista USP, v. 0, n. 98, p. 9, 2014.

JAIN, Smita e colab. **Possible role of oxidative stress and brain derived neurotrophic factor in triazophos induced cognitive impairment in rats.** Neurochemical Research, v. 38, n. 10, p. 2136–2147, 2013.

JUDGE, Sarah J. e colab. **Mechanism for the acute effects of organophosphate pesticides on the adult 5-HT system.** Chemico-Biological Interactions, v. 245, p. 82–89, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2015.12.014>>.

KALIN, Ned H e colab. **The Primate Amygdala Mediates Acute Fear But Not the Behavioral and Physiological Components of Anxious Temperament.** *The Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. 2067–2074, 2001.

KAMANYIRE, R. e KARALLIEDDE, Lakshman. **Organophosphate toxicity and occupational exposure.** *Occupational Medicine*, v. 54, n. 2, p. 69–75, 2004.

KENNEY, Justin W. e RAYBUCK, Jonathan D. e GOULD, Thomas J. **Nicotinic receptors in the dorsal and ventral hippocampus differentially modulate contextual fear conditioning.** *Hippocampus*, v. 22, n. 8, p. 1681–1690, 2012.

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

LEDOUX, Joseph. **THE NEURAL CIRCUITS UNDERLYING ANXIETY AND FEAR Fear and the Brain: Where Have We Been, and Where Are We Going?** *Biol Psychiatry*, v. 44, n. 98, p. 1229–1238, 1998.

LEDOUX, Joseph E. **Emotional memory systems in the brain.** *Behavioural Brain Research*, v. 58, n. 1–2, p. 69–79, 1993.

LEE, Jonathan L.C. e NADER, Karim e SCHILLER, Daniela. **An Update on Memory Reconsolidation Updating.** *Trends in Cognitive Sciences*, v. 21, n. 7, p. 531–545, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2017.04.006>>.

LEVIN, Edward D. e colab. **Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 24, n. 6, p. 733–741, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460655>>.

MARTINS, Cristina e SILVA. **AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA DO SISTEMA COLINÉRGICO DE CAMUNDONGOS COM O GENE DO TRANSPORTADOR VESICULAR DE ACETILCOLINA (VACHT) MODIFICADO GENETICAMENTE.** Tese, p. 1–172, 2008.

MASSON, Patrick e NACHON, Florian e LOCKRIDGE, Oksana. **Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases.** *Chemico-Biological Interactions*, v. 187, n. 1–3, p. 157–162, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.027>>.

MATHIASSEN, Joanne R. e DICAMILLO, Amy. **Novel object recognition in the rat: A facile assay for cognitive function.** *Current Protocols in Pharmacology*, n. SUPPL. 49, 2010.

MCDONALD, B E e COSTA, L G e MURPHY, S D. **Spatial memory impairment and central muscarinic receptor loss following prolonged treatment with organophosphates.** *Toxicology letters*, v. 40, n. 1, p. 47–56, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3341049>>.

MCGAUGH, James L. **the Amygdala Modulates the Consolidation of Memories of Emotionally Arousing Experiences**. Annual Review of Neuroscience, v. 27, n. 1, p. 1–28, 2004. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144157>>.

MILESON, B. **Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides**. Toxicological Sciences, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1998.

MILESON, B E e colab. **Common mechanism of toxicity: a case study of organophosphorus pesticides**. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1998.

MIYAKI, Koichi e colab. **Effects of sarin on the nervous system of subway workers seven years after the Tokyo subway sarin attack**. Journal of Occupational Health, v. 47, n. 4, p. 299–304, 2005.

MOFFETT, Mark C e colab. **Pharmacology , Biochemistry and Behavior Impaired auditory and contextual fear conditioning in soman-exposed rats**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 98, n. 1, p. 120–129, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.11.022>>.

MORAGAS, W.; SCHNEIDER, M. DE O. e MORAGAS, Marilena De Oliveira e SCHNEIDER, Washington Mendonça. **Biocidas: Suas Propriedades E Seu Histórico No Brasil**. Caminhos de Geografia, v. 3, n. 10, p. 26–40, 2003. Disponível em: <www.ig.ufu.br/caminhos_de_geografia.html>.

