

ALEXANDRE FRINHANI CUNHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO
INSETICIDA CLORPIRIFÓS SOBRE AS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS EM
ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia, da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karla Nívea Sampaio.

VITÓRIA
2014

ALEXANDRE FRINHANI CUNHA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA EXPOSIÇÃO AO
INSETICIDA CLORPIRIFÓS SOBRE AS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS EM
ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Karla Nívea Sampaio
Departamento de Ciências Farmacêuticas - UFES
Orientadora

Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade
Departamento de Farmácia - UVV

Àquela que, embora hoje ausente, se faz presente em tudo o que me ensinou. À minha mãe dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua bondade e graça, que me deram forças para chegar até aqui. Minha gratidão a Ele por tantas bênçãos e fidelidade.

Aos meus pais, Maria Luiza e Sebastião, por terem me incentivado e investido em minha educação, colocando-a como prioridade. Tudo o que eu conquistar, devo a vocês.

Às minhas irmãs, Danielle, Katiane e Mara, por todo o suporte e compreensão. Agradeço por estarem sempre presentes e por me amarem incondicionalmente.

Aos amigos, sempre companheiros, por me fazerem lembrar o lado bom da vida. Aos que compreenderam a minha ausência e que celebrarão comigo essa vitória.

À amiga, mais que especial, Sheila. O seu apoio, incentivo e conselhos foram fundamentais para que eu conseguisse completar essa fase. Não teria conseguido sem a sua força e ajuda. Obrigado!

À Prof.^a Karla pela orientação, disponibilidade, paciência e compreensão. Obrigado por me receber em seu laboratório, ceder o seu espaço e confiar na minha competência e capacidade para a conclusão deste projeto. Seus conselhos serão guardados para sempre.

Às Prof.^a Daniela pelo auxílio e orientação nos testes de dosagem enzimática e na disponibilização de equipamentos e laboratório para execução dos experimentos.

À Prof.^a Vanessa pela orientação e colaboração nos ensaios comportamentais e em toda a análise estatística deste estudo. Obrigado pela atenção e por ceder o espaço, aparelhos e tudo necessário para execução destes experimentos.

Ao Prof. Leonardo e seu aluno Nilson, pela importante visita ao nosso laboratório para suporte, treinamento e orientação quanto à execução e análise do barorreflexo pelo método de infusão.

Aos Professores da banca examinadora, pela disponibilidade e por aceitarem o convite de fazerem parte da conclusão deste curso.

À CAPES e FAPES pelo suporte financeiro.

Aos demais alunos do curso de Mestrado, pela cumplicidade e companheirismo durante esse período difícil. Obrigado por terem me ajudado a transformar esse desafio em momentos únicos e especiais.

E aos alunos de iniciação científica, Igor e Thallis, pelo apoio e ajuda na execução dos experimentos deste trabalho. A colaboração de vocês foi essencial.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	31
3.2 PRODUTOS QUÍMICOS.....	31
3.3 TRATAMENTO.....	32
3.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE	32
3.5 ENSAIOS CARDIOVASCULARES	33
3.5.1 Canulação da artéria e veia femoral	33
3.5.2 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	34
3.5.3 Avaliação do Quimiorreflexo	35
3.5.4 Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch	36
3.5.5 Avaliação do Barorreflexo	36
3.6 DOSAGENS ENZIMÁTICAS	37
3.6.1 Determinação da atividade da Colinesterase Plasmática (ChE)	38
3.6.2 Determinação da atividade da Creatina Quinase Fração MB (CK-MB)	38
3.6.3 Determinação da atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)	40
3.7 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	41
3.7.1 Teste do campo aberto	41
3.7.2 Teste do labirinto em cruz elevado	42
3.7.3 Teste do nado forçado	43
3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	43
3.8.1 Ensaios cardiovasculares	43
3.8.2 Dosagens enzimáticas	44
3.8.3 Ensaios comportamentais	45
3.8.3.1 Teste do campo aberto (TCA) e labirinto em cruz elevado (LCE)	46
3.8.3.2 Teste do nado forçado.....	47
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47

4 RESULTADOS	49
4.1 TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DA TOXICIDADE.....	50
4.2 ENSAIOS CARDIOVASCULARES	51
4.2.1 Dados Hemodinâmicos.....	51
4.2.2 Avaliação do Quimiorreflexo.....	51
4.2.3 Avaliação do Reflexo de Bezold-Jarisch.....	53
4.2.4 Avaliação do Barorreflexo	56
4.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS	59
4.3.1 Atividade da Colinesterase plasmáticas (ChE).....	59
4.3.2 Atividade da Creatina Quinase Fração MB (CK-MB)	61
4.3.3 Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)	62
4.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	63
4.4.1 Teste do Campo Aberto (TCA)	63
4.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE).....	63
4.4.3 Teste do Nado Forçado (TNF)	65
5 DISCUSSÃO	67
5.1 TOXICIDADE AGUDA E COLINESTERASE PLASMÁTICA.....	68
5.2 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	70
5.3 ENSAIOS CARDIOVASCULARES	74
6 CONCLUSÃO	84
7 REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE I	97
APÊNDICE II	98
APÊNDICE III	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sintomas observados em pacientes intoxicados de forma aguda por organofosforados.	20
Tabela 2. Reagente 01 do Kit CK-MB Bioclin®	39
Tabela 3. Reagente 02 do Kit CK-MB Bioclin®	40
Tabela 4. Frequência de manifestação e tempo de latência para início da observação dos parâmetros avaliados durante o teste de acompanhamento da toxicidade aguda.	50
Tabela 5. Valores de Pressão Média basal e Frequência cardíaca basal dos animais tratados com salina ou com clorpirifós 30 mg/kg.....	51
Tabela 6. Parâmetros das curvas sigmóides obtidas pelo método de avaliação do barorreflexo por infusão.	57
Tabela 7. Atividade da enzima CK-MB antes e após o tratamento em 04 animais expostos ao Clorpirifós 30 mg/kg.	61
Tabela 8. Atividade da enzima LDH antes e após o tratamento em 03 animais expostos ao clorpirifós 30 mg/kg.....	62
Tabela 9. Resultado dos parâmetros avaliados no TCA 24, 48 e 72 horas após o tratamento.	63
Tabela 10. Parâmetros das curvas sigmóides obtidas pelo método de avaliação do barorreflexo por doses aleatórias.	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de execução dos ensaios cardiovasculares.....	44
Figura 2. Etapas de execução das dosagens enzimáticas.....	45
Figura 3. Etapas de execução dos testes comportamentais labirinto em cruz elevado (LCE) e teste do campo aberto (TCA).....	46
Figura 4. Etapas de execução do teste do nado forçado.	47
Figura 5. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle e tratado mostrando as respostas na PAP, PAM e FC durante a ativação do quimiorreflexo..	52
Figura 6. Variação de pressão arterial média e de frequência cardíaca após ativação do quimiorreflexo	53
Figura 7. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle e tratado mostrando as respostas na PAP, PAM e FC durante a ativação do RBJ.	54
Figura 8. Variação de pressão arterial média e de frequência cardíaca, após a ativação do RBJ.	55
Figura 9. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle e tratado mostrando as respostas na PAP, PAM e FC durante a ativação do barorreflexo cardíaco por infusão.....	57
Figura 10. Curvas sigmóides obtidas após avaliação do barorreflexo por infusão....	57
Figura 11. Sensibilidade do barorreflexo, determinada por regressão linear, das respostas bradicárdicas e taquicárdicas nos animais.	59

Figura 12. Atividade da colinesterase plasmática antes e após o tratamento com salina, clorpirifós 20, 25 e 30 mg/kg.	60
Figura 13. Atividade da Creatina Quinase Fração MB em ratos antes e após o tratamento com clorpirifós 30 mg/kg.	61
Figura 14. Atividade da Desidrogenase Láctica nos animais antes e após o tratamento com clorpirifós 30 mg/kg.....	62
Figura 15. Número de entradas nos braços fechados e abertos do LCE observados nos animais tratados.	64
Figura 16. % de tempo nos braços abertos do LCE observados nos animais tratados com salina e clorpirifós.	65
Figura 17. Tempo de imobilidade observado nos animais tratados submetidos ao TNF.	66
Figura 18. Variação de pressão arterial média e de frequência cardíaca após a ativação do quimiorreflexo. Os dados foram obtidos por análise manual dos registros cardiovasculares.	97
Figura 19. Variação de pressão arterial média e de frequência cardíaca após a ativação do RBJ. Os dados foram obtidos por análise manual dos registros cardiovasculares..	98

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABIFINA, Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades

ADP, Adenosina difosfato

ATP, Adenosina trifosfato

CEUA-UFES, Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Espírito Santo

ChE, Colinesterase plasmática

CK, Creatina quinase

CK-MB, Creatina quinase fração MB

CK-MM, Creatina quinase fração MM

CON, Grupo controle

CPF, Clorpirifós

CPF 20, Grupo Clorpirifós 20 mg/kg

CPF 25, Grupo Clorpirifós 25 mg/kg

CPF 30, Grupo Clorpirifós 30 mg/kg

FC, Frequência cardíaca

G-6-PDH, Glicose-6-fosfato desidrogenase

HK, Hexoquinase

i.p., intraperitoneal

LCE, Labirinto em cruz elevado

LDH, Lactato desidrogenase

NAD⁺, Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH, Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP⁺, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH, Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

OF, Organofosforados

PA, Pressão arterial

PAP, Pressão arterial pulsátil

PAM, Pressão arterial média

TCA, Teste do campo aberto

TNF, Teste do nado forçado

RBJ, Reflexo de Bezold-Jarisch

SINITOX, Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas

RESUMO

Dentre os agrotóxicos disponíveis para utilização, se destacam os organofosforados, considerados um dos principais responsáveis por intoxicações, óbitos e tentativas de suicídio no Brasil. O clorpirifós, organofosforado extensamente utilizado, exerce sua ação tóxica, em parte, devido à inibição da enzima acetilcolinesterase, o que resulta em excesso de acetilcolina nas sinapses colinérgicas, promovendo sinais e efeitos diversos resultantes do aumento de ativação tanto de receptores no sistema nervoso central quanto de receptores periféricos muscarínicos e nicotínicos. Tendo em vista as profundas alterações promovidas em diversos sistemas nos indivíduos expostos, desperta um particular interesse os efeitos causados pela intoxicação pelo clorpirifós sobre o sistema cardiovascular e sobre o comportamento. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da exposição aguda a doses subletais do inseticida clorpirifós sobre três reflexos cardiovasculares (barorreflexo, reflexo de Bezold-Jarisch e quimiorreflexo), sobre a atividade de algumas enzimas (colinesterase plasmática, creatina-quinase fração MB e lactato desidrogenase) e sobre alguns parâmetros comportamentais em animais experimentais. Para os testes cardiovasculares, os animais foram inicialmente submetidos à cateterização da artéria e veia femoral e, 24 horas após, tratados com clorpirifós 30 mg/kg ou salina. Um dia após o tratamento, foram realizados os registros cardiovasculares para avaliação desses reflexos. Estes mesmo animais forneceram amostras para as dosagens enzimáticas, coletadas antes e após o tratamento. Para a avaliação comportamental, os animais foram tratados com clorpirifós 20, 25 e 30 mg/kg ou com salina. Em seguida, foram submetidos ao teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e teste do nado forçado. Sobre o comportamento, o tratamento com o organofosforado induziu um possível efeito ansiogênico e depressivo nos animais testados. Nas dosagens enzimáticas, a atividade da colinesterase plasmática foi significativamente reduzida e, em alguns dos animais tratados, foram observados indícios de lesão cardiovascular, evidenciados por aumento da atividade das enzimas CK-MB e LDH. Em relação aos testes cardiovasculares, o tratamento com o clorpirifós foi capaz de causar prejuízo na resposta bradicárdica dos três reflexos testados. Adicionalmente, a exposição ao clorpirifós foi capaz de promover redução

na resposta hipertensora do quimiorreflexo, na hipotensora do RBJ e no range e ganho do barorreflexo.

Palavras-chave: Clorpirifós. Organofosforados. Reflexos cardiovasculares. Comportamento.

ABSTRACT

Among the pesticides available for use, the organophosphorus compounds stand out as one of the main responsible for poisonings, suicide attempts and deaths in Brazil. Chlorpyrifos, a widely used pesticide representative of this group, exerts its toxic effect partly due to the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme. This inhibition leads to an increase in the amount of acetylcholine available in the cholinergic synapses, promoting various signals and effects which result from an excessive activation of the muscarinic and nicotinic receptors located either peripherally or within the central nervous system. Considering that these compounds are capable of promoting profound changes in many systems in the exposed, rises a particular interest on the effects observed on the cardiovascular system and behavior induced by poisoning with these substances. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of the acute exposure to sublethal doses of the insecticide chlorpyrifos on three cardiovascular reflexes (baroreflex, Bezold-Jarisch reflex and chemoreflex), on the activity of some enzymes (plasma cholinesterase, creatine kinase MB fraction and lactate dehydrogenase) and on some behavioral parameters in experimental animals (open field test, elevated plus maze and forced swim test). For the cardiovascular tests, animals initially underwent catheterization of the femoral artery and vein and, 24 hours later, were treated with either chlorpyrifos 30 mg/kg or saline. One day after the treatment, cardiovascular recordings were performed for assessment of cardiovascular reflexes. The same animals provided blood samples for all enzymatic measurements, which were collected through the catheter before and after the treatment. For the behavioral tests, animals were treated with either chlorpyrifos at the doses of 20, 25 and 30 mg/kg or saline. And, 24 hours later, were subjected to the open field test, elevated plus maze and forced swim test. In the behavioral tests, the treatment with the organophosphate induced a anxiogenic and depressive-like effect in tested animals. The cholinesterase activity was significantly reduced in treated animals. Some of the treated animals also showed an evidence of cardiovascular injury, represented by the increased activity of CK-MB and LDH enzymes. Regarding cardiovascular tests, the treatment with chlorpyrifos induced an impairment in the bradycardic response of the three reflexes tested. Additionally, exposure to chlorpyrifos decreased the hipertensive response of the chemoreflex, the

hypotensive response of the RBJ as well as the range and the baroreflex gain in tested animals.

Keywords: Organophosphorus. Chlorpyrifos. Cardiovascular Reflexes. Behavior.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Defensivos agrícolas, pesticidas ou agrotóxicos são termos atribuídos aos produtos destinados ao uso nas diversas etapas da produção agrícola, tais como produção, armazenamento, beneficiamento e distribuição, com o objetivo de alterar a composição da fauna ou flora para preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

No Brasil, o uso de agrotóxicos cresceu bastante nos últimos anos, tornando o país um dos líderes mundiais no consumo dessas substâncias (ABIFINA, 2009). O uso de pesticidas ainda é atualmente uma importante estratégia na agricultura para combater e prevenir pragas agrícolas, permitindo aumento da produção e da qualidade dos alimentos produzidos. Porém, sua extensiva utilização pode causar impacto negativo sobre os ecossistemas e pode representar um grave problema de saúde pública, uma vez que toda substância com atividade praguicida é potencialmente tóxica aos animais vivos relacionados ao ambiente no qual são aplicadas (CALDAS & SOUZA, 2000; ECOBICHON, 2001).

Envenenamentos por pesticidas constituem um sério problema entre populações de países em desenvolvimento, particularmente em áreas rurais, onde o seu uso é amplamente disseminado. Aliado ao amplo uso observa-se também, na maioria dos casos, o desconhecimento dos riscos associados à sua utilização, o conseqüente desrespeito às normas básicas de segurança, a ausência de controle eficaz sobre a venda e uso, monitoramento escasso da exposição ocupacional e diagnóstico e tratamento falhos nos casos de intoxicação. Tais fatores constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana observados no Brasil (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004; MOREIRA et al., 2002).

Dados mais recentes do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), do período de 2009 a 2011, trazem os agrotóxicos como um dos principais agentes em casos de intoxicações, sendo superados apenas pelos medicamentos e acidentes com animais peçonhentos. Destaca-se, no entanto, o fato deste grupo de substâncias possuírem o maior nível de letalidade e porcentagem de óbito dentre todos os registros de intoxicações, o que confirma o perigo potencial da exposição a esses compostos (SINITOX, 2014).

Embora casos de intoxicação possam resultar de exposição ocupacional ou ingestão acidental, na maioria dos casos já relatados a principal via de exposição consiste na ingestão deliberada em tentativas de suicídio (JEYARATNAM, 1990). A literatura científica confirma que a taxa de suicídio entre agricultores é elevada, particularmente em países em desenvolvimento (EDDLESTON & PHILLIPS, 2004).

Dentre os agrotóxicos disponíveis para utilização, destaca-se o grupo dos organofosforados, que reúne os ésteres derivados do ácido fosfórico ou fosforotióico, aplicados principalmente para ação inseticida. Essas substâncias são consideradas um dos principais responsáveis por intoxicações, óbitos e tentativas de suicídio no Brasil (ARAÚJO et al., 2007; RECENA et al., 2006).

Os organofosforados, possivelmente os inseticidas mais amplamente utilizados no mundo, são destinados tanto para uso na agricultura quanto para uso doméstico. Sua ação tóxica se deve em parte à inibição das enzimas hidrolases de ésteres carboxílicos nas diversas sinapses que utilizam a acetilcolina como neurotransmissor. Essas enzimas incluem a acetilcolinesterase, presente em todas as sinapses colinérgicas, tais como tecidos nervosos, músculos esqueléticos e membranas celulares dos eritrócitos, assim como a butirilcolinesterase, encontrada principalmente no plasma, pâncreas, coração e fígado (CLARK, 2006; KWONG, 2002). Devido a sua facilidade de acesso, a butirilcolinesterase ou colinesterase plasmática é muito usada como marcador sensível de exposição e, também, para diagnóstico, monitoramento e prognóstico de casos de intoxicação por estes agentes anticolinesterásicos (EDDLESTON et al., 2008).

Sob condições normais, a ação da acetilcolina nas sinapses é encerrada logo após sua ligação com o receptor, quando o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase ataca este neurotransmissor clivando-o em colina e acetato numa reação de duas etapas. Entretanto, na presença de um organofosforado esta enzima é inativada ao formar uma ligação muito estável entre o agente e o resíduo serina de seu sítio ativo (CLARK, 2006).

A inibição da acetilcolinesterase por estes agrotóxicos resulta em excesso de acetilcolina nas sinapses colinérgicas centrais e periféricas. A acetilcolina é um neurotransmissor encontrado nos gânglios do sistema nervoso simpático e parassimpático, nas junções neuromusculares esqueléticas, nas terminações pós-ganglionares dos nervos parassimpáticos e em terminações colinérgicas no Sistema Nervoso Central (SNC), bem como no sistema simpático colinérgico e na supra-

renal. Dessa forma, a ação anticolinesterásica promove excesso de ativação dos receptores promovendo sinais e efeitos no sistema nervoso central e efeitos periféricos muscarínicos e nicotínicos (CLARK, 2006).

A tabela 1 apresenta os principais sintomas observados em indivíduos intoxicados agudamente por produtos organofosforados, divididos de acordo com a localização da sinapse na qual a acetilcolina participa como neurotransmissor (ECOBICHON, 2001; O'MALLEY, 1997).

Tabela 1. Sintomas observados em pacientes intoxicados de forma aguda por organofosforados.

Muscarínicos	Nicotínicos	Sistema Nervoso Central
Vômitos	Fraqueza muscular	Ansiedade
Diarreia	Fasciculação	Agitação
Cólicas abdominais	Tremor	Ataxia
Lacrimejamento	Paralisia	Confusão
Sialorreia	Hipertensão	Coma
Sudorese	Taquicardia	
Broncoconstrição	Parada cardiorrespiratória	
Broncorreia		
Defecação e micção		
Hipotensão e bradicardia		

O clorpirifós [0,0-dietil-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato], comercializado, dentre outras marcas, como Lorsban 480BR[®], Fersol 450 EC[®] e Dursban[®], é um dos organofosforados mais utilizados mundialmente, e compõe 11 diferentes produtos registrados no Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. Utilizado extensamente no meio rural, o clorpirifós é usado principalmente em culturas de algodão, batata, café, milho e soja (IDAF-ES, 2012).

A ação tóxica deste composto depende de ativação hepática via citocromo P450, numa reação de dessulfuração oxidativa que gera como produto o clorpirifós-oxon, capaz de inibir as colinesterases e provocar acúmulo de acetilcolina nas sinapses colinérgicas centrais e periféricas. Portanto, assim como outros agentes organofosforados, os sinais observados a partir desse momento envolvem componentes do sistema nervoso central e efeitos periféricos muscarínicos e nicotínicos (RISHER & NAVARRO, 1997).

Tendo em vista que essas substâncias são capazes de promover profundas alterações em diversos sistemas nos indivíduos expostos, desperta particular interesse os efeitos causados pela intoxicação por esses compostos tanto sobre o sistema cardiovascular quanto no sistema nervoso central.

Os principais relatos existentes sobre alterações comportamentais evidenciam manifestações de ordem psiquiátrica em indivíduos expostos a organofosforados tais como depressão, ansiedade, comprometimento motor e agressividade. Diversos estudos clínicos e estudos de caso têm indicado que a exposição crônica a praguicidas da classe dos organofosforados pode estar associada a desordens afetivas, especialmente, ansiedade e depressão. Estas manifestações, em geral, podem variar de intensidade e ocorrência de acordo com as características da exposição ao pesticida, ou seja, tempo, extensão e via de absorção, dentre outros fatores (DAVIES et al., 2000; JAGA & DHARMANI, 2007; JOUBERT & JOUBERT, 1988; LONDON et al., 2005).

Embora desordens comportamentais sejam mais evidentes a partir da intoxicação crônica a esta classe de compostos, considerando a distribuição do sistema colinérgico no SNC e que comportamentos complexos são mediados por processos neurais que tem origem neste sistema, constitui-se em um importante âmbito de investigação a eventual potencialidade dos compostos organofosforados também induzirem desordens comportamentais após exposição aguda (ALDRIDGE et al., 2003; CHEN et al., 2011; MORENO et al., 2008).

A avaliação dos efeitos decorrentes do tratamento ou exposição a diversos agentes sobre o sistema nervoso central que acometem os diversos comportamentos pode ser feita através de modelos comportamentais de estudo em animais experimentais. Alguns importantes modelos comportamentais de estudo em animais experimentais bem caracterizados constituem-se no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), no Teste do Campo Aberto (TCA) e no Teste do Nado Forçado (TNF) (DUMAN, 2010; GRIEBEL & HOLMES, 2013; HO et al., 2002).

O LCE, descrito em Pellow (1985), é um modelo experimental para avaliação da ansiedade em animais, enquanto o TCA permite mensurar um possível comprometimento motor, após administração de substâncias em animais experimentais (KELLY, 1993). Nesses testes, quando os animais são posicionados nos aparelhos, eles são observados de acordo com sua atividade espontânea, o que faz destes, testes de simples execução sendo úteis na avaliação comportamental de

efeito ansiogênico/ansiolítico e de prejuízo motor (PELLOW, 1985). Em contrapartida, para a avaliação comportamental de um possível efeito do tipo depressivo ou do tipo anti-depressivo, um modelo experimental já validado e muito utilizado para esta avaliação é o teste da natação forçada, descrito por Porsolt e colaboradores (1978). Nesse teste, os animais, forçados a nadar num cilindro no qual não há saída, adotam uma postura imóvel, abandonando as tentativas de escape. É sugerido, então, que o aumento no tempo de imobilidade indica um estado de conformação à situação inicialmente aversiva, evidenciando uma possível indução a um estado depressivo em animais tratados com determinada substância (PORSOLT et al., 1978).

Apesar de diversos trabalhos indicarem uma variedade de efeitos sobre testes comportamentais induzidos pela exposição a agentes organofosforados (BRAQUENIER et al., 2010; CHEN et al., 2011; RUIZ-MUÑOZ et al., 2011), boa parte destes estudos foca em efeitos neurotóxicos sobre o cérebro em desenvolvimento. Além disso, observa-se uma variedade de respostas e tempos de tratamento nestes estudos. Apesar da existência destes estudos anteriores, permanece por ser investigada a potencialidade de alterações precoces sobre parâmetros comportamentais frente à exposição aguda ao clorpirifós. Uma vez que a intoxicação aguda com pesticidas organofosforados pode causar efeitos severos acarretando em várias alterações clínicas, tais como, convulsões, falência respiratória e até arritmias cardíacas, podendo assim resultar em anóxia cerebral, não é surpreendente que intoxicações agudas por esta classe de compostos estejam associadas com alterações sobre o sistema comportamental (MARRS, 1993).

Outro aspecto relevante e que desperta preocupação se refere às consequências provocadas pelas intoxicações por pesticidas organofosforados sobre o sistema cardiovascular. Diversos estudos clínicos evidenciam que as manifestações cardiovasculares estão comumente presentes e são potencialmente fatais em casos de envenenamento por organofosforados. Todavia, embora a manifestação da toxicidade cardíaca seja frequente (SAADEH et al., 1997), os mecanismos envolvidos nessa toxicidade ainda não estão claramente definidos (ANAND et al., 2009; ROTH et al., 1993).

Sabe-se que os efeitos observados no plano cardiovascular são resultado, em parte, dos efeitos mistos decorrentes da intoxicação por organofosforados sobre o

sistema nervoso autônomo. A estimulação dos gânglios simpáticos e parassimpáticos pela acetilcolina que se acumula nas sinapses promove importantes alterações sobre o sistema cardiovascular, provocando relevantes mudanças sobre a pressão arterial, frequência cardíaca, débito cardíaco e outros parâmetros da regulação cardiovascular (CLARK, 2006). De fato, relatos clínicos mostram que indivíduos intoxicados manifestam uma gama de sinais tais como hipertensão, hipotensão, taquicardia sinusal, bradicardia sinusal e anormalidades no eletrocardiograma. Estes sinais são variáveis de acordo com a extensão da exposição e da evolução do quadro de intoxicação (ANAND et al., 2009; SAADEH et al., 1997). Adicionalmente, algumas evidências clínicas apontam que intoxicações por agentes organofosforados podem provocar, inclusive, dano sobre o tecido cardíaco. Este dano no miocárdio foi demonstrado através de estudos envolvendo a necropsia de pacientes envenenados por organofosforados e pelo aumento significativo na atividade das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e lactato desidrogenase (LDH) observado durante o tratamento de pacientes intoxicados por estes pesticidas (CHHARBA et al., 1979; SAADEH et al., 1997). Estas enzimas, juntas, constituem importantes marcadoras de lesão no tecido cardíaco sendo usadas principalmente no diagnóstico do infarto do miocárdio (GODOY et al., 1998).

Embora esta grande variedade de sinais clínicos já identificados, o mecanismo exato envolvido nesta toxicidade cardíaca dos organofosforados não está totalmente esclarecido. De fato, Saadeh e colaboradores (1997) sugerem que a causa desta toxicidade pode estar relacionada a mais de um mecanismo, dentre os quais a hiperestimulação simpática e parassimpática, hipoxemia, acidose e, possivelmente, ação direta destes compostos sobre o miocárdio. Sendo assim, estudos buscando elucidar possíveis mecanismos envolvidos na toxicidade destes compostos se fazem necessários.

Neste sentido, muito pouco se sabe a respeito dos efeitos dos organofosforados sobre os mecanismos neurais de regulação da pressão arterial. Considerando que tais substâncias possuem ação sobre os gânglios do sistema nervoso autônomo e possivelmente sobre os núcleos centrais envolvidos nessa regulação, não é improvável que esses mecanismos estejam afetados em casos de intoxicação por esses agentes (FAITH, 2013).

O principal objetivo dos reflexos neurais de regulação da pressão arterial é o controle e manutenção da pressão arterial em níveis normais, necessários para uma

perfusão tecidual adequada. Estes mecanismos consistem na regulação a curto prazo ao fazerem ajustes rápidos e eficientes para a estabilização da pressão arterial a cada batimento cardíaco (VASQUEZ et al., 1997).

Um dos principais mecanismos neurais envolvidos na regulação da pressão arterial é o barorreflexo. Neste reflexo neural, a rápida e eficiente estabilização da pressão arterial ocorre por meio da ativação de receptores mecânicos sensíveis à elevação da pressão sanguínea, os quais são conhecidos como barorreceptores. Estes receptores estão localizados nas paredes do arco aórtico e do seio carotídeo e são responsáveis pelo ajuste, batimento a batimento, das flutuações na pressão arterial detectadas pelo seu estiramento (THOMAS, 2011; VASQUEZ et al., 1997).

A ativação dos barorreceptores promove descarga aferente transmitida até o sistema nervoso central por meio do nervo glossofaríngeo (a partir do seio da carótida) e do nervo vago (a partir da aorta). Em casos de aumento súbito da pressão arterial, a resposta eferente é a inibição da atividade simpática e estimulação da atividade parassimpática para o coração e vasos sanguíneos, o que resulta em ajuste do débito cardíaco, queda da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, redução e estabilização da pressão arterial (VASQUEZ et al., 1997).

Considerando que os barorreceptores são muito sensíveis ao estiramento do vaso sanguíneo onde estão localizados, pode-se dizer que o barorreflexo é um mecanismo de *feedback* negativo muito eficaz para ajustar as flutuações sanguíneas a partir da linha de base (THOMAS, 2011).

Outro importante mecanismo de regulação neural é representado pelos reflexos cardiopulmonares. Os receptores envolvidos na ativação destes reflexos são muito heterogêneos e podem ser ativados por mudanças na pressão de enchimento cardíaco e por agentes químicos. Esses receptores estão localizados nos átrios, ventrículos, vasos pulmonares e parênquima pulmonar, sendo que a ativação dos receptores ventriculares, mais especificamente do ventrículo esquerdo, por agentes químicos se refere ao reflexo de Bezold-Jarisch (RBJ) (VASQUEZ et al., 1997).

Caracterizado inicialmente pelos pesquisadores Von Bezold e Hirt e, posteriormente, confirmado por Jarisch, o RBJ é caracterizado pela tríade de respostas – bradicardia, hipotensão e apneia – observada após a administração de alcaloides do *veratrum* em animais experimentais (AVIADO & AVIADO, 2001). Além

destes alcaloides, sabe-se que outras substâncias são capazes de ativar este reflexo, tais como as prostaglandinas, a serotonina e a fenilbiguanida, via receptores 5-HT₃ e TRPV1 (LUPINSKI et al., 2011; VASQUEZ et al., 1997; VERBENE et al., 2003).

Após a ativação destes receptores, sinais aferentes são enviados principalmente por fibras vagais não mielinizadas do tipo C até o centro de controle cardiovascular, no sistema nervoso central. Como resposta, ocorre aumento do tono vagal para o coração e, também, inibição do tônus simpático, o que, por fim, induz bradicardia, hipotensão e apneia (VASQUEZ et al., 1997).

Apesar de ser ainda incerto qual o papel fisiológico do RBJ, estudos demonstram um aumento na sensibilidade do RBJ em animais desnervados (região sinoaórtica) tanto agudamente quanto cronicamente, sugerindo um papel fisiológico para este reflexo na regulação cardiovascular (CHIANCA & MACHADO, 1994). Em contrapartida, estudos apontam para uma importante regulação circulatória desempenhada por este reflexo em situações patológicas, como isquemia miocárdica aguda (MEYRELLES et al., 1996; ROBERTSON et al., 1985). Dados da literatura também demonstram alterações no RBJ em animais experimentais hipertensos (ARAÚJO et al., 1998; PEOTTA et al., 2001), com hipertrofia cardíaca (MEYRELLES et al., 1998; UGGERE et al., 2000) e em casos de infarto do miocárdio (LUPINSKI et al., 2011; MEYRELLES et al., 1997).

Além dos reflexos supracitados, o quimiorreflexo consiste também em mecanismo neural que participa ativamente da regulação cardiorrespiratória. Este reflexo é capaz de controlar a ventilação alveolar, relacionando a demanda metabólica de captação de O₂ e de eliminação de CO₂ com a frequência respiratória e troca gasosa nos pulmões, além de exercer também importante atividade no mecanismo de controle da pressão arterial (SCHULTZ & LI, 2007; VASQUEZ et al., 1997).

Os quimiorreceptores periféricos estão localizados nos corpúsculos carotídeos, encontrados na bifurcação da artéria carótida comum ou distribuídos em pequenos corpúsculos aórticos entre o arco aórtico e a artéria pulmonar. Em geral, os corpúsculos aórticos estão ausentes em espécies como coelho, rato e camundongo (MARSHAL, 1994). Estes receptores quimiossensíveis, em contato constante com o sangue, são capazes de responder a alterações no pH, na pressão parcial de dióxido de carbono (PCO₂) e na pressão parcial de oxigênio sanguíneos

(PO_2). Quando estes receptores são ativados, a resposta promovida é consequência da ativação primária de neurônios simpáticos e parassimpáticos, resultando em modulação cardíaca, dos vasos sanguíneos e da atividade pulmonar (THOMAS, 2011).

Em casos de redução na PO_2 e pH ou aumento da PCO_2 , os quimiorreceptores são estimulados e emitem descargas aferentes e, de forma reflexa, promovem: modulação na descarga do nervo frênico, aumento da frequência e amplitude respiratória; aumento da atividade simpática, a qual induz vasoconstrição, aumento da resistência periférica e aumento da pressão arterial; e, paradoxalmente, aumento da descarga parassimpática cardíaca, induzindo bradicardia (SPYER, 1990; THOMAS, 2011).

Vários autores têm demonstrado uma forte relação entre os ajustes mediados pelos quimiorreceptores periféricos e a hipertensão (FUKUDA et al., 1987; SOMERS et al., 1988; TRZEBSKI et al., 1982). Fletcher e colaboradores (1992) demonstraram que ratos expostos cronicamente a curtos períodos de hipóxia apresentaram aumento da pressão arterial, não sendo o mesmo efeito observado em ratos submetidos à desnervação do nervo do seio carotídeo.

Sabe-se que estes reflexos sofrem processos de adaptação em diversas doenças, tais como hipertensão, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (MEYRELLES et al., 1996, 1997; UGGERE et al., 2000). Entretanto, não se sabe ao certo se esses reflexos podem estar alterados na exposição aguda aos pesticidas organofosforados. Maretto e colaboradores (2012) mostraram em um estudo com o metamidofós, representante organofosforado, que esse composto foi capaz de causar prejuízo na resposta bradicárdica de dois importantes reflexos da regulação da pressão arterial (quimiorreflexo e reflexo de Bezold-Jarisch) em animais experimentais expostos a uma dose aguda subletal do pesticida.

Portanto, dada à relevância destes mecanismos na manutenção da pressão arterial, considerando as marcantes mudanças promovidas por intoxicações por estes agentes no plano cardiorrespiratório e considerando a evidência de que outro representante do grupo do organofosforados provocou prejuízos em dois reflexos cardiovasculares, este estudo investigou a hipótese do clorpirifós provocar alterações nos reflexos cardiovasculares após a exposição aguda a uma dose subletal.

Adicionalmente, embora sejam mais evidentes a partir da intoxicação crônica, este estudo investigou também a potencialidade do clorpirifós causar desordens comportamentais, tais como ansiedade e depressão, após exposição aguda a doses subletais em animais experimentais.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da exposição aguda a doses subletais do inseticida clorpirifós sobre os reflexos cardiovasculares, sobre a atividade de enzimas marcadoras de lesão cardíaca e sobre modelos comportamentais em animais experimentais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o efeito do tratamento agudo com uma dose subletal de clorpirifós nos níveis basais de pressão arterial média e frequência cardíaca;
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com uma dose subletal de clorpirifós sobre o quimiorreflexo, barorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch nos animais experimentais;
- Avaliar a atividade da enzima colinesterase plasmática nos animais experimentais;
- Determinar as atividades das enzimas creatina quinase fração MB (CK-MB) e desidrogenase láctica (LDH), enzimas marcadoras de lesão cardíaca, no plasma de ratos tratados com clorpirifós;
- Avaliar o efeito do tratamento agudo com doses subletais de clorpirifós no comportamento de animais experimentais submetidos a modelos de avaliação comportamental.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados nos experimentos deste estudo ratos Wistar adultos, com peso médio de aproximadamente 370 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo e mantidos em número máximo de 5 por gaiola de polipropileno, com ração e água livremente disponíveis em ambiente com controle de temperatura e luminosidade - em ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos tratamento (peso médio de $366,3 \pm 11,02$ g) e controle (peso médio de $377,6 \pm 11,2$), conforme descrição dos testes abaixo.

Todos os ensaios biológicos respeitaram as normas de proteção aos animais e os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES), Protocolos nº 013/2013 e 024/2013.

3.2 PRODUTOS QUÍMICOS

O clorpirifós [0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato] foi obtido em grau comercial (Lorsban 480 BR[®], 48% m/v, Dow Agrosiences Industrial Ltda.) e, nos dias de tratamento, diluído em solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9%) para a administração intraperitoneal (i.p.) nos animais experimentais. No intuito de evitar variações na concentração por possível evaporação de solventes, a solução de tratamento foi preparada e utilizada no mesmo dia.

A administração do inseticida foi feita com injeções únicas de 1 mL/kg de peso corporal do rato e os animais dos grupos controle receberam somente o veículo (solução fisiológica) nas mesmas condições.

3.3 TRATAMENTO

Para o tratamento, os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos de tratamento e grupo controle. Após a administração do clorpirifós nos animais dos grupos tratados, foram observados por um período de aproximadamente 4 horas quanto à presença ou ausência dos sinais clínicos característicos da intoxicação por organofosforados, tais como tremor, sialorreia, lacrimejamento, micção e diarreia, seguindo metodologia descrita por Salazar (2011). O quadro 1 exibe o modelo de relatório utilizado para o registro destes sinais durante os testes. A identificação destes sinais, juntamente com a dosagem sérica da colinesterase plasmática, colaborou com a avaliação da efetividade do tratamento em cada animal tratado em análise.