MORENO, Margarita e colab. **Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute chlorpyrifos exposure**. Toxicology Letters, v. 176, n. 2, p. 162–167, 2008.

NAUGHTON, Sean X. e TERRY, Alvin V. **Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure**. Toxicology, v. 408, n. April, p. 101–112, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>>.

NAUGHTON e TERRY. **Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure**. Toxicology, v. 408, n. August, p. 101–112, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>>.

NAVEED, Abdul e JANAIHAH, C. **Effect of Triazophos on Protein Metabolism in the Fish , Channa punctatus (Bloch)**. v. 3, n. 2, p. 124–128, 2011.

O'MALLEY, Michael. **Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings**. Lancet, v. 349, n. 9059, p. 1161–1166, 1997.

OF, Ministry of Agriculture e 2032, The People's Republic of China Announcement No. **Anúncio do Ministério da Agricultura No. 2032**. Disponível em: <http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219_3718683.htm>. Acesso em: 23 ago 2019.

PERNOT, F. e colab. **Intrahippocampal cholinesterase inhibition induces**

epileptogenesis in mice without evidence of neurodegenerative events. Neuroscience, v. 162, n. 4, p. 1351–1365, 2009.

PIRES, Rita G W e colab. **The contribution of mild thiamine deficiency and ethanol consumption to central cholinergic parameter dysfunction and rats' open-field performance impairment.** Pharmacology Biochemistry and Behavior, v. 70, n. 2–3, p. 227–235, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701192>>.

PRAGER, Eric M. e colab. **Acetylcholinesterase inhibition in the basolateral amygdala plays a key role in the induction of status epilepticus after soman exposure.** NeuroToxicology, v. 38, p. 84–90, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.06.006>>.

PRAGER, Eric M. e colab. **The recovery of acetylcholinesterase activity and the progression of neuropathological and pathophysiological alterations in the rat basolateral amygdala after soman-induced status epilepticus: Relation to anxiety-like behavior.** Neuropharmacology, v. 81, p. 64–74, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.01.035>>.

RANI, Sunita e MADAN, V. K. e KATHPAL, T. S. **Persistence and dissipation behavior of triazophos in canal water under Indian climatic conditions.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 50, n. 1, p. 82–84, 2001.

REUTERS. **Why Brazil has a big appetite for risky pesticides.** Disponível em: <<https://www.reuters.com/investigates/special-report/brazil-pesticides/>>. Acesso em: 7 set 2019.

ROBERTS T.R., HUTSON D.H., Carbaryl. Organophosphorus insecticides. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Part 2: Insecticides and Fungicides. UK: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999. p. 187–522.

ROOZENDAAL, Benno e colab. **Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory.** Neurobiology of Learning and Memory, v. 90, n. 3, p. 576–579, 2008.

RUSTAY, Nathan e BROWMAN, Kaitlin e CURZON, Peter. **Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents.** Second Edi ed. [S.l: s.n.], 2008.

SANTOS, M. D. e colab. **Low concentrations of pyridostigmine prevent soman-induced inhibition of GABAergic transmission in the Central Nervous System: involvement of muscarinic receptors.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 304, n. 1, p. 254–265, 1 Jan 2003.

SANTOS, Viviane Martins dos Rebello e colab. **Compostos organofosforados pentavalentes: Histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais.** Química Nova, v. 30, n. 1, p. 159–170, 2007.

SAVAGE, E P e colab. **Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning.** Archives of environmental health, v.

43, n. 1, p. 38–45, 1988.

SCHEFFEL, Corinna e colab. **Counteracting desensitization of human $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors with bispyridinium compounds as an approach against organophosphorus poisoning.** *Toxicology Letters*, v. 293, n. September, p. 149–156, 2018.

SCHMIDT, E e colab. **Proposal of standard methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37 degrees C. II. Cholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Working Group of Enzymes, German Society for Clinical Chemistry.** *Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, v. 30, n. 3, p. 163–170, 1992.

SENANAYAKE, Nimal e KARALLIEDDE, Lakshman. **Neurotoxic Effects of Organophosphorus Insecticides.** *New England Journal of Medicine*, v. 316, n. 13, p. 761–763, 1987. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198703263161301>>.