Quadro 1. Quadro para coleta de dados de ensaios de toxicidade aguda.

Parâmetros	10'	30'	45'	60'	1h 20'	1h 40'	2h	3h	4h
Contorção									
Ataxia									
Tremores									
Tetania									
Lacrimejamento									
Micção									
Diarreia									
Sialorreia									

3.4 DETERMINAÇÃO DA DOSE

Para a determinação das doses utilizadas nos ensaios cardiovasculares, enzimáticos e comportamentais deste estudo foi feito, inicialmente, um levantamento bibliográfico cujo objetivo era reunir dados sobre a utilização do clorpirifós em animais experimentais em estudos anteriores. As principais informações pesquisadas buscadas foram espécie de animal utilizada, produto comercial usado, doses administradas e volume, veículo e via de administração adotados. A partir dos

dados coletados, testes preliminares foram executados nos animais experimentais disponibilizados para o estudo, no intuito de adequar às condições locais, as doses subletais que fossem capazes de promoverem sinais clínicos e inibição considerável na atividade da acetilcolinesterase.

Foram testadas cinco doses distintas (20, 25, 30, 40 e 50 mg/kg), sendo que cada uma delas foi testada num grupo de aproximadamente 10 animais diferentes (total aproximado de 50 ratos).

Após análise das dosagens enzimáticas e dos sinais manifestados nos animais experimentais tratados com as diferentes doses do clorpirifós nos testes preliminares, foram estabelecidas as seguintes doses para os testes comportamentais e cardiovasculares:

Testes comportamentais: 20 mg/kg, 25 mg/kg e 30 mg/kg.

Testes cardiovasculares: 30 mg/kg.

3.5 ENSAIOS CARDIOVASCULARES

3.5.1 Canulação da artéria e veia femoral

Para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico de cateterização, permitindo, dessa forma, o registro de pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

A cirurgia para a inserção da cânula foi realizada 24 horas antes da administração do clorpirifós no grupo tratado e do veículo no grupo controle. A canulação foi realizada na artéria e na veia femoral: a cânula arterial permitiu o registro dos parâmetros citados, enquanto que a venosa permitiu a administração intravenosa de drogas para a ativação dos reflexos. Essa etapa possibilitou ainda a coleta de sangue para as análises das atividades de algumas enzimas descritas em seguida.

As cânulas utilizadas nesta etapa do estudo foram confeccionadas a partir de frações de tubo de polietileno PE-10 (aproximadamente 5 cm) inseridas e soldadas a frações de tubo de polietileno PE-50 (aproximadamente 18 cm). As cânulas foram

previamente preenchidas com solução fisiológica e obstruídas em uma extremidade com pinos de metal. As cânulas arteriais são distintas das cânulas venosas no pino de metal. Nesta, o pino é levemente contorcido formando um anel, o que permite a diferenciação das cânulas após a cirurgia.

Os animais foram previamente anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) e transferidos cuidadosamente para a mesa cirúrgica. Após uma pequena incisão inguinal esquerda (cerca de 1 cm de diâmetro) nos animais já anestesiados, a matriz de fibras entrelaçadas era atenciosamente limpa, permitindo a visualização do feixe vaso nervoso femoral. Em seguida, foi feito o isolamento do nervo e vasos e as cânulas foram inseridas na veia e na artéria femoral, respectivamente. Logo após, a cânula era lavada com solução salina heparinizada para evitar a formação de coágulos.

Por fim, as cânulas já inseridas e fixadas na região inguinal foram dirigidas subcutaneamente com o auxílio de um trocáter para a região mediocervical posterior, onde foram exteriorizadas e fixadas com uma linha de sutura. A parte exteriorizada das cânulas teve o seu tamanho regulado, de modo que o animal não alcançasse e a danificasse.

Após a canulação, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, para recuperação, com acesso livre à água e ração até o final dos experimentos.

3.5.2 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os animais foram tratados com o clorpirifós ou salina – grupo tratamento e grupo controle, respectivamente – aproximadamente 24 horas após o procedimento cirúrgico. Após a recuperação dos animais, um dia depois do tratamento, foram realizados os registros dos parâmetros cardiovasculares no animal acordado. Para os registros dos parâmetros cardiovasculares, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador e a um sistema de registro computadorizado, capaz de registrar a pressão arterial pulsátil do animal (PAP) (Powerlab[®], AD Instruments, Nova Zelândia). A partir desta, os valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivados pelo software do sistema (LabChart[®], AD Instruments, Nova Zelândia).

Na coleta dos valores de frequência cardíaca obtidos pelo software frente à ativação dos reflexos, foi identificada a possibilidade de discrepância, em alguns animais, entre a resposta visível no canal derivado da FC e o evento fisiológico observado no canal de PAP. Assim, tanto na avaliação do quimiorreflexo quanto na avaliação do reflexo de Bezold-Jarisch, foi processada a coleta dos dados e a análise das respostas, no modo *off line*, de duas formas: i. Contagem dos pulsos pressóricos registrados no canal de PAP ao longo de 10 segundos, a partir do início da resposta, sendo possível determinar a bradicardia obtida pela razão dos picos pressóricos em função do tempo. É importante destacar que esse tempo estabelecido, foi o mais adequado para se colher a resposta máxima observada (Apêndices I e II). ii. Coleta dos valores de FC registrados no canal derivado aplicando um filtro digital disponível neste programa (Digital Filter, na frequência de 0,2 Hz). O filtro, na frequência indicada, foi adotado por expressar com maior proximidade os dados coletados na contagem pulso a pulso da FC. As duas análises foram executadas com o objetivo de se estabelecer o controle e padronização dos possíveis métodos de análise dos registros cardiovasculares no Laboratório de Investigação Fármaco-Toxicológica da Função Cardiovascular.

3.5.3 Avaliação do Quimiorreflexo

A partir da administração intravenosa de solução aquosa de cianeto de potássio (KCN), segundo o método descrito por Franchini e Krieger (1993), foram registradas as respostas hipertensoras e bradicárdicas promovidas por meio da ativação dos quimiorreceptores periféricos.

Foram administradas as doses de 10, 20, 40 e 80 µg em cada rato, de forma aleatória, aguardando-se a estabilização dos parâmetros medidos em intervalo mínimo de 10 minutos entre as doses. A ativação deste reflexo foi avaliada a partir das respostas registradas após a administração do KCN: diminuição da frequência cardíaca e aumento da pressão média arterial.

3.5.4 Avaliação do Reflexo Bezold-Jarisch

A análise do reflexo Bezold-Jarisch (RBJ) neste estudo foi feita a partir da observação das respostas bradicárdica e hipotensora máximas induzidas pela fenilbiguanida, de acordo com o método descrito em Uggere et al. (2000) e Franquni et al. (2013). Neste teste, a partir dos parâmetros cardiovasculares estáveis, o reflexo foi ativado quimicamente pela administração intravenosa de cinco doses aleatórias de fenilbiguanida: 1,5; 3,0; 6,0; 12 e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal dos ratos. O intervalo mínimo entre as doses era de 10 minutos ou o tempo necessário para que os níveis de PAM e FC retornassem a valores próximos aos basais. A sensibilidade deste reflexo foi identificada a partir de uma redução dose-dependente da frequência cardíaca e da pressão arterial média.

3.5.5 Avaliação do Barorreflexo

A avaliação do barorreflexo foi feita por dois métodos distintos: por doses aleatórias e por infusão. O barorreflexo por infusão foi testado de acordo com o método descrito em Resstel e colaboradores (2004). A estimulação dos barorreceptores arteriais foi feita a partir da administração intravenosa, em fluxo constante, de fenilefrina (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e de nitroprusseto de sódio (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$), para indução de bradicardia e taquicardia reflexas, respectivamente. A infusão foi realizada utilizando-se uma bomba calibrada (fluxos de 0,1 a 0,2 mL/min), de modo que as infusões promovessem em um período de 25 a 30 segundos variações de pressão máximas na amplitude de $\pm 40\text{-}50$ mmHg.

Os registros cardiovasculares obtidos após a infusão das drogas citadas foram analisados para a avaliação da atividade do barorreflexo. Os valores de variação da FC foram determinados e relacionados às correspondentes variações específicas de PAM. Os valores pareados dessas variações foram utilizados para a plotagem e geração de curvas sigmóides ou de regressão linear, permitindo a determinação da atividade do barorreflexo para cada rato.

O outro método utilizado para a avaliação do barorreflexo foi executado de acordo com o descrito em Head & McCarty (1987). Neste método, a estimulação dos barorreceptores arteriais foi realizada a partir da administração intravenosa de doses

únicas aleatórias do vasoconstritor fenilefrina (de 0,05 a 3 µg) e de doses únicas aleatórias do vasodilatador nitroprusseto de sódio (de 0,1 a 5 µg/kg) para indução de bradicardia e taquicardia reflexas, respectivamente. As curvas sigmóides foram geradas para cada rato a partir da plotagem dos valores de PAM e FC pareados, para a avaliação da atividade do barorreflexo.

Cada curva sigmoide foi caracterizada por quatro parâmetros (HEAD & MCCARTY, 1987): *plateau* de bradicardia (PB) e de taquicardia (PT); faixa de atuação do barorreflexo (*range*), representada pela diferença entre os *plateaus* (PT-PB); pressão arterial no ponto de inflexão da curva (PA50), que é o valor da pressão quando a variação da FC é de 50% do *range*; e ganho médio (G), que é a inclinação média da curva.

O Barorreflexo foi avaliado por estes dois métodos com o objetivo de estabelecer o controle e padronização dos possíveis modos de análise deste reflexo no Laboratório de Investigação Fármaco-Toxicológica da Função Cardiovascular.

3.6 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

Foram avaliadas, neste estudo, as atividades de três enzimas no plasma dos animais tratados: a colinesterase plasmática (ChE), a creatina quinase fração MB (CK-MB) e a desidrogenase láctica (LDH).

As dosagens foram feitas a partir de amostras de sangue coletadas nos animais antes e após o tratamento, através dos cateteres inseridos nos animais na etapa de canulação. Dessa forma, foi possível estabelecer a comparação individualizada na atividade das enzimas nos dois momentos, antes e após o tratamento.

O plasma foi obtido por centrifugação a 1.792 G, por 10 minutos, a 4°C e armazenado até o momento da dosagem, em temperatura e tempo adequados conforme descritos para cada enzima.

Os métodos utilizados seguiram as etapas indicadas nos kits de determinação de cada enzima.

3.6.1 Determinação da atividade da Colinesterase Plasmática (ChE)

A atividade colinesterásica foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Dietz et al. (1977), com modificações, utilizando o kit para determinação de colinesterase da marca Bioclin[®] (Minas Gerais, Brasil). A inibição na atividade dessa enzima permitiu a avaliação da efetividade do tratamento com o inseticida clorpirifós.

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da colinesterase sobre a butiriltiocolina, a qual é hidrolisada em tiocolina e butirato. Em seguida, a tiocolina reduz o hexacianoferrato (III), de cor amarela, em hexacianoferrato (II), que é incolor. O decréscimo da absorvância é medido a 405 nm.

No teste, foram adicionados a um tubo de ensaio 10 µL da amostra e 500 µL do reagente 1, composto por tampão reagente: pirofosfato pH 7,60 e hexacianoferrato (III) de potássio. Em outro tubo – reagente branco – a amostra foi substituída por 10 µL de água destilada.

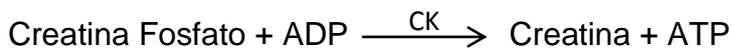
Após misturar e incubar a 37°C os tubos por aproximadamente 3 minutos em banho-maria, foram adicionados em ambos 250 µL do reagente 2, o substrato butiriltiocolina. Por fim, os tubos foram incubados por mais 2 minutos e a leitura colorimétrica foi realizada em espectrofotômetro termostizado (37° C) a 405 nm. A mudança de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) foi medida após 1, 2 e 3 minutos exatos.

O decréscimo na absorvância foi mensurado à medida do consumo do hexacianoferrato (III), amarelo, e produção de hexacianoferrato (II), incolor, proporcionais à atividade enzimática da amostra testada. As dosagens foram feitas em duplicata e a atividade expressa em U/L (uma U de colinesterase corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de substrato/minuto/mL de plasma, a 37°C).

3.6.2 Determinação da atividade da Creatina Quinase Fração MB (CK-MB)

O teste para a determinação da CK-MB foi executado de acordo com o método cinético otimizado por Szasz e colaboradores (1976), utilizando-se do kit CK-MB cinético Bioclin[®] (Minas Gerais, Brasil).

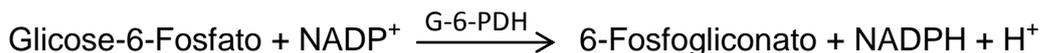
O princípio do método se baseia numa sequência de reações:



(1) fosforilação da adenosina difosfato (ADP) pela transferência de um grupo fosforila da creatina fosfato, com formação de adenosina trifosfato (ATP) e creatina – catalisada pela creatina quinase (CK);



(2) reação da glicose com o ATP formado, produzindo glicose-6-fosfato e ADP – catalisada pela hidroxiquinase (HK);



(3) oxidação da glicose-6-fosfato pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase NADP+ dependente (G-6-PDH) formando 6-fosfogliconato e NADPH.

A velocidade de redução do NADP⁺ a NADPH é proporcional à atividade da CK na amostra. A quantidade de NADPH formado é medida em espectrofotômetro termostizado a 340 nm.

Para início do teste, foi preparado o reagente de trabalho, a partir da mistura entre o reagente 1 (enzima-substrato) e reagente 2 (tampão), numa proporção de 4:1. O reagente de trabalho é estável por 15 dias em temperaturas entre 2° e 8° C.

Tabela 2. Reagente 01 do Kit CK-MB Bioclin®. * inibidores da adenilato cinase, enzima encontrada em concentração razoavelmente alta em todos os tecidos, inclusive as hemácias.

Reagentes	Concentração
ADP	2 mmol/L
AMP*	5 mmol/L
Creatina Fosfato	30 mmol/L
Diadenosina pentafofosfato*	10 mmol/L
Glicose-6-fosfato desidrogenase	2000 U/L

Tabela 3. Reagente 02 do Kit CK-MB Bioclin[®]. O EDTA funciona como um quelante do Ca^{+2} , o que é importante para eliminar esse íon que compete com o Mg^{+2} (ativador da CK). Além do Mg^{+2} , a N-acetilcisteína também contribui para a ativação dessa enzima. O anticorpo monoclonal específico para a fração M inibe completamente a atividade enzimática da CK-MM e a fração M da CK-MB.

Reagentes	Concentração
Acetato de Imidazol (pH 6,7)	100 mmol/L
Acetato de Magnésio	10 mmol/L
Anticorpo policlonal Anti CK-MB	Quantidade suficiente para inibir até 2000 U/L de CK-MB
EDTA	2mmol/L
Glicose	20 mmol/L
Hexoquinase	3500 U/L
N-acetilcisteína	20 mmol/L
NADP+	2mmol/L

Em seguida, foram adicionados 500 μL desse reagente e 20 μL da amostra (diluída em uma proporção de 1:10 em salina) a um tubo de ensaio, o qual foi imediatamente homogeneizado e incubado a 37 °C, em banho-maria, por 5 minutos. O conteúdo do tubo foi transferido para uma cubeta termostaticada a 37°C e sua absorbância medida a 340 nm em espectrofotômetro termostaticado, minuto a minuto (1, 2 e 3 minutos).

O teste foi realizado em duplicata e a atividade expressa em U/L. O resultado foi multiplicado por 10, considerando a diluição necessária na etapa anterior. E, tendo em vista a presença do anticorpo específico contra a fração M e que as frações M e B apresentam atividades similares, o valor obtido foi, ainda, multiplicado por 2, para expressão da atividade enzimática da CK-MB.

3.6.3 Determinação da atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)

O teste para a mensuração da atividade da LDH foi executado de acordo com o método enzimático de Bergemeyer (1974), utilizando-se do kit Desidrogenase Láctica UV Bioclin[®] (Minas Gerais, Brasil).

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da LDH sobre a redução do piruvato com o NADH, obtendo-se lactato e NAD^+ . Determina-se a concentração catalítica de acordo com a velocidade de decomposição do NADH, medida a partir da queda da absorvidade a 340 nm.

Para início do teste, foi preparado o reagente de trabalho a partir da mistura entre o reagente 1 (piruvato) e reagente 2 (NADH). O reagente de trabalho é estável por 14 dias em temperaturas entre 2° e 8° C. Em seguida, foram adicionados 500 μL desse reagente e 10 μL da amostra (diluída numa proporção de 1:20 em salina) a uma cubeta termostaticada a 37° C, incubando por 1 minuto. Fez-se, então, a leitura inicial e nos minutos seguintes (1, 2 e 3 minutos após).

O teste foi executado em duplicata e, a partir da média das diferenças de absorbância por minuto ($\Delta A/\text{min}$), a atividade foi expressa em U/L. O resultado foi multiplicado por 20, considerando a diluição necessária na etapa anterior.

3.7 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Os animais experimentais dos grupos tratados com clorpirifós (20, 25 e 30 mg/kg) e do grupo controle (solução salina) foram avaliados em três testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (TCA) e nado forçado (TNF), 24 horas após o tratamento. No caso do TCA, o teste foi repetido 48 h e 72 h após o tratamento.

3.7.1 Teste do campo aberto

O instrumento utilizado neste teste consiste em uma caixa quadrangular de madeira com piso branco de 1 m² de área, delimitado por 4 paredes de 30 cm de altura, que restringem a fuga e dividido visualmente por linhas pretas em 25 quadrados de mesmo tamanho (lado com 20 cm) – 9 centrais e 16 periféricos.

O teste é iniciado quando os animais são posicionados no campo interno do aparelho e, durante 5 minutos, podem explorá-lo livremente. O parâmetro observado

foi locomoção, definida como número de cruzamentos através das linhas pretas delimitadas no aparelho do campo aberto (PRUT & BELZUNG, 2003).

Esse teste é utilizado principalmente para mensurar o comportamento locomotor e exploratório em animais experimentais, embora também evidencie possível nível de ansiedade nestes. Animais com níveis elevados de ansiedade tendem a ter baixa atividade motora e grande preferência pela periferia do campo aberto.

O TCA foi executado 24, 48 e 72 horas após o tratamento dos animais do grupo controle e do grupo tratado, para análise temporal dos possíveis efeitos observados nesse teste. Após os 5 minutos de teste no campo aberto, os animais foram imediatamente testados no LCE.

3.7.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O LCE foi executado de acordo com método descrito em Pellow e colaboradores (1985) e consiste em um aparelho com dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), dispostos perpendicularmente de tal forma que os dois braços abertos se encontram de lados opostos entre si. A junção entre os quatro braços forma uma região central neutra, com medida de 5 x 5 cm e a plataforma é elevada a uma altura aproximada de 50 cm.

Os animais em teste foram posicionados na região neutra e, durante 5 minutos, foram observados enquanto exploravam espontaneamente o aparelho. Os parâmetros verificados neste teste são número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados, assim como número total de entradas em ambos.

Os ratos tendem a preferir pela permanência nos braços fechados do labirinto, evidenciando uma possível aversão ao braço aberto devido ao medo ou ansiedade na exploração deste (PELLOW et al., 1985).

O teste do LCE foi executado imediatamente após o animal controle ou tratado ser testado no campo aberto. De acordo com Pellow e colaboradores (1985), a exposição prévia dos animais ao campo aberto aumenta, no geral, a exploração nos braços abertos do LCE. Dessa forma, a maior exploração do braço aberto

permitiria uma identificação mais sensível de possíveis diferenças estatísticas entre os animais dos distintos grupos.

3.7.3 Teste do nado forçado

O TNF foi inicialmente proposto por Polsolt et al (1977) e modificado posteriormente por Detke et al (1995). Inicialmente, na fase de pré-exposição, os animais em teste foram colocados em um cilindro com água em quantidade suficiente para que o animal não conseguisse apoiar as patas no fundo ou escapar e eram forçados a nadar por 15 minutos. Um dia após a primeira etapa, cada animal foi forçado a nadar novamente no mesmo cilindro por 5 minutos na sessão teste.

Nesse experimento, o parâmetro avaliado foi o tempo de imobilidade, definido quando o animal cessa todos os movimentos, exceto aqueles necessários para a sobrevivência (como manter a cabeça fora da água). A redução no tempo de imobilidade pode ser indicativo de possível efeito tipo antidepressivo da substância administrada (BORSINI & MELI, 1988), enquanto que o aumento do tempo é considerado um efeito tipo depressivo induzido por diversas condições, como estresse crônico (RYGULA et al, 2006), inflamação (O'CONNOR et al, 2009) e exposição a drogas (GETACHEW et al, 2008).

3.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.8.1 Ensaio cardiovasculares

Os testes no plano cardiovascular foram executados de acordo com o esquema apresentado na figura 1.

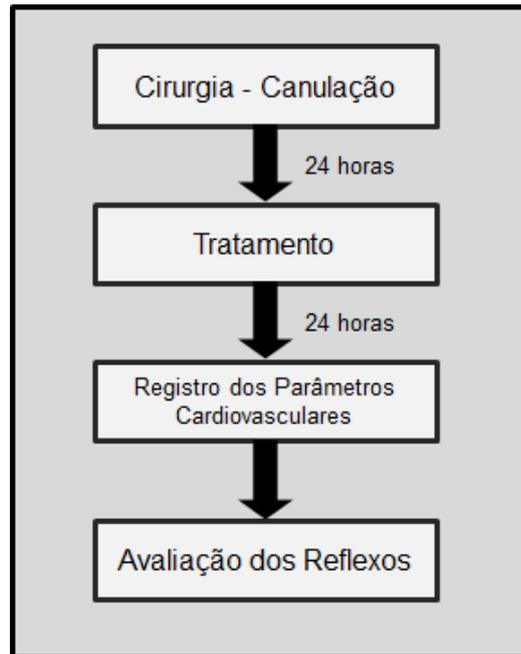


Figura 1. Etapas de execução dos ensaios cardiovasculares.

Neste estudo, a avaliação do efeito da intoxicação por clorpirifós sobre cada reflexo foi feito numa amostra de 10 ratos tratados com uma dose aguda subletal do organofosforado (clorpirifós 30 mg/kg). Dada à agressividade no plano fisiológico induzida pelo tratamento com organofosforado, ainda que com uma dose subletal, cada animal foi submetido à avaliação de apenas um reflexo. Dessa forma, cada reflexo demandou também um grupo controle distinto com o mesmo número de animais experimentais (n=10).

3.8.2 Dosagens enzimáticas

As atividades das enzimas colinesterase plasmática (ChE), creatina quinase fração MB (CK-MB) e desidrogenase láctica (LDH) no plasma dos animais tratados com clorpirifós foram dosadas de acordo com as etapas descritas na figura 2.

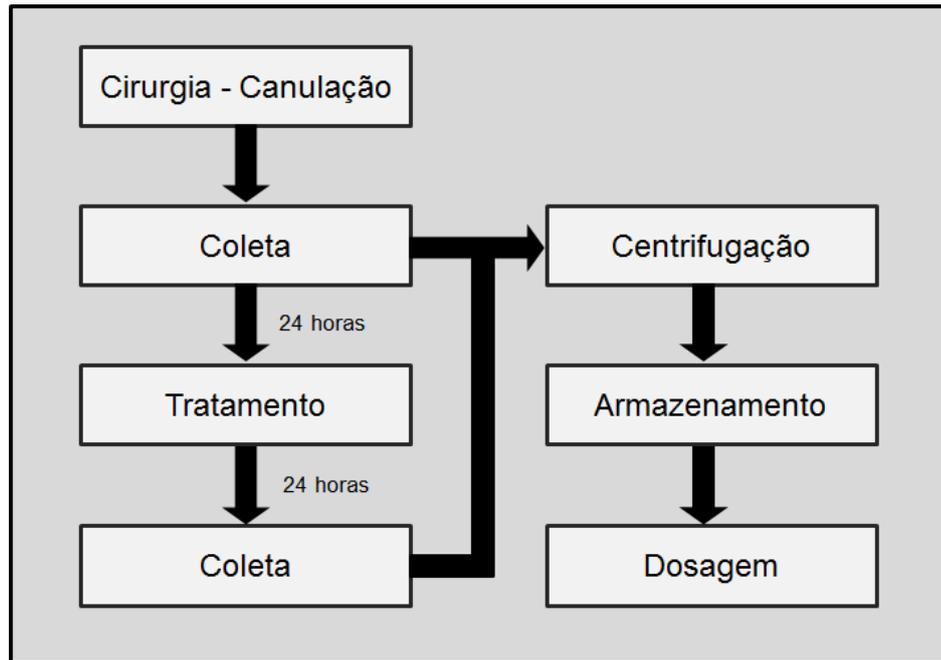


Figura 2. Etapas de execução das dosagens enzimáticas.

Os animais utilizados para obtenção de amostras para as dosagens enzimáticas foram os mesmos submetidos aos ensaios cardiovasculares. Tendo em vista o possível efeito que a diminuição do volume sanguíneo do animal poderia causar no sistema cardiovascular e conseqüentemente na avaliação dos reflexos, o volume diário de sangue coletado em cada animal não ultrapassou a quantidade máxima de 0,2 mL. Este valor representou volume menor que 1% da quantidade total média de sangue de um rato adulto, conforme orientação constante no Manual de utilização de animais da FIOCRUZ (2008).

As atividades enzimáticas foram testadas nas amostras que forneceram plasma sem hemólise e em quantidade suficiente para alíquotas. Os demais plasmas obtidos, os quais não se adequaram nos parâmetros para as dosagens enzimáticas, foram descartados.

3.8.3 Ensaios comportamentais

Para os testes comportamentais, os animais foram divididos em quatro distintos grupos: um grupo controle e três grupos tratados, para cada teste. Os grupos tratados receberam doses distintas do pesticida, permitindo a avaliação do

efeito de três diferentes doses do clorpirifós sobre o comportamento dos animais experimentais (20, 25 e 30 mg/kg).

Os animais do grupo controle e dos grupos tratados foram avaliados em três testes comportamentais: labirinto em cruz elevado (LCE), campo aberto (TCA) e nado forçado (TNF), com início aproximadamente 24 horas após o tratamento.

3.8.3.1 Teste do campo aberto (TCA) e labirinto em cruz elevado (LCE)

O TCA foi iniciado aproximadamente 24 horas após o tratamento dos animais dos grupos controle (n=10) e dos grupos tratados (n=10, para cada dose). Após os 5 minutos de teste no campo aberto, os animais eram levados imediatamente para o aparelho do teste do LCE.

A figura 3 indica o esquema de realização dos testes comportamentais supracitados.

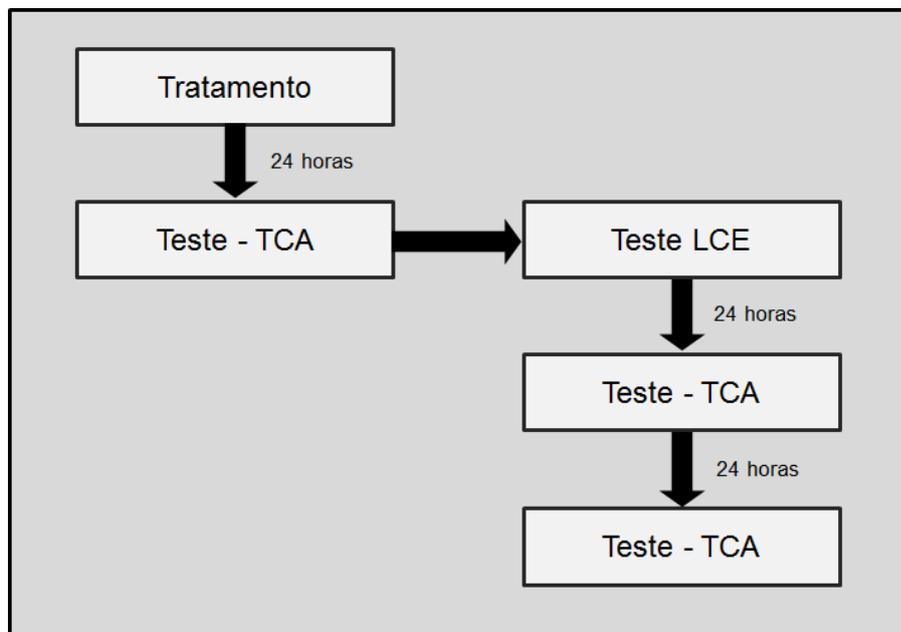


Figura 3. Etapas de execução dos testes comportamentais labirinto em cruz elevado (LCE) e teste do campo aberto (TCA).

3.8.3.2 Teste do nado forçado

O TNF foi conduzido de acordo com o esquema da figura 4. O TNF foi iniciado com a pré-exposição dos ratos ao aparelho utilizado no teste e, após nadarem por 15 minutos, estes eram imediatamente tratados com o veículo (grupo controle, n=15) ou com uma das doses de clorpirifós (grupos tratados, n=15 para cada dose). Aproximadamente 24 h após o treino e o tratamento, os animais foram avaliados individualmente durante os 5 minutos do teste.

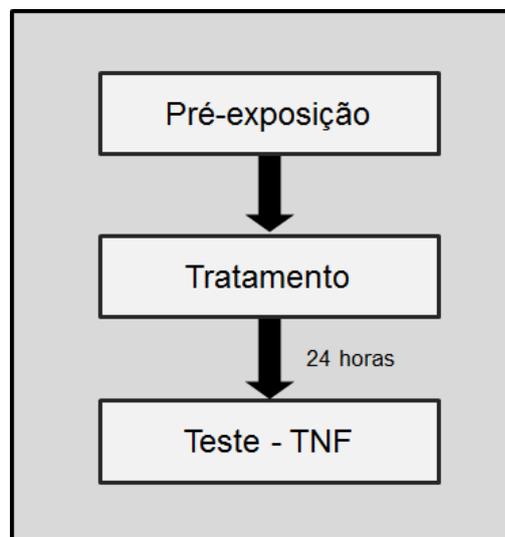


Figura 4. Etapas de execução do teste do nado forçado.

Os animais utilizados no TNF foram diferentes daqueles utilizados nos testes comportamentais anteriormente citados (LCE e TCA), uma vez que os parâmetros comportamentais avaliados em cada um dos testes podem ser alterados caso o animal testado seja exposto a estresse e a situações diferentes das características de cada teste, podendo inclusive gerar resultados não confiáveis.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos parâmetros de acompanhamento da toxicidade aguda foi feito o teste do Qui quadrado de Pearson. Para a avaliação dos valores hemodinâmicos basais e do barorreflexo foi utilizado o teste *t*-Student. As análises das atividades enzimáticas, do quimiorreflexo, do RBJ e do TCA foram feitas a

análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas com análise *Post-Hoc* pelo teste de Bonferroni, quando apropriado. Para os dados do LCE e do TNF, foi feita uma ANOVA de uma via com análise *Post-Hoc* pelo teste de Dunnett. O nível de significância estatística foi fixado para $p < 0,05$. As análises foram realizadas nos softwares IBM SPSS Statistics® (versão 20.0) e GraphPad Prism® (versão 5.0). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DA TOXICIDADE

A tabela 4 apresenta os resultados da avaliação da toxicidade aguda nos animais tratados com salina e clorpirifós. Conforme descrito nos métodos, estes foram avaliados quanto à manifestação ou não de 7 diferentes parâmetros por um período de 4 horas após o tratamento. A frequência de manifestação de cada parâmetro e o tempo médio para seu início estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Frequência de manifestação, em porcentagem, e tempo de latência, em minutos, para início da observação dos parâmetros avaliados durante o teste de acompanhamento da toxicidade aguda nos animais após o tratamento com salina (CON, n=40) ou clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=40). Teste do Qui-Quadrado de Pearson (X^2), **p<0,01 quando comparados com o grupo controle.

Parâmetro	CONTROLE		TRATADO	
	Manifestação (%)	Tempo de latência (min)	Manifestação (%)	Tempo de latência (min)
Contorção	0	-	7,5	180 ± 42,43
Ataxia	0	-	70 **	94,5 ± 7,3
Tremor	0	-	87,5 **	65,4 ± 4,68
Tetania	0	-	25 **	148 ± 18,9
Lacrimejamento	0	-	22,5 **	127,2 ± 24,93
Micção/Diarreia	25	111,4 ± 24,78	95 **	54,74 ± 7,9
Sialorreia	0	-	95 **	64,8 ± 4,73

Observa-se que o tratamento com o clorpirifós foi capaz de manifestar todos os sinais avaliados em alguma parcela dos animais expostos ao organofosforado, ao contrário do grupo controle que manifestou somente micção e diarreia em 25% dos animais tratados com salina. Os parâmetros mais evidentes e com maior frequência de manifestação no grupo tratado foram, em ordem decrescente, micção/diarreia ($X^2=40,833$), sialorreia ($X^2=72,381$), tremor ($X^2=62,22$) e ataxia ($X^2=43,07$), representando, respectivamente, 95%, 95%, 87,5% e 70% dos animais avaliados neste grupo (p<0,01). Em menor frequência, os parâmetros tetania ($X^2=11,429$) e lacrimejamento ($X^2=10,141$) também apresentaram evidente manifestação no grupo

tratado com o organofosforado ($p < 0,01$). De todos os parâmetros avaliados no grupo clorpirifós 30 mg/kg, somente o de contorção ($X^2=3,177$) não atingiu diferença estatisticamente significativa quando comparado com os animais do grupo controle ($p > 0,05$).

Em relação à latência média para início da observação do sinal, novamente os parâmetros micção/diarreia, sialorreia, tremor e ataxia apresentaram, nessa ordem, os menores valores. Ou seja, para os animais tratados com o clorpirifós, estes foram os sinais mais frequentes e com menor tempo necessário para sua manifestação após a administração do organofosforado.

4.2 ENSAIOS CARDIOVASCULARES

4.2.1 Dados Hemodinâmicos

Os resultados obtidos da medida da PAM e FC basais avaliadas em ratos tratados com salina (grupo controle, $n=30$) ou com clorpirifós 30 mg/kg (grupo tratado, $n=30$), aproximadamente 24 horas após o tratamento, são mostrados na tabela abaixo. Os parâmetros hemodinâmicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados.

Tabela 5. Valores de Pressão Média basal e Frequência cardíaca basal dos animais tratados com salina ou com clorpirifós 30 mg/kg. Teste *t*-Student; PAM ($F_{(1,58)}=0,41$; $t=-0,507$; $p > 0,05$); FC ($t=-1,933$; $p > 0,05$).

Dados hemodinâmicos	CON	CPF
Pressão Arterial Média basal (mmHg)	117,8 ± 1,70	116,6 ± 1,74
Frequência Cardíaca basal (bpm)	339,1 ± 5,81	322,0 ± 6,67

4.2.2 Avaliação do Quimiorreflexo

A figura 5 apresenta um traçado típico com as respostas de PAP, PAM e FC obtidas frente à ativação do quimiorreflexo com diferentes doses de KCN em animais tratados com clorpirifós (tratado) e com salina (controle).

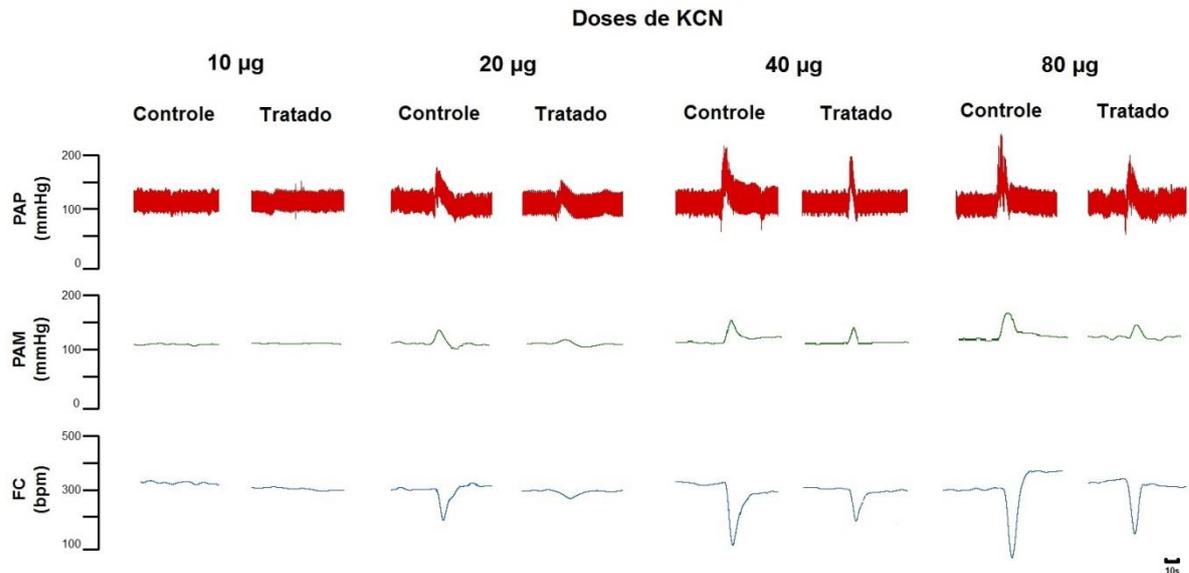


Figura 5. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle (salina) e tratado (clorpirifós 30 mg/kg) mostrando as respostas na PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) para as quatro doses de KCN administradas durante a ativação do quimiorreflexo.