SHIN, Lisa M e RAUCH, Scott L e PITMAN, Roger K. **Amygdala, Medial Prefrontal Cortex, and Hippocampal Function in PTSD.** *Annals New York Academy of Sciences*, v. 79, p. 67–79, 2006.

ŞIK, Ayhan e colab. **Performance of different mouse strains in an object recognition task.** *Behavioural Brain Research*, v. 147, n. 1–2, p. 49–54, 2003.

SINAN. **Intoxicações de 2007 a 2014.** Disponível em: <http://dados.contraosagrotoxicos.org/pt_PT/dataset/intoxicacoes-sinan/resource/95a0423b-2ac4-4cf5-8b6f-3f16b55dc709>. Acesso em: 29 jul 2019.

SINGH, Manjeet e RISHI, Sushma. **Plasma acetylcholinesterase as a biomarker of triazophos neurotoxicity in young and adult rats.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 19, n. 3, p. 471–476, Maio 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668904002704>>.

SIQUEIRA, Alciene Almeida e colab. **Atropine counteracts the depressive-like behaviour elicited by acute exposure to commercial chlorpyrifos in rats.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 71, p. 6–15, 2019.

SQUIRE, Larry R. **Recognition memory and the medial temporal lobe.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 8, n. 11, p. 872–883, 2008.

ULIANA, Daniela L. e RESSTEL, Leonardo B.M. e GRACE, Anthony A. **Fear extinction disruption in a developmental rodent model of schizophrenia correlates with an impairment in basolateral amygdala-medial prefrontal cortex plasticity.** *Neuropsychopharmacology*, n. June, p. 1–9, 2018.

VALE, J. A. **Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning.** *Toxicology Letters*, v. 102–103, p. 649–652, 1998. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)80136-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(98)80136-7)>.

- VALVASSORI, Samira S. e colab. **Acute and subacute exposure to malathion impairs aversive but not non-associative memory in rats.** *Neurotoxicity Research*, v. 12, n. 1, p. 71–79, 2007.
- VEDOVELLI, K. e colab. **Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats.** *Neuroscience*, v. 199, p. 284–291, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.08.012>>.
- VERMA, Suresh Kumar e RAHEJA, Geetu e GILL, Kiran Dip. **Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: An acetylcholine independent mechanism.** *Toxicology*, v. 256, n. 3, p. 175–182, 2009.
- WALKER, Bailus e NIDIRY, Joseph. **Current concepts: Organophosphate toxicity.** *Inhalation Toxicology*, v. 14, n. 9, p. 975–990, 2002.
- WESSELING, Catharina e colab. **Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers.** *International Journal of Occupational and Environmental Health*, v. 8, n. 1, p. 27–34, 2002.
- WIN-SHWE, Tin Tin e colab. **Impairment of novel object recognition in adulthood after neonatal exposure to diazinon.** *Archives of Toxicology*, v. 87, n. 4, p. 753–762, 2013.
- WINOCUR, Gordon e MOSCOVITCH, Morris. **Hippocampal and Prefrontal Cortex Contributions to Learning and Memory: Analysis of Lesion and Aging Effects on Maze Learning in Rats.** *Behavioral Neuroscience*, v. 104, n. 4, p. 544–551, 1990.
- WOREK, F. e colab. **Inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds: Pig versus minipig acetylcholinesterase.** *Toxicology*, v. 244, n. 1, p. 35–41, 2008.
- YANG, Ying e WANG, Jian Zhi. **From structure to behavior in basolateral amygdala-hippocampus circuits.** *Frontiers in Neural Circuits*, v. 11, n. October, p. 1–8, 2017.
- ZAMEER, Saima e AKHTAR, Mohd. e VOHORA, Divya. **Behavioral experimental paradigms for the evaluation of drug's influence on cognitive functions: interpretation of associative, spatial/nonspatial and working memory.** *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, v. 18, n. 3, p. 185–204, 2019.