A figura 6 mostra os dados coletados dos registros cardiovasculares com o uso do filtro digital, conforme descrito nos métodos, após a ativação do quimiorreflexo com doses crescentes de cianeto de potássio em todos os animais do grupo tratado com o inseticida clorpirifós ($n=10$) e salina ($n=10$). As diferentes doses de KCN induziram respostas de diferentes magnitudes na PAM ($F_{(3,18)}=127,6$; $p<0,0001$). O tratamento com clorpirifós induziu alterações significativas na resposta pressora do quimiorreflexo, representada pela diminuição da resposta hipertensora nas doses testadas ($F_{(1,18)}=30,21$; $p<0,0001$), quando comparada com o grupo controle (figura 5 e figura 6, painel A). A análise *Post-Hoc* desses dados permitiu observar que a diferença estatisticamente significante para a resposta pressora nos animais tratados com clorpirifós foi encontrada nas doses de 20 ($p<0,001$), 40 ($p<0,05$) e 80 μg ($p<0,001$) quando comparadas ao grupo controle.

Da mesma forma, as doses de KCN induziram diferentes respostas na frequência cardíaca ($F_{(3,18)}=168,5$; $p<0,0001$) e as respostas bradicárdicas do quimiorreflexo observadas foram significativamente reduzidas nos animais tratados com o agente organofosforado, quando comparadas com as respostas observadas frente à ativação com as mesmas doses no grupo controle ($F_{(1,18)}=13,84$, $p=0,0016$) (figura 5 e figura 6, painel B). A análise *Post-Hoc* desses dados mostrou que a diferença estatística para a resposta na frequência cardíaca nos animais tratados

com clorpirifós foi observada apenas nas doses de 20 ($p<0,001$), 40 ($p<0,05$) e 80 μg ($p<0,05$) quando comparadas ao grupo controle.

Vale ressaltar que a dose de 10 μg não apresentou diferença estatística significativa, quando comparadas com o grupo controle, para a resposta na pressão ($p>0,05$) e na frequência cardíaca ($p>0,05$).

As respostas obtidas pela contagem dos pulsos pressóricos coincidem com os dados colhidos com filtro digital, conforme pode ser conferido no Apêndice I.

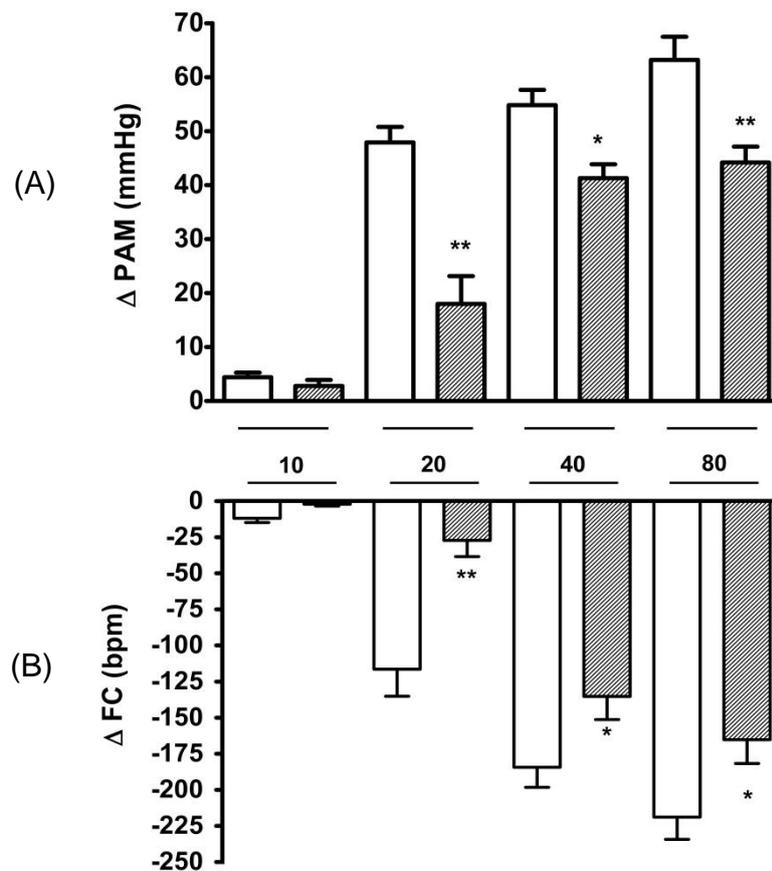


Figura 6. Variação de pressão arterial média (A) e de frequência cardíaca (B) após ativação do quimiorreflexo por meio da administração de doses crescentes de KCN (10, 20, 40 e 80 μg) em animais tratados com salina (CON, $n=10$, barras brancas) e com clorpirifós 30 mg/kg (CPF, $n=10$, barras hachuradas). Os dados representados foram colhidos aplicando-se o Digital Filter (0,2 Hz, LabChart®). * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparados com o grupo controle.

4.2.3 Avaliação do Reflexo de Bezold-Jarisch

Um traçado típico ilustrando as respostas cardiovasculares obtidas frente à ativação do RBJ em animais tratados com clorpirifós (tratado) e salina (controle) é representado na figura 7.

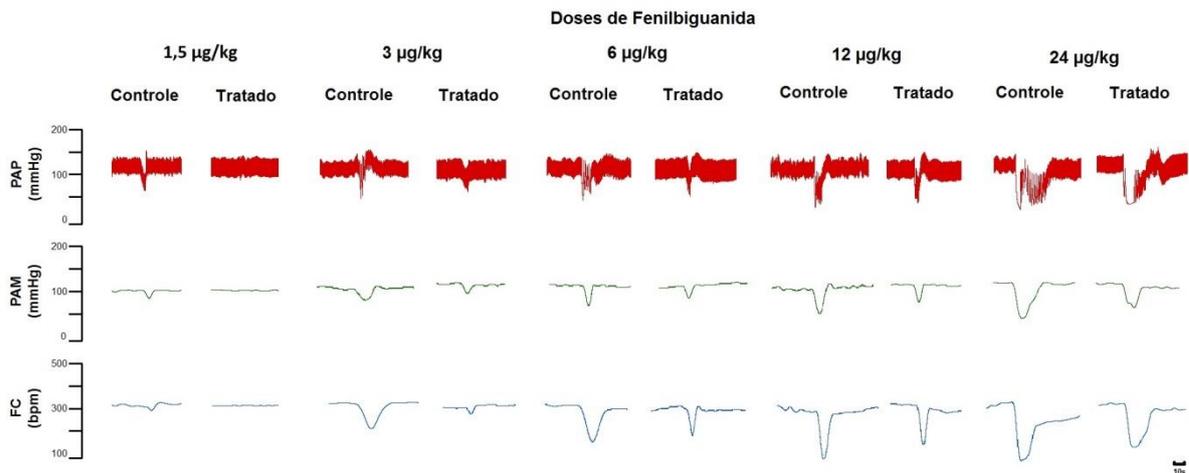


Figura 7. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle (salina) e tratado (clorpirifós 30 mg/kg) mostrando as respostas na PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) para as cinco doses de PBG administradas durante a ativação do RBJ.

A figura 8 representa os valores médios dos coletados dos registros cardiovasculares com o uso do filtro digital, conforme descrito nos métodos, nos animais submetidos à ativação do RBJ. Os dados estão expressos em valores de variação da pressão arterial média (mmHg) e da frequência cardíaca (bpm) após a administração de doses aleatórias de fenilbiguanida. As cinco doses de fenilbiguanida induziram diferentes respostas na PAM dos animais testados ($F_{(4,18)}=96,95$, $p<0,0001$). Adicionalmente, pode-se observar que o tratamento com o clorpirifós diminuiu significativamente as respostas hipotensoras induzidas pela administração de fenilbiguanida, quando comparadas com as respostas observadas nos animais do grupo controle ($F_{(1,18)}=12,63$, $p=0,0023$) (figura 7 e figura 8, painel A). A análise *Post-Hoc* desses dados mostrou que a diferença estatística para a resposta na PAM dos animais tratados em relação aos controles foi observada apenas nas doses de 1,5 ($p<0,01$) e 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0,05$). Para as demais doses não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$, para as doses de 6, 12 e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$), embora seja possível observar também uma tendência de redução na resposta.

Para a resposta bradicárdica, os dados indicam que as diferentes doses de fenilbiguanida promoveram diferentes respostas na variação da FC ($F_{(4,18)}=260,5$, $p<0,0001$). Da mesma forma, a resposta bradicárdica induzida pela administração de fenilbiguanida na ativação do RBJ para os animais tratados com clorpirifós foi

significativamente menor quando comparada com o grupo controle ($F_{(1,18)}=19,26$, $p=0,0004$) (figura 7 e figura 8, painel B).

A análise *Post-Hoc* desses dados mostrou que a diferença estatística para a resposta na PAM dos animais tratados em relação aos controle foi observada apenas nas doses de 1,5 ($p<0,001$), 3 ($p<0,05$), 12 ($p<0,05$) e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($p<0,001$). Para a dose de 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, também foi observada uma tendência de redução nos animais do grupo clorpirifós ainda que a significância estatística não tenha sido atingida ($p>0,05$).

As respostas obtidas pela contagem dos pulsos pressóricos coincidem com os dados colhidos na análise com o filtro digital, conforme pode ser conferido nos dados constantes do Apêndice II.

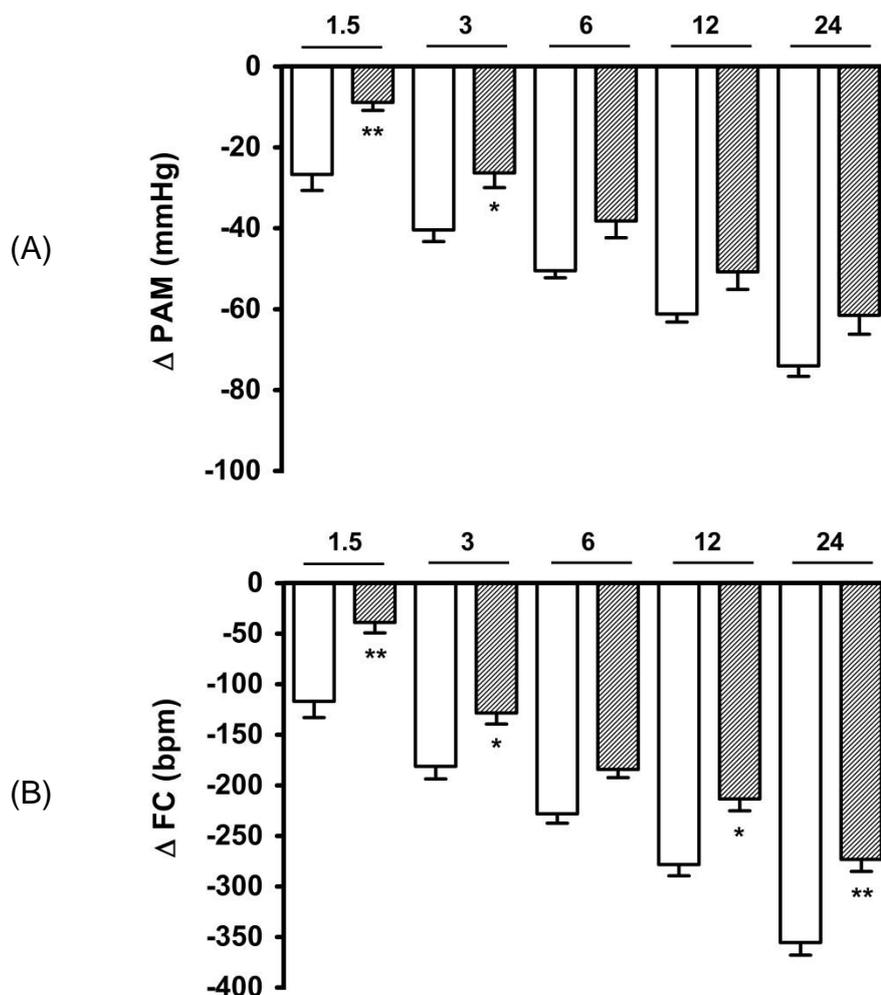


Figura 8. Variação de pressão arterial média (A) e de frequência cardíaca (B), após a ativação do RBJ por meio da administração de doses aleatórias de fenilbiguanida (1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em animais tratados com salina (CON, $n=10$, barras brancas) e com clorpirifós 30 mg/kg (CPF, $n=10$, barras hachuradas). Os dados representados foram colhidos aplicando-se o Digital Filter (0,2 Hz, LabChart®) * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparados com o grupo controle.

A análise dos dados obtidos na pressão arterial diastólica (mmHg) pela ativação do RBJ mostram que as diferentes doses de PBG induziram respostas de diferentes magnitudes na PAD ($F_{(4,18)}=106,2$, $p<0,0001$) e que o tratamento com clorpirifós diminuiu significativamente as resposta hipotensoras frente a administração de PBG ($F_{(1,18)}=6,325$, $p=0,0216$). A análise *Post Hoc* de Bonferroni mostrou que a diferença foi estatisticamente significativa apenas na dose de 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CON = $-24,8 \pm 3,25$ / CPF = $-5,4 \pm 2,16$; $p<0,01$) quando comparadas com as respostas observadas nos animais do grupo controle. Todavia, uma tendência de redução também pode ser observada para as demais doses testadas, 3 (CON = $-35,4 \pm 2,57$ / CPF = $-23,1 \pm 3,46$; $p>0,05$), 6 (CON = $-44,7 \pm 2,66$ / CPF = $-37,8 \pm 2,66$; $p>0,05$), 12 (CON = $-54,7 \pm 2,86$ / CPF = $-51,7 \pm 4,77$; $p>0,05$) e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (CON = $-69,4 \pm 2,79$ / CPF = $-62,6 \pm 5,67$; $p>0,05$), quando comparadas com as respostas observadas nos animais do grupo controle.

4.2.4 Avaliação do Barorreflexo

As respostas típicas observadas na PAP, PAM e FC dos animais submetidos à ativação do barorreflexo cardíaco por infusão são apresentadas na figura 9.

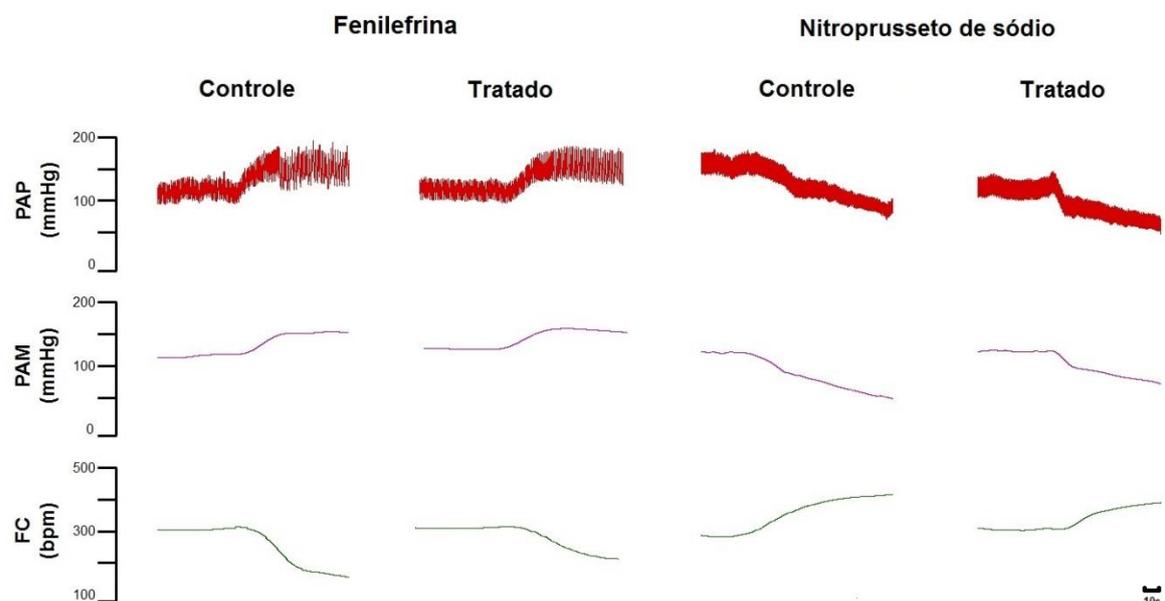


Figura 9. Registros típicos de animais representativos dos grupos controle (salina) e tratado (clorpirifós 30 mg/kg) mostrando as respostas na PAP (mmHg), PAM (mmHg) e FC (bpm) durante a ativação do barorreflexo cardíaco por infusão de fenilefrina e nitroprusseto.

O tratamento com uma dose aguda subletal do clorpirifós foi capaz de promover significativas mudanças na resposta do barorreflexo induzida por infusão de drogas vasoativas nos animais tratados quando comparados com o grupo controle. As curvas sigmóides obtidas nos dois grupos são apresentadas na figura 10 e os parâmetros avaliados constam na tabela 6.

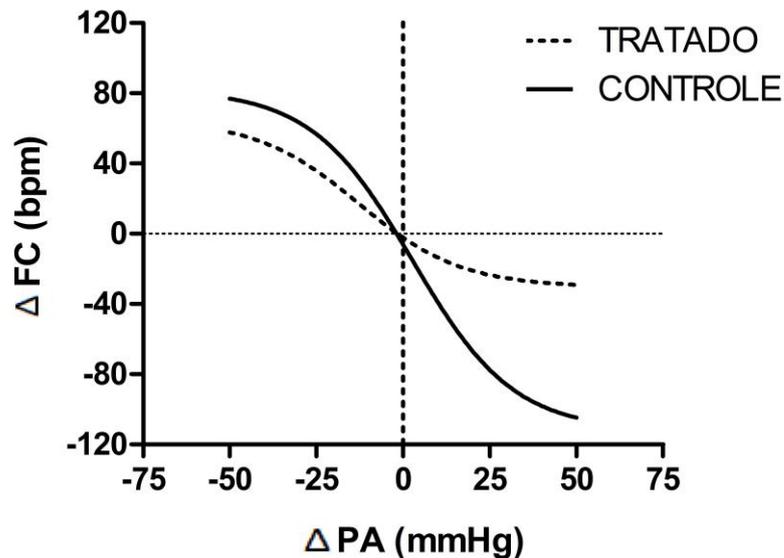


Figura 10. Curvas sigmóides obtidas após avaliação do barorreflexo por infusão, correlacionando a variação da pressão arterial média (mmHg) e variação de frequência cardíaca (bpm) nos animais tratados com salina (n=10, linha contínua, $r^2 = 0,95$) ou com clorpirifós 30 mg/kg (n=10, linha tracejada, $r^2 = 0,96$).

Tabela 6. Parâmetros das curvas sigmóides obtidas pelo método de avaliação do barorreflexo por infusão para os animais tratados com salina (CON, n=10) ou clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=10). Teste *t*-Student, **p<0,01 quando comparados com o grupo controle.