ANEXOS

9. ANEXO 1

CERIFICADO CEUA – 29/2017

CERTIFICADO

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

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

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia **10 de agosto de 2018**

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

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

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

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

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

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

Vitória-ES, 31 de agosto de 2018

Breno S. Salgado

Breno Souza Salgado

Coordenador da CEUA-Ufes

*Este certificado revoga o previamente emitido aprovado na reunião Extraordinária de 21 de julho de 2017

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Avenida Marechal Campos, 1468 - Maruípe - Vitória/ES - CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 - ceua@ufes.br - www.ceua.ufes.br

APÊNDICE

10. APÊNDICE

A toxicidade aguda foi realizada a partir de parâmetros qualitativos após intoxicação por TZF nas doses 7,5, 15 e 30 mg/mg. Foram medidos sinais e sintomas que surgem após administração, sendo verificado os mesmos por quatro horas seguintes à intoxicação. Sinais de salivação, lacrimejamento, exoftalmia, coordenação motora, atividade locomotora e prejuízo motor foram registrados.

Foi observado que houve apresentação de sinais decorrentes da intoxicação, sendo dose-dependente, onde a maior dose (30mg/kg) induzia os sinais mais intensos, tais como tremor e convulsão.

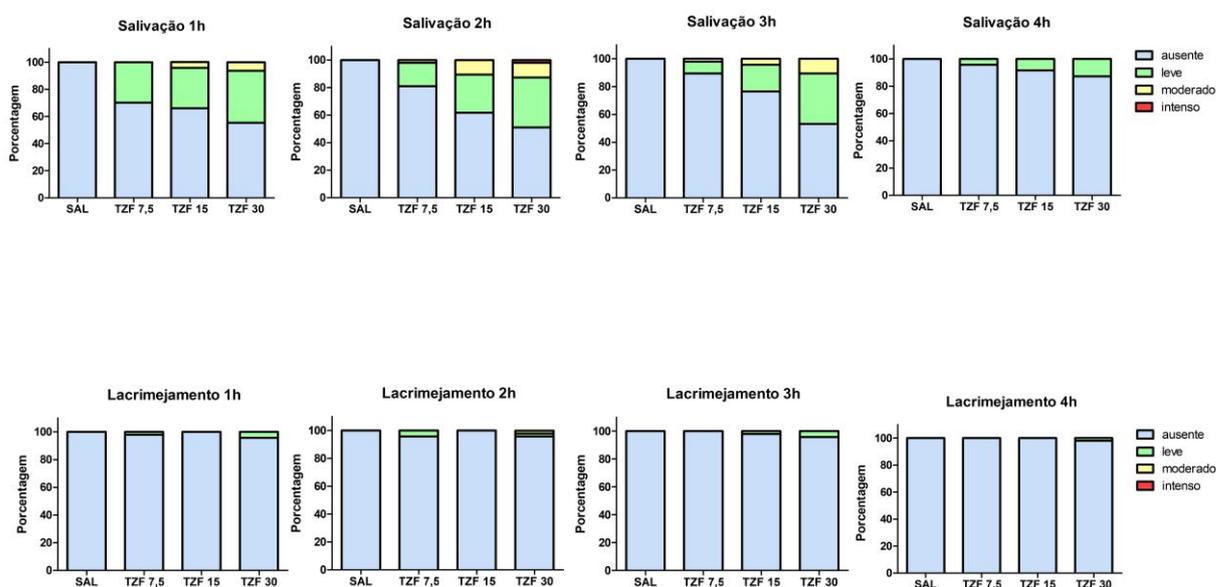


Figura 25. Efeito da intoxicação aguda por TZF, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, avaliando qualitativamente os sinais de salivação e lacrimejamento por 4 horas após a intoxicação.