Grupo	PB	PT	Range	Ganho	PA ₅₀
COM	-112,3 ± 14,67	82,0 ± 18,63	183,9 ± 25,54	-2,37 ± 0,42	-1,8 ± 4,71
CPF 30	-34,0 ± 9,13 **	64,6 ± 7,85	96,6 ± 11,76**	-0,61 ± 0,12**	-12,7 ± 3,37

A exposição ao clorpirifós elevou o *plateau* de bradicardia ($t=4,527$; $p<0,01$), ao passo que reduziu o *range* ($t=0,075$; $p<0,01$) e o ganho do barorreflexo ($t=3,978$; $p<0,01$), quando comparada com o resultado encontrado para os animais controle. A PA_{50} não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($t=-1,881$; $p>0,05$). O *plateau* de taquicardia também não apresentou redução estatisticamente significativa nos animais tratados quando comparado ao grupo controle ($t=-0,863$; $p>0,05$).

Da mesma forma que para o método por infusão, o método por doses aleatórias também permitiu a observação de significativas mudanças na resposta do barorreflexo nos animais tratados com uma dose aguda subletal do clorpirifós, quando comparados com o grupo controle. Os parâmetros avaliados na ativação do barorreflexo por doses aleatórias são apresentados no Apêndice III.

O tratamento com o clorpirifós provocou um deslocamento para a direita na regressão linear da resposta bradicárdica em função da mudança na pressão arterial, quando comparado com os animais controle, conforme pode ser observado na figura 11. É possível notar que houve prejuízo significativo do ganho da resposta bradicárdica nos animais tratados com clorpirifós (CON = $-2,9 \pm 0,43$; CPF 30 = $-1,3 \pm 0,23$; $p<0,01$), mas o *x-intercept* desta resposta para esses animais não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (CON = $-3,04 \pm 5,35$; CPF 30 = $7,35 \pm 1,34$; $p=0,088$). Para a resposta taquicárdica, a análise da regressão linear também não identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (ganho CON = $-2,54 \pm 0,41$; CPF 30 = $-1,99 \pm 0,28$; $p=0,287$ / *x-intercept* CON = $-4,66 \pm 1,37$; CPF 30 = $-7,10 \pm 2,06$; $p=0,338$).

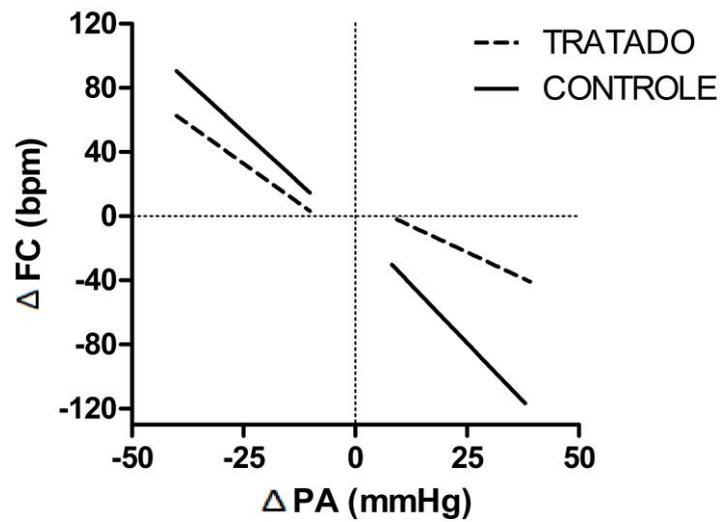


Figura 11. Sensibilidade do barorreflexo, determinada por regressão linear, das respostas bradicárdicas e taquicárdicas nos animais tratados com salina (CON, n=10) ou clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=10). Teste *t*-Student. Resposta bradicárdica: ganho ($t=3,277$; $p<0,01$); *X-intercept* ($t=1,886$; $p>0,05$). Resposta taquicárdica: ganho ($t=1,098$; $p>0,05$); *X-intercept* ($t=-0,984$; $p>0,05$).

4.3 DOSAGENS ENZIMÁTICAS

4.3.1 Atividade da Colinesterase plasmáticas (ChE)

Essa etapa foi executada nas amostras dos animais obtidas antes e após o tratamento com clorpirifós 20, 25 e 30 mg/kg e/ou salina. Os resultados encontrados para os animais testados são demonstrados na figura 12.

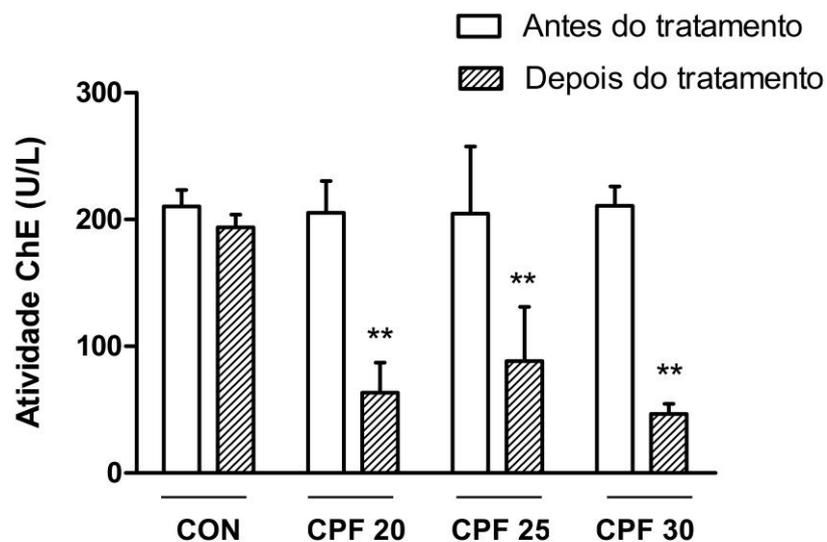


Figura 12. Atividade da colinesterase plasmática, expressa como UI/mL, em ratos antes (barra branca) e após (barra hachurada) o tratamento com salina (CON, n=16), clorpirifós 20 mg/kg (CPF 20, n=11), clorpirifós 25 mg/kg (CPF 25, n=07) e clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=20). **p<0,01 quando comparados com a atividade após o tratamento do grupo controle.

A análise estatística dos dados de atividade colinesterásica encontrados nos animais testados indica que as diferentes doses de CPF induziram redução significativa na atividade dessa enzima quando comparados entre os grupos ($F_{(3,50)}=4,348$, $p=0,0085$) quando comparados aos valores pré-tratamento intra-grupos ($F_{(1,50)}=157,3$, $p<0,0001$). Na análise *Post Hoc* de Bonferroni, foi observado que as três doses de clorpirifós reduziram significativamente a atividade da colinesterase, quando comparadas com a atividade encontrada no grupo controle e quando comparados também aos valores pré-tratamento ($p<0,001$, para as doses de 20 e 30 mg/kg e $p<0,01$ para a dose de 25 mg/kg). Foi observado também que não houve diferença significativa na redução da atividade da colinesterase plasmática após o tratamento entre as três doses de clorpirifós testadas ($p<0,05$, quando comparadas entre si).

Assim sendo, pode-se concluir que os animais expostos ao clorpirifós apresentaram uma redução significativa da atividade da colinesterase nas três doses testadas. Por exemplo, para a dose de 30 mg/kg, a atividade foi de $210,8 \pm 15,39$ UI/mL antes e $46,7 \pm 7,84$ UI/mL após a exposição ao pesticida (n=20). Ou seja, o tratamento com o composto organofosforado foi capaz de induzir redução de aproximadamente 77% da atividade dessa enzima quando comparada a atividade aferida antes do tratamento na dose em questão.

4.3.2 Atividade da Creatina Quinase Fração MB (CK-MB)

A atividade da enzima CK-MB foi analisada em 20 amostras de ratos tratados com o clorpirifós. Os valores médios encontrados nas amostras antes e após o tratamento são apresentados na figura 13.

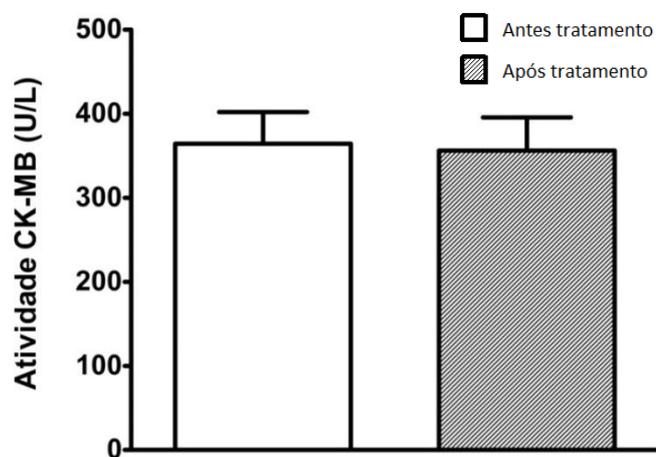


Figura 13. Atividade da Creatina Quinase Fração MB, expressa como U/L, em ratos antes (barra branca) e após (barra hachurada) o tratamento com clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=20). Teste *t*-Student pareado ($t=0,31$, $p>0,05$).

O tratamento com o clorpirifós não induziu alteração significativa na atividade desta enzima (antes do tratamento = $364,4 \pm 37,79$ U/L e após o tratamento = $356,2 \pm 39,54$ U/L). Todavia, em 04 dos animais testados pode-se observar um aumento expressivo na atividade da CK-MB após a exposição ao organofosforado, o que não foi traduzido na média geral de todos os animais tratados (tabela 8).

Tabela 7. Atividade da enzima CK-MB antes e após o tratamento em 04 animais expostos ao Clorpirifós 30 mg/kg.

Animal	Atividade da CK-MB		% Aumento
	Antes do tratamento	Após o Tratamento	
Rato 25	108,1 ± 8,70	180,4 ± 10,6	66,9
Rato 30	135,9 ± 1,90	206,7 ± 6,9	52,1
Rato 44	280,5 ± 37,70	652,8 ± 38,2	108,4

Rato 56	409,6 ± 40,8	502,0 ± 12,80	22,6
----------------	--------------	---------------	------

4.3.3 Atividade da Desidrogenase Láctica (LDH)

A atividade enzimática da LDH foi determinada nas amostras de 19 ratos tratados com o clorpirifós. Os valores médios encontrados nas amostras antes e após o tratamento são apresentados na figura 14.

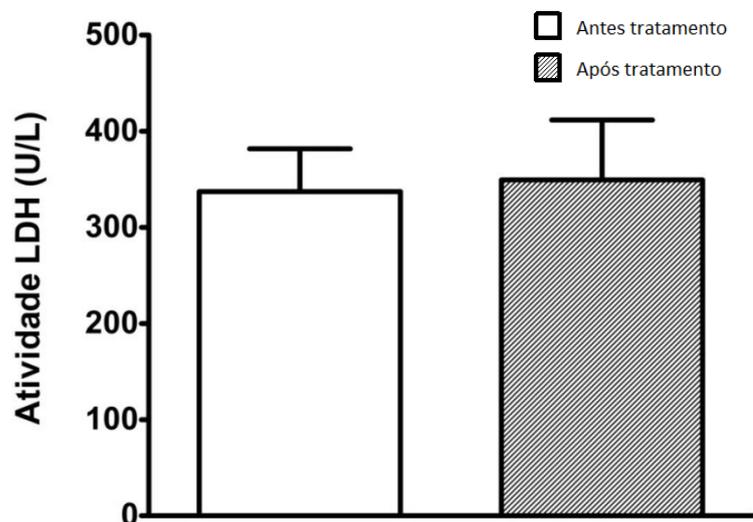


Figura 14. Atividade da Desidrogenase Láctica, expressa como U/L, nos animais antes (barra branca) e após (barra hachurada) o tratamento com clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=19). Teste *t*-Student pareado ($t=-,278$, $p>0,05$).

Na média geral, o tratamento com o clorpirifós não induziu alteração significativa na atividade desta enzima quando comparados os valores encontrados antes ($337,2 \pm 44,56$ U/L) e após o tratamento ($349,5 \pm 62,18$ U/L). Todavia, a semelhança do observado para a atividade da CK-MB, 3 animais tratados apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima após o tratamento com o clorpirifós (tabela 8).

Tabela 8. Atividade da enzima LDH antes e após o tratamento em 03 animais expostos ao clorpirifós 30 mg/kg.

Animal	Atividade da LDH		% Aumento
	Antes do tratamento	Após o Tratamento	
Rato 30	192,4 ± 6,4	337,8 ± 11,0	52,1

Rato 44	576,7 ± 28,8	748,4 ± 2,9	108,4
Rato 56	160,7 ± 12,6	430,75 ± 19,25	22,6

4.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

4.4.1 Teste do Campo Aberto (TCA)

O TCA foi iniciado aproximadamente 24 horas após o tratamento dos animais dos grupos controle (n=10, salina) e dos grupos tratados (n=10, para cada dose de clorpirifós). O TCA foi repetido nos mesmos animais nos períodos de 48 e 72 horas após o tratamento e os parâmetros foram locomoção periférica e central (PRUTI & BELZUNG, 2003).

Os dados do TCA observados nos animais tratados com três diferentes doses de clorpirifós e com salina durante o TCA está representado na tabela 9. Os dados obtidos mostram que a atividade locomotora total reduziu ao longo do tempo ($F_{(2,36)}=16,2$; $p<0,0001$). Todavia, o tratamento com clorpirifós não alterou significativamente a atividade locomotora em comparação ao grupo controle ($F_{(3,36)}=1,181$; $p=0,3307$), bem como não houve interação entre o tempo e o tratamento ($F_{(6,36)}=1,245$; $p=0,2938$).

Tabela 9. Resultado dos parâmetros avaliados no TCA 24, 48 e 72 horas após o tratamento dos animais com três doses de clorpirifós (n=10) e salina (n=10).

Tratamento	Atividade Locomotora		
	24 horas	48 horas	72 horas
Salina	95,1 ± 10,06	87,7 ± 15,04	61,3 ± 16,91
CPF 20	75,7 ± 9,29	55,5 ± 7,45	63,3 ± 14,54
CPF 25	79,3 ± 7,70	56,6 ± 13,82	48,4 ± 11,71
CPF 30	74,8 ± 9,58	53,4 ± 13,67	36,4 ± 8,81

4.4.2 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais em teste foram posicionados no LCE logo após serem expostos ao TCA e, durante 5 minutos, foram observados enquanto exploravam espontaneamente o aparelho. Os parâmetros verificados neste teste foram número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados e número total de entradas em ambos.

Os dados dos parâmetros avaliados neste teste são apresentados nas figuras 15 e 16. Os animais tratados com o clorpirifós nas três doses apresentaram redução significativa no número de entradas nos braços abertos ($F_{(3,36)}=3,937$; $p=0,016$) quando comparados com os animais do grupo controle.

Quando se avalia a relação entre o tempo dispendido nos braços abertos e o tempo nos braços fechados, embora os animais tratados tenham apresentado aparente redução nesse valor quando comparados com o grupo controle, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada (figura 17) ($F_{(3,36)}=1,423$; $p>0,05$).

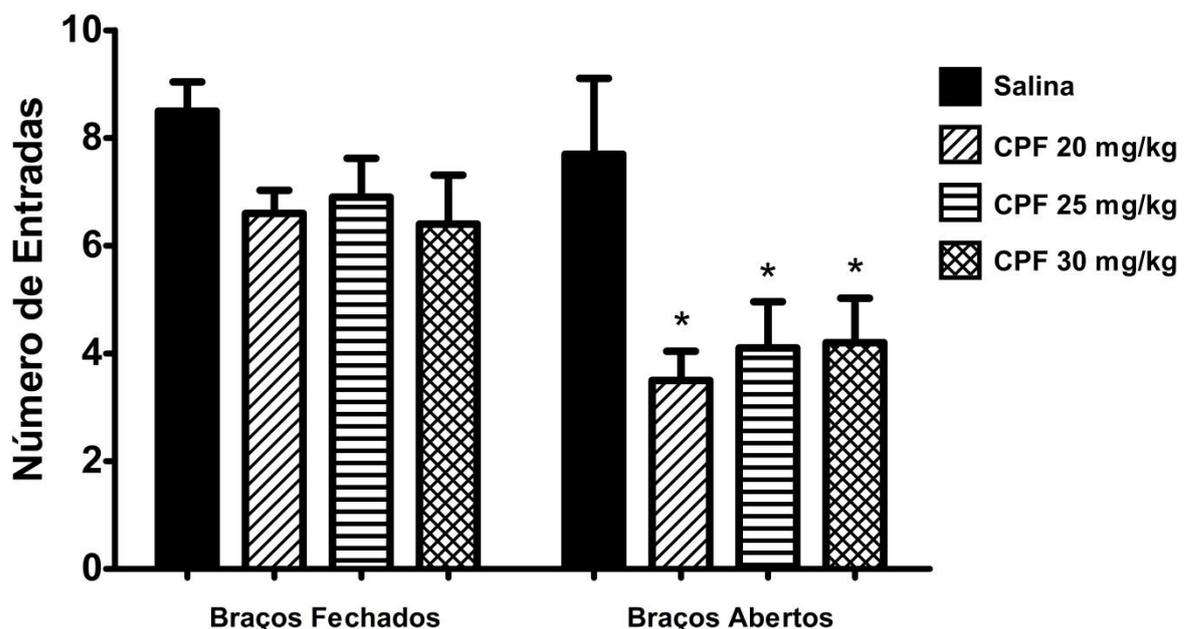


Figura 15. Número de entradas nos braços fechados e abertos do LCE observados nos animais tratados com salina (CON, n=10) e clorpirifós 20 mg/kg, 25 mg/kg e 30 mg/kg (CPF 20, CPF, 25, CPF 30, n=10 para cada dose) submetidos ao LCE. * $p<0,05$ quando comparados com o grupo controle.

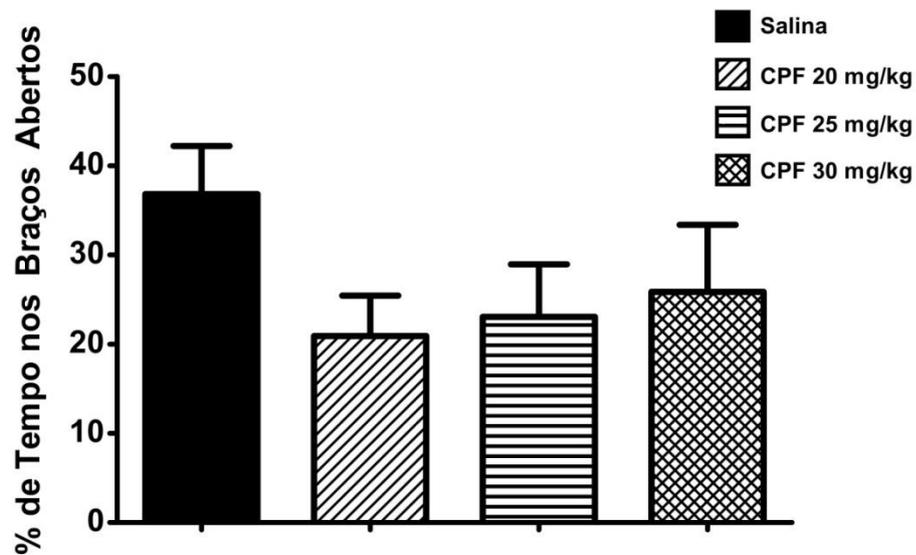


Figura 16. % de tempo nos braços abertos do LCE observados nos animais tratados com salina (CON, n=15) e clorpirifós 20 mg/kg, 25 mg/kg e 30 mg/kg (CPF 20, CPF, 25, CPF 30, n=15 para cada dose) submetidos ao LCE.

4.4.3 Teste do Nado Forçado (TNF)

O tempo de imobilidade médio observado nos animais testados com as doses de 25 mg/kg e 30 mg/kg de clorpirifós não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com os animais do grupo controle. Foi possível observar, porém, que os animais tratados com a dose de 20 mg/kg do pesticida apresentaram significativo aumento deste parâmetro em relação ao grupo controle, indicando um possível efeito depressivo causado pelo tratamento com a substância em teste (figura 17) ($F_{(3,56)}=3,413$; $p=0,023$).

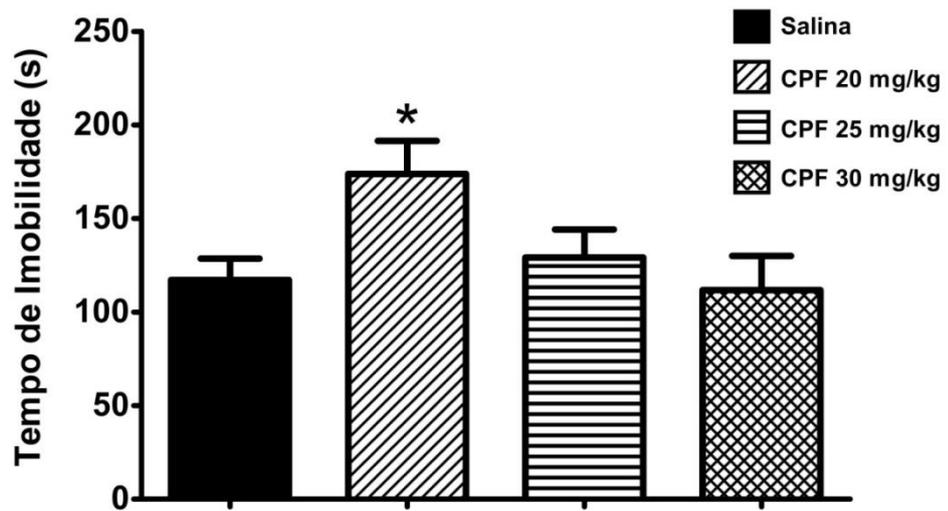


Figura 17. Tempo de imobilidade, em segundos, observado nos animais tratados com salina (CON, n=15) e clorpirifós 20 mg/kg, 25 mg/kg e 30 mg/kg (CPF 20, CPF, 25, CPF 30, n=15 para cada dose) submetidos ao TNF. * $p < 0,05$ quando comparados com o grupo controle.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 TOXICIDADE AGUDA E COLINESTERASE PLASMÁTICA

O Clorpirifós, um composto organofosforado, exerce parte de sua toxicidade devido à sua capacidade de inibição, central e periféricamente, da enzima acetilcolinesterase. O acúmulo de acetilcolina promovido por consequência desta inibição provoca excesso de estimulação pós-sináptica dos receptores colinérgicos. O excesso da ativação, por sua vez, resulta nos sinais e sintomas característicos da síndrome colinérgica, que incluem, principalmente, disfunção autonômica (salivação excessiva, lacrimejamento, micção, diarreia, dentre outros), movimentos involuntários (tremores) e disfunção respiratória (CLARK, 2006; ECOBICHON, 2001).

A exposição dos animais testados neste estudo a uma dose subletal de clorpirifós causou a manifestação de notórios sinais de toxicidade aguda, evidenciados nos resultados obtidos durante a sua avaliação clínica por até 4 horas após o tratamento. Dentre os sintomas avaliados, somente a contorção não foi manifestada em frequência significativa, quando comparados com os animais do grupo controle. Para os demais parâmetros, foi óbvia a influência do pesticida no aparecimento dos sintomas avaliados, mesmo em maior (micção/diarreia, sialorreia, tremor e ataxia) ou menor frequência (tetania e lacrimejamento).

O único parâmetro manifestado pelos animais do grupo controle foi o de micção/diarreia. Considerando estes serem processos fisiológicos comuns e que a avaliação neste estudo se deu por análise binária e não por intensidade, ou seja, ocorrência ou não do sinal, este resultado é esperado dada a inespecificidade deste parâmetro. Porém, observa-se que a frequência de manifestação para o grupo tratado com clorpirifós foi significativamente maior, bem como a sua intensidade de ocorrência mais evidente.

Em relação ao tempo médio de latência, o início da manifestação dos sinais avaliados foi diferente para cada um dos parâmetros estudados. No geral, a ordem de observação dos sintomas seguiu a ordem crescente dos tempos médios de início apresentados na tabela 4. Inicialmente, os animais urinavam e defecavam em maior

frequência, seguido do aparecimento de salivação excessiva. Em seguida, os movimentos involuntários tornavam-se mais notórios, sendo que os tremores eram um dos sinais mais claros e frequentes. O aparecimento de ataxia, tetania e contorção se dava principalmente naqueles animais cuja intoxicação, de acordo com a observação dos sinais clínicos manifestados, era mais forte e mais intensa. O lacrimejamento, embora sugerido também como um importante sinal de intoxicação por organofosforados, juntamente com salivação, micção e diarreia (SLUD, sigla do inglês *salivation, lacrimation, urination e defecation*) (LIU & POPE, 1996; KWONG, 2002), não se apresentou em frequência tão expressiva quanto os demais citados.

É comum nos ensaios experimentais envolvendo estudos com compostos organofosforados se proceder à avaliação da toxicidade aguda exercida por estes compostos como índice de efetividade do tratamento. De fato, Pope e colaboradores (2007 e 2011) demonstraram em estudos experimentais que o tratamento com clorpirifós induz marcantes alterações motoras e autonômicas conforme as observadas no presente estudo. Em contrapartida, nos testes de Lopez-Crespo e colaboradores (2007) o tratamento agudo com clorpirifós administrado subcutaneamente não resultou na observação de destes sinais de toxicidade aguda. Todavia, nestes estudos, a avaliação dos sinais de toxicidade aguda só se deu 4 horas após o tratamento, tempo este em que já era observada quase completa recuperação dos animais no presente estudo. Deste modo, é possível que o tempo adotado na avaliação daquele estudo não detecte as alterações imediatamente presentes após a intoxicação. Adicionalmente, as diferentes vias de administração empregada naquele estudo e no nosso podem contribuir para as diferenças observadas.

A efetividade do tratamento com o clorpirifós foi evidenciada também pela mudança significativa na atividade da enzima colinesterase plasmática nos animais testados. No presente estudo, o tratamento promoveu uma marcante inibição da atividade desta enzima representada pela redução de aproximadamente 77% dos valores encontrados antes da exposição ao composto organofosforado na dose de 30 mg/kg. Da mesma forma, para as doses de 20 e 25 mg/kg a redução ocorreu de forma significativa, sendo de aproximadamente 73% para ambas as doses. A ausência da mesma observação nos resultados obtidos com o grupo controle, tratados com salina, confirma a efetividade do tratamento com o clorpirifós.

Vale destacar que um dos mecanismos de toxicidade dos compostos organofosforados consiste na capacidade de inativar a colinesterase por meio de uma ligação covalente no seu sítio ativo (CLARK, 2006). Por consequência, a dosagem da atividade colinesterásica em tecidos facilmente acessíveis, tais como o plasma, provou ser um método sensível e útil para uso como marcador de exposição, para o diagnóstico e monitoramento da exposição a estes compostos, tais como o clorpirifós (AYGUN et. al, 2002; MÉGARBANE, 2013; MENA et al, 2014; OLIVEIRA-SILVA, 2000; POHANKA, 2013). Apesar das doses adotadas neste estudo não induzirem letalidade nos animais tratados, elas simularam um quadro de intoxicação uma vez que, tanto a atividade da colinesterase plasmática foi inibida, quanto os animais manifestaram sintomas característicos da intoxicação já descritos na literatura (KWONG, 2002).

Dessa forma, os resultados obtidos a partir da avaliação dos parâmetros de toxicidade aguda nos animais após o tratamento e com a dosagem da colinesterase plasmática colaborou com a garantia da efetividade do tratamento para este estudo. Adicionalmente, pode-se dizer que estes dois métodos, utilizados concomitantemente, podem colaborar para o estabelecimento de padrões eficazes de acompanhamento de toxicidade aguda após exposição a compostos organofosforados para posteriores estudos do Laboratório de Investigação Farmaco-Toxicológica da Função Cardiovascular. Todavia, ainda que inibições expressivas na atividade da colinesterase não tivessem sido observadas no presente estudo a ausência de toxicidade pelo composto não poderia ser excluída uma vez que estudos apontam que doses incapazes de inibir a colinesterase, podem exercer efeitos marcantes também sobre outros sistemas, além do sistema colinérgico (Carr et al., 2001).

5.2 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Os resultados observados após avaliação dos parâmetros do TCA mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na atividade locomotora entre diferentes grupos estudados. Esses dados indicam que as doses empregadas neste estudo parecem não promover um comprometimento motor nos animais testados,

ainda que um prejuízo motor não possa ser completamente descartado apenas com base nestas evidências.

A ausência de comprometimento motor também foi observada no estudo de Chen e colaboradores (2014) após exposição repetida ao clorpirifós. Carr e colaboradores (2001) investigaram o desempenho de ratos jovens no TCA após exposição oral ao clorpirifós repetida do 1° ao 21° dia pós-natal. Neste estudo, também não foi observado prejuízo motor nos animais até o 20° dia de exposição. Todavia, quando estes animais foram testados no campo aberto no 25° e 30° dia após o início da exposição, uma redução significativa na atividade locomotora foi observada. Estes autores ainda quantificaram a atividade da colinesterase em diferentes tecidos ao longo do tratamento, incluindo a colinesterase presente na musculatura esquelética. Curiosamente, a atividade da enzima presente tanto na musculatura esquelética, quanto no plasma, não estava significativamente inibida nos tempos em que se observou prejuízo da resposta locomotora. Assim, é possível que o prejuízo, quando presente, seja dependente do tempo de exposição e não envolva necessariamente efeitos relacionados com a inibição da colinesterase em diferentes tecidos.

A avaliação da atividade locomotora nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a exposição não detectou um prejuízo motor nos animais tratados com clorpirifós nas diferentes doses testadas, quando comparados com os animais do grupo controle. Todavia, não se descarta a possibilidade de que tais prejuízos possam se manifestar tardiamente como demonstrado no estudo de Carr e colaboradores (2001). Em contrapartida, a ausência de um prejuízo locomotor nas doses e tempo de avaliação investigados constitui um indício importante, uma vez que descarta que alterações observadas nos outros testes comportamentais empregados neste estudo sejam em decorrência de simples déficit motor nos animais testados.

Embora a análise da atividade locomotora dos animais no TCA não tenha detectado diferença entre os diferentes grupos e doses testadas, outra informação importante obtida após a análise estatística dos resultados consiste no efeito do tempo (24, 48 e 72 horas) na redução da atividade locomotora em todos os grupos. Ou seja, os animais, independente do tratamento ou dose, se locomoveram menos de acordo com o tempo do teste. Tal resultado é indicativo de que a memória dos animais testados não foi afetada pela exposição ao clorpirifós.

No que diz respeito ao LCE, os animais tratados com clorpirifós apresentaram significativa redução no número de entradas nos braços abertos, quando comparados com os animais do grupo controle, sugerindo um possível efeito ansiogênico provocado pelo tratamento. O mesmo efeito foi observado no estudo de Braquenier e colaboradores (2010), no qual foi observado aumento da ansiedade em fêmeas que foram expostas cronicamente ao clorpirifós na fase perinatal. Resultados semelhantes foram obtidos por Sánchez-Amate e colaboradores (2001). Neste estudo, 48 horas após o tratamento com doses agudas subcutâneas de CPF, os animais submetidos ao LCE apresentaram reduzida exploração dos braços abertos, expressada pela redução do número de entradas e no tempo despendido nestes braços, indicando um efeito ansiogênico conforme o observado no presente estudo. Em contrapartida, López-Crespo e colaboradores (2007) detectaram efeitos ansiolíticos em animais submetidos ao tratamento com clorpirifós subcutaneamente na dose de 250 mg/kg. Da mesma forma, um efeito ansiolítico também foi observado em ratos adolescentes submetidos a exposição ao clorpirifós por 7 dias, mas somente em doses acima de 40 mg/kg (CHEN et al., 2011). Aldridge e colaboradores (2005) observaram também um aumento do tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado em machos que foram expostos ao clorpirifós entre o 1º e 4º dia do período pós-natal. Desta forma, observa-se que tanto efeitos ansiolíticos quanto ansiogênicos podem ser observados frente à exposição ao clorpirifós e que estas diferenças entre os efeitos observados podem residir nas diferentes idades, doses e período de tratamento empregados. Chen e colaboradores (2014), inclusive, indicam um possível efeito dual da exposição ao clorpirifós, representado pela capacidade de induzir alterações tipo ansiolítica em altas doses e ansiogênicas nas doses menores.

Os resultados obtidos no TNF indicaram que o CPF produziu um aumento do tempo de imobilidade, indicando assim um possível efeito tipo depressivo na dose de 20 mg/Kg, não evidenciado nas doses de 25 e 30 mg/Kg. Esses resultados se assemelham aos resultados de Chen e colaboradores (2011), um efeito depressivo na menor dose administrada, enquanto que na maior dose foi constatado um efeito antidepressivo sobre o TNF. Num estudo mais recente, Chen e colaboradores (2014) observaram que a exposição ao clorpirifós em doses repetidas e menores (de 2,5 a 20 mg/kg, subcutânea), de fato, induz alterações comportamentais tais como efeito tipo depressivo em ratos adolescentes.

A observação do efeito tipo-depressivo também foi feita a partir da administração de metamidofós no estudo de Lima e colaboradores (2009). Neste estudo, animais expostos a doses repetidas deste organofosforado induziram aumento do tempo de imobilidade no TNF, indicando um efeito tipo-depressivo semelhante ao observado no presente estudo com o clorpirifós, o que indica que, possivelmente, esse efeito seja compartilhado pelos compostos desta classe. De fato, London e colaboradores (2005) indicam, numa revisão de estudos de mortalidade e morbidade relacionados com intoxicação por organofosforados que exposição aguda ou crônica a estes compostos estão associadas com desordens afetivas, havendo, inclusive, uma possível relação entre a depressão e suicídios em humanos.

O clorpirifós induziu efeito tipo-depressivo somente na dose mais baixa testada, a de 20 mg/kg. É possível que um efeito dual do clorpirifós, conforme indicado por Chen e colaboradores (2014), se aplique também para os efeitos tipo-depressivo e tipo-antidepressivo, explicando assim a ausência de alterações observadas nas doses mais elevadas de clorpirifós.

Sabe-se que, embora sejam mais evidentes os efeitos sobre o sistema colinérgico, a exposição ao clorpirifós é capaz de promover alterações importantes também sobre outros sistemas, tais como o serotoninérgico e dopaminérgico relacionados diretamente com a fisiopatologia da depressão (ALDRIDGE et al., 2003; CHEN et al., 2011; MORENO et al., 2008). De fato, os resultados comportamentais foram observados por Sanchez-Amate e colaboradores (2001) nos animais testados foram manifestados mesmo sem evidência de sinais de intoxicação colinérgica. Dessa forma, os mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais observadas podem envolver múltiplos sistemas. Alguns autores tem mostrado que o sistema colinérgico parece participar diretamente da modulação da ansiedade, particularmente ao nível do hipocampo (FILE et al., 1998, 2000; DEGROOT & TREIT, 2002). Adicionalmente, estudos apontam que dentre os efeitos desencadeados pela exposição ao CPF ou a outros organofosforados figuram, alterações na síntese de serotonina (5HT) ou na expressão de seus receptores e transportadores (ALDRIDGE et al., 2003; RAINES et al., 2001; SLOTKIN et al., 2006, 2007, 2008), evidenciando também uma participação deste sistema na mediação das alterações comportamentais induzidas por esta classe de compostos. Estudos eletrofisiológicos envolvendo neurônios do hipocampo, também mostraram

que outro representante dos organofosforados, o paraoxon, foi capaz de interferir com a atividade de canais iônicos de glicina, receptores do subtipo GABAA, receptores NMDA, bem como, de receptores nicotínicos (ROCHA et al., 1996), indicando que estes compostos podem exercer suas ações tóxicas por interferência em diversos sistemas. Todavia, o exato mecanismo envolvido na mediação das respostas observadas em nosso estudo permanece por ser investigado.

Os efeitos observados nos animais testados indicam, portanto, que a exposição ao clorpirifós, mesmo em doses agudas subletais, é capaz de promover significativas desordens comportamentais. Vale destacar, entretanto, que os efeitos observados não estão relacionados com um possível estado doentio ou debilitado após a intoxicação, tendo em vista que não houve alteração da atividade locomotora entre os diferentes grupos; apenas a menor dose apresentou efeito no TNF, contrariando a hipótese de que, em decorrência de um estado doentio frente à intoxicação, quanto maior a dose maior seria o efeito; e, por fim, também foram encontradas alteração na avaliação dos reflexos cardiovasculares. Além disso, no teste de acompanhamento de toxicidade aguda foi observado que, embora freqüentes e intensos, os sinais de intoxicação desapareciam após o período de observação, indicando recuperação dos sintomas avaliados.

5.3 ENSAIOS CARDIOVASCULARES

O tratamento com uma dose subletal de clorpirifós induziu mudanças significativas nos reflexos envolvidos na regulação cardiovascular. Os resultados encontrados demonstram que os animais expostos ao organofosforado apresentaram redução nas respostas bradicárdicas dos três reflexos testados. Adicionalmente, o tratamento promoveu redução na resposta hipertensora do quimiorreflexo, na resposta hipotensora do RBJ e no *range* e ganho do barorreflexo.

Sabe-se que envenenamentos por OF podem promover marcantes alterações no sistema cardiovascular dos indivíduos expostos a estes compostos (AGHABIKLOOEI et al., 2013; ANAND et al., 2009; JOSHI et al., 2013; SAADEH et al., 1997; WU et al., 2001). Porém, muito pouco se sabe a respeito do efeito dessas substâncias sobre os mecanismos de regulação da pressão arterial. Assim como os

resultados deste estudo, Maretto e colaboradores (2012) identificaram que o tratamento com o metamidofós, outro agente organofosforado, induziu prejuízo na resposta bradicárdica de dois importantes reflexos cardiovasculares (quimiorreflexo e RBJ) em animais experimentais expostos a uma dose aguda subletal do pesticida. Porém, o barorreflexo, outro importante reflexo, não foi avaliado neste estudo.