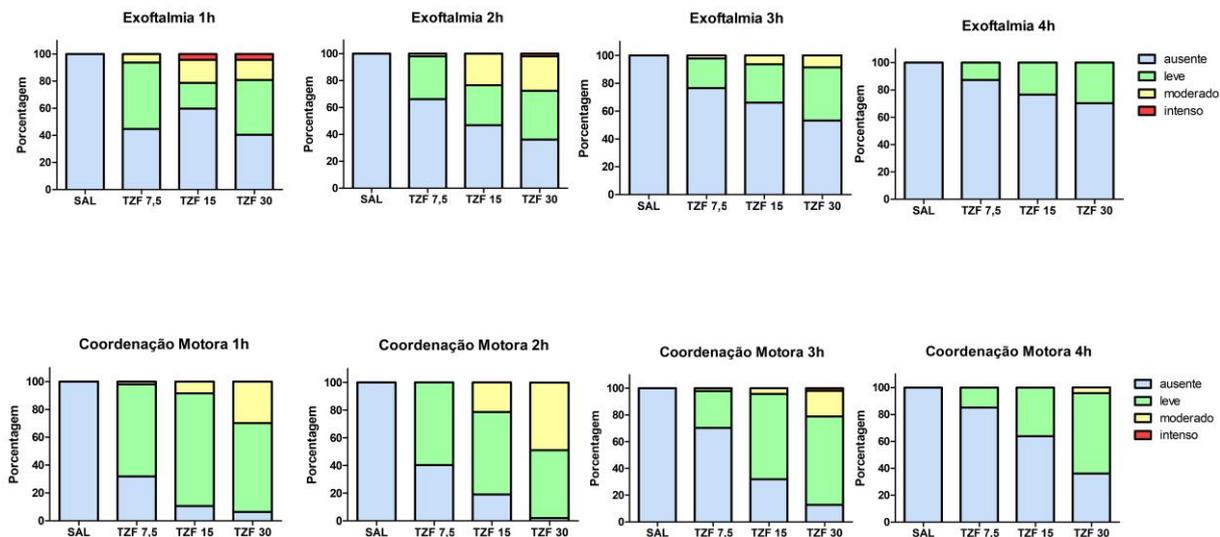


Figura 26. Efeito da intoxicação aguda por TZF, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, avaliando qualitativamente os sinais de exoftalmia e coordenação motora por 4 horas após a intoxicação.

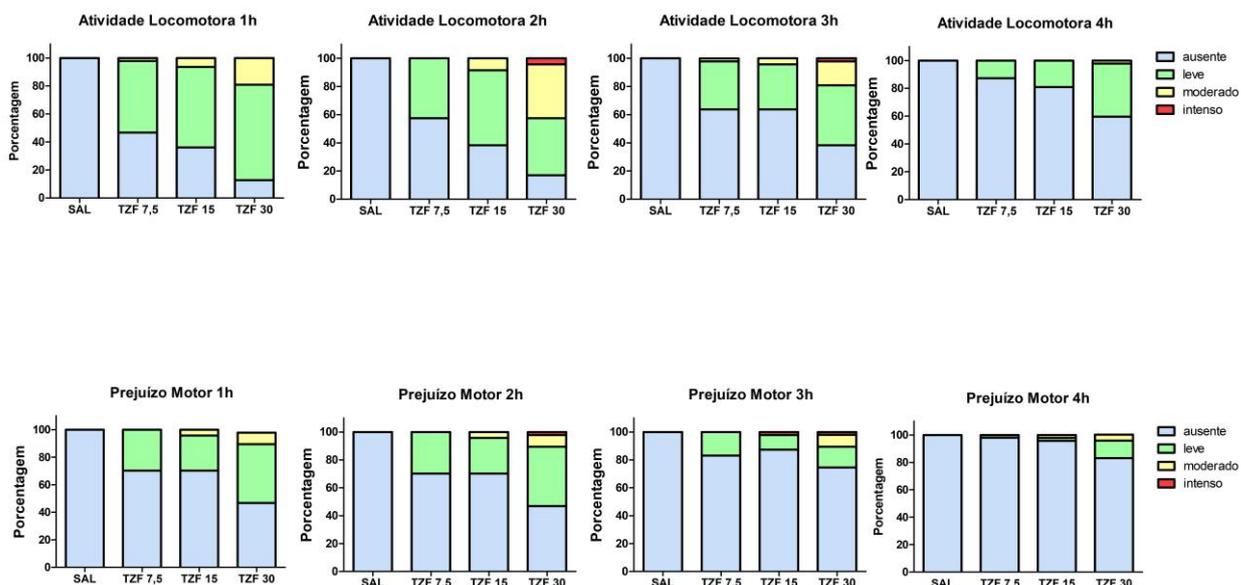


Figura 27. Efeito da intoxicação aguda por TZF, nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, avaliando qualitativamente os sinais de atividade locomotora e prejuízo motor por 4 horas após a intoxicação.