Ao contrário do observado nas respostas reflexas, o tratamento com o clorpirifós não alterou significativamente os níveis basais de PAM e FC dos animais expostos quando comparados aos animais do grupo controle. Esses resultados diferem de observações clínicas e estudos já relatados, nos quais a exposição a compostos organofosforados induziu importantes e marcantes modificações nos parâmetros hemodinâmicos dos indivíduos intoxicados.

Saadeh e colaboradores (1997), numa revisão de 46 casos de pacientes envenenados por organofosforados e carbamatos registrados em um Hospital de Israel durante o período de 1990 a 1995, relataram, dentre outros sinais clínicos, a ocorrência de hipertensão e hipotensão em 22% e 17% dos casos, respectivamente. Hipotensão também foi relatada como um sinal frequente em casos de auto envenenamento por dimetoato, outro agente organofosforado, por Davies e colaboradores (2008). Considerando estudos em animais, Anthon & Campaña-Salcido (2011) relataram, num estudo não invasivo, o aumento do risco de desordens hipertensivas em ratos expostos a três doses de clorpirifós de forma aguda (3 dias) ou sub-aguda (14 dias). Este resultado foi ainda mais evidente na maior dose administrada de forma aguda, 25 mg/kg em que a PAM elevou-se de forma contínua, durante os três dias de exposição, sem contudo causar nenhuma diferença significativa na FC. Todavia, no estudo de Anthon & Campaña-Salcido não é descrito o momento exato em que os parâmetros pressóricos começaram a ser medidos após a exposição ao clorpirifós. Adicionalmente, o tratamento por eles empregado é repetido por três dias, o que difere do regime adotado em nosso estudo. Em nosso estudo os registros cardiovasculares só foram procedidos 24 horas após a administração do clorpirifós. Sendo assim, é possível que alterações dos níveis basais decorrentes do tratamento, se presentes, já tenham sido restabelecidas 24 horas após o tratamento. De fato, de forma semelhante aos nossos dados, no estudo de Maretto e colaboradores (2012) nenhuma alteração foi observada nos níveis basais de PAM e FC 48 horas após o tratamento agudo de ratos com outro praguicida organofosforado.

Sendo assim, a discordância nos resultados dos dados hemodinâmicos basais dos animais do presente estudo e dos estudos supracitados pode se dever ao grau de intoxicação dos objetos de estudo e aos esquemas de exposição aos compostos organofosforados. Adicionalmente, dados clínicos envolvem uma grande variedade de compostos organofosforados, bem como diferentes vias de exposição, absorção e doses, o que, conseqüentemente, leva a diferentes parâmetros e conseqüências de exposição.

Por outro lado, o tratamento com uma dose subletal de clorpirifós empregado neste estudo foi capaz de induzir alterações nos três reflexos cardiovasculares testados. Para o RBJ, foi encontrado prejuízo das respostas hipotensoras e bradicárdicas após o tratamento com o clorpirifós. Estes resultados estão de acordo com Maretto e colaboradores (2012), em que também foi observado um prejuízo da resposta bradicárdica pelo tratamento com o organofosforado metamidofós. Todavia, no estudo de Maretto, a análise deste reflexo foi feita apenas envolvendo as respostas bradicárdicas frente à ativação deste reflexo. De forma semelhante, Uggere e colaboradores (2000), adotaram uma avaliação apenas do componente bradicárdico do RBJ em ratos espontaneamente hipertensos. Sabe-se que a resposta bradicárdica observada após a ativação deste reflexo envolve tanto um aumento da atividade parassimpática quanto uma redução da descarga simpática para o coração, embora a ativação vagal seja predominante e medeie de forma mais proeminente a bradicardia promovida (SPYER, 1982).

No presente estudo, o tratamento com o clorpirifós induziu redução da resposta bradicárdica após ativação do RBJ. Considerando o papel da descarga vagal na redução da FC após ativação deste reflexo, é possível que a exposição ao agente organofosforado tenha promovido um prejuízo importante do componente parassimpático. Vários trabalhos têm demonstrado que tanto a exposição repetida a doses baixas quanto intoxicação aguda por compostos organofosforados podem conduzir a outros efeitos não relacionados exclusivamente à inibição da acetilcolinesterase (HOWARD et al, 2007; HOWARD & POPE, 2002; SILVEIRA et al, 1990). De fato, experimentos *in vitro* realizados por Bomser e Casida (2001) evidenciaram que o clorpirifós é capaz de causar dietilfosforilação em um sítio específico de receptores muscarínicos M2 em corações de ratos. Embora não esteja bem determinado se essa interação resulta em ação agonista ou antagonista, algumas evidências fisiológicas apontam para a dessensibilização aguda dos

receptores muscarínicos expostos a esta classe de inseticidas. Tendo isto em vista, é possível que a redução da resposta bradicárdica observada possa ser resultante de uma diminuição da sensibilidade dos receptores muscarínicos cardíacos após a exposição ao praguicida.

Em relação à resposta hipotensora do RBJ, foi observado neste estudo a atenuação na resposta hipotensora induzida após a ativação do reflexo. Chianca & Machado (1996) mostraram que a administração de metilatropina promove, além do bloqueio da resposta bradicárdica por inibição dos receptores muscarínicos cardíacos, bloqueio também da resposta hipotensora durante a ativação do RBJ, sugerindo que esta seja consequente da redução na FC promovida pela ativação parassimpática. Dessa forma, é possível que a redução da resposta hipotensora observada durante a avaliação do RBJ nos animais tratados neste estudo esteja relacionada com o prejuízo causado pelo clorpirifós no componente bradicárdico do RBJ.

Dados clínicos e experimentais têm demonstrado que o RBJ exerce um importante papel no controle da função cardiovascular em condições normais e patológicas. Estudos de Chianca e Machado (1994) mostraram um aumento da sensibilidade do RBJ em animais com desnervação sinoaórtica, sugerindo um papel fisiológico para este reflexo na regulação cardiovascular. Dados também evidenciam alterações no RBJ em animais experimentais hipertensos (ARAÚJO et al., 1998; PEOTTA et al., 2001), com hipertrofia cardíaca (CALORE et al., 2007; MEYRELLES et al., 1998; UGGERE et al., 2000) e infarto do miocárdio (CHILADAKIS et al., 2003; LUPINSK et al., 2011; MEYRELLES et al., 1997). Meyrelles e colaboradores (1997) demonstraram, em ratos, que o infarto do miocárdio pode induzir prejuízo na resposta reflexa do RBJ, isso possivelmente devido à ocorrência de hipertrofia do átrio esquerdo ou devido à injúria necrótica da inervação do ventrículo esquerdo, onde se originam as principais vias aferentes deste reflexo. Tendo em vista a observação de lesão cardíaca promovida pela exposição ao clorpirifós em alguns animais deste estudo, o que foi evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas CK-MB e LDH após o tratamento, pode-se pressupor que haja uma interação entre este resultado e o prejuízo observado no RBJ. Embora evidenciado apenas em alguns dos animais testados, o dano cardíaco poderia estar colaborando, neste caso, com a redução na resposta reflexa observada nos animais tratados.

No que diz respeito aos resultados da avaliação do quimiorreflexo, foi observada, da mesma forma, uma acentuada redução no componente bradicárdico desta resposta reflexa. Este resultado se assemelha ao observado por Maretto e colaboradores (2012), no estudo do quimiorreflexo em ratos após exposição aguda a uma dose subletal do organofosforado metamidofós. O quimiorreflexo exerce uma importante influência não somente no controle de trocas gasosas, mas também no controle cardíaco e vascular. A ativação deste reflexo envolve, basicamente, efeitos na função cardiovascular a partir de ajustes na descarga simpática e na atividade vagal para vasos e coração, respectivamente. O quimiorreflexo possui a habilidade única de ativar simultaneamente a via simpática para os vasos sanguíneos, levando a resposta hipertensiva, e aumentar a atividade vagal para o coração, produzindo bradicardia (KARA et al., 2003). Dessa forma, é possível que a redução da resposta bradicárdica após a ativação do quimiorreflexo envolva um prejuízo predominante do componente parassimpático frente à exposição ao organofosforado. De forma semelhante, tal efeito poderia estar relacionado com a dessensibilização de receptores muscarínicos cardíacos mediante exposição ao praguicida (BOMSER & CASIDA, 2001).

É intrigante, entretanto, o resultado observado nas respostas hipertensoras destes mesmos animais expostos ao clorpirifós após a ativação do quimiorreflexo por administração de cianeto de potássio. Nas maiores doses de KCN, a resposta pressora do quimiorreflexo, que envolve aumento da descarga simpática promovida pela ativação dos quimiorreflexo, foi prejudicada e não acentuada nos animais tratados com clorpirifós. No estudo de Maretto e colaboradores (2012), não foi observada nenhuma alteração neste componente da resposta reflexa, seja aumento ou redução. Vale destacar, entretanto, que, embora da mesma classe, o pesticida utilizado neste estudo difere daquele utilizado por Maretto e colaboradores, e, por isso, pode ser que os resultados distintos estejam relacionados com essa diferença de compostos. Resultados experimentais de Tuna e colaboradores (2011) evidenciaram, num estudo com ratos Wistar expostos cronicamente a doses baixas de clorpirifós, que este pesticida diminui a força e rigidez da aorta, possivelmente relacionado com a capacidade de organofosforados fragmentarem fibras colágenas e elastina na parede aórtica de ratos (AKIMOV & KOLESNICHENKO, 1985; ANTOV et al., 1984; YAVUZ et al., 2005). Considerando o papel do aumento da resistência vascular periférica na resposta hipertensora do quimiorreflexo, como consequência

do aumento da atividade simpática na resposta efetora, pode-se sugerir que a possibilidade do clorpirifós de reduzir a força e capacidade de contração de artérias colabore com o prejuízo também no aumento da pressão arterial promovido por este reflexo. Adicionalmente, há que se considerar que a transmissão ganglionar do sistema simpático é mediada por ativação colinérgica e que a despeito das evidências deste estudo apontarem um prejuízo predominante do clorpirifós sobre o componente vagal, um prejuízo do sistema simpático não pode ser descartado.

Os quimiorreceptores são estimulados e ativados em casos de redução na pressão parcial de O₂ e do pH ou aumento da pressão parcial de CO₂, ou seja, situações de hipóxia (SPYER, 1990). Considerando que, de acordo com relatos clínicos, a insuficiência respiratória, depressão respiratória e parada cardiorrespiratória consistem nas principais causas de morte de indivíduos expostos aos organofosforados (SAADEH et al., 1997; YANG & DENG, 2007; YEN et al., 2000), não é improvável que o prejuízo causado na resposta do quimiorreflexo frente ao quadro de hipóxia que sucede a intoxicação por estes compostos colabore com o agravamento dessas complicações observadas após intoxicações, já que a diminuição da capacidade reflexa pode comprometer de forma impactante os ajustes cardiorrespiratórios normalmente acionados com a ativação do reflexo com o objetivo de manter os órgãos vitais adequadamente perfundidos.

No barorreflexo, foi observada, assim como nos demais reflexos, a diminuição da resposta bradicárdica promovida após a sua ativação com o vasoconstritor fenilefrina, expressada pela diferença no plateau de bradicardia do grupo tratado, quando comparado com o grupo controle. A ativação dos barorreceptores, em casos de aumento súbito da pressão arterial como a que ocorre com a administração da fenilefrina, promove como resposta efetora a inibição da atividade simpática e estimulação da atividade parassimpática para o coração e vasos sanguíneos, o que resulta em ajuste do débito cardíaco e queda da resistência vascular periférica resultando, conseqüentemente, na redução, ajuste e estabilização da pressão arterial (SLEIGHT, 2014). A avaliação da variação na FC promovida com a administração de fenilefrina após o bloqueio de receptores muscarínicos e beta-adrenérgicos com os fármacos metilatropina e atenolol feita no estudo de Head & MacCarty (1987) evidenciou que a resposta bradicárdica em resposta da ativação do barorreflexo tem contribuição predominante da ativação parassimpática e aumento da descarga vagal no coração. Dessa forma, considerando também a capacidade do

clorpirifós de reduzir a sensibilidade de receptores muscarínicos cardíacos, é possível que o mecanismo de redução da resposta bradicárdica do barorreflexo seja comum à anteriormente explicada para os demais reflexos testados.

A administração de nitroprusseto, por outro lado, não promoveu diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos avaliados. O plateau de taquicardia, o *x-intercept* e o ganho das retas obtidas por regressão linear para o componente taquicárdico não foram significativamente distintos nos animais tratados com o clorpirifós dos animais tratados com salina. Neste caso, a queda da pressão arterial consequente da vasodilatação causada pela administração dessa substância envolve a desativação do mecanismo do barorreflexo anteriormente citado. A resposta, desse modo, envolve tanto o aumento da atividade simpática quanto à diminuição da descarga vagal, com objetivo de aumentar o débito cardíaco e a resistência vascular periférica para, assim, ocorrer o ajuste da pressão arterial. A avaliação da variação na FC promovida com a administração de fenilefrina após o bloqueio de receptores muscarínicos e beta-adrenérgicos com os fármacos metilatropina e atenolol feita no estudo de Head & MacCarty (1987) evidenciou também que o aumento na FC em resposta à desativação do barorreflexo possui contribuição tanto simpática quanto parassimpática, mas com uma maior predominância do simpático. Neste caso, uma vez que os dados dos outros reflexos também apontam para um prejuízo do componente parassimpático, a não observação de efeitos significantes na resposta taquicárdica do barorreflexo pode indicar que a atividade simpática cardíaca possa estar predominantemente preservada após a exposição aguda ao praguicida. Em contrapartida, o *range* dos animais tratados se apresentou significativamente reduzido após o tratamento com o clorpirifós. Esta medida traduz a diferença matemática entre os platôs de bradicardia e taquicardia obtidos na análise do barorreflexo por curvas sigmoidais. Sendo assim, a redução observada no platô de bradicardia contribuiu para a redução observada no *range*. De fato, Head e McCarty (1986) demonstraram que o vago parece exercer maior contribuição sobre este parâmetro.

Outro parâmetro importante analisado na ativação do barorreflexo cardíaco, o ganho da curva sigmóide obtida pelo agrupamento dos resultados dos animais expostos ao clorpirifós apresentou significativa alteração quando comparado com o ganho referente à curva dos animais controle. A elevação do valor da inclinação média da curva expressa também o prejuízo que a exposição ao organofosforado

promoveu a este importante reflexo: a mesma variação na pressão promove uma menor resposta na frequência cardíaca dos animais expostos ao clorpirifós. Ou seja, esse resultado expressa o quanto os animais tratados reduziram sua capacidade de resposta e ativação do barorreflexo.

A análise do barorreflexo por regressão linear permite, além da observação da sensibilidade dos componentes bradicárdicos e taquicárdicos separadamente, a identificação do limiar de início das respostas do barorreflexo, identificada pelo *x-intercept* de cada reta. Na análise por regressão linear neste estudo, não foi notado diferença estatística significativa no *x-intercept* entre os grupos tanto para os componentes bradicárdicos quanto taquicárdicos. Foi observado, no entanto, um prejuízo no ganho da resposta promovida após a administração de fenilefrina. Ou seja, na ativação do barorreflexo nos animais após a exposição ao clorpirifós, a variação da FC aconteceu em menor extensão do que o observado para os animais controle. Isso significa que a mesma variação na pressão arterial resulta numa resposta bradicárdica consideravelmente atenuada naqueles que foram expostos ao clorpirifós, o que confirma os dados representados nas curvas sigmoidais. Assim, o prejuízo observado no ganho barorreflexo dos animais tratados, expresso na disposição por curvas sigmoidais, parece envolver principalmente a interferência no componente parassimpático, o que pode ser melhor discriminado na análise por regressão linear.

Quando a pressão arterial aumenta ou reduz, a atividade barorreflexa também aumenta ou diminui, respectivamente, influenciando assim a FC, a contratilidade cardíaca e o fluxo sanguíneo por meio de ajustes na contratilidade de vasos através da atividade reflexa. Portanto, o barorreflexo é fundamental para compensar efeitos hipo e hipertensores para que a pressão arterial retorne a níveis normais (FARAH et al., 1999). O principal objetivo do barorreflexo é promover a estabilização da pressão arterial de forma rápida e eficiente, permitindo a manutenção desse parâmetro em níveis adequados para a perfusão dos tecidos durante diferentes condições, sendo isto um requisito obrigatório para a sobrevivência (VASQUEZ et al., 1997). Dessa forma, dada a sua importância, é inegável a relevância de estudos que colaborem com a melhor compreensão dos efeitos causados neste reflexo por exposição a substâncias potencialmente tóxicas. Tendo isso em vista, o prejuízo nesta importante resposta reflexa causado pelo tratamento com o clorpirifós pode

contribuir para a toxicidade cardíaca desta intoxicação, colaborando, inclusive, para o agravamento do quadro clínico geral e evolução ao óbito.

Considerando ainda a toxicidade exercida por compostos organofosforados sobre o sistema cardiovascular, um outro importante aspecto investigado durante este estudo foi a possibilidade do tratamento com uma dose aguda do clorpirifós causar efeitos cardiotóxicos diretos, expressados por danos ao tecido cardíaco e evidenciados por um aumento na atividade de enzimas marcadores de lesão cardíaca CK-MB e LDH. Na prática clínica, aumento nas taxas destas enzimas são interpretadas como indício de dano celular no miocárdio e, embora muito úteis para o diagnóstico e monitoração de lesão cardíaca, a faixa de normalidade na atividade destas enzimas é variável em humanos (HANSON et al, 2013; NURSALIM et al, 2013). Por outro lado, para animais não existem valores de referência.

A análise das atividades médias da CK-MB e LDH nas amostras obtidas não permitiu a observação de nenhuma alteração significativa nos níveis das enzimas antes e após o tratamento com o clorpirifós. Porém, numa análise individual, chamou a atenção o aumento expressivo na atividade da CK-MB em 04 animais e o aumento significativo da atividade da LDH em 03 animais, dos 20 testados. Os 03 animais com aumento da LDH apresentaram também aumento na atividade da CK-MB. Possivelmente, a ausência de aumento significativo da atividade da LDH naquele animal que apresentou somente aumento da CK-MB esteja relacionada com o tempo de coleta e o tempo médio para que essas enzimas aumentem sua atividade após o evento cardiovascular. A coleta de amostra após o tratamento foi executada 24 horas depois da exposição ao clorpirifós, tempo necessário para que a atividade máxima da CK-MB seja alcançada após a lesão cardíaca, enquanto que para a LDH essa faixa é estendida para até 48 horas (WALLACH, 2009).

Os resultados observados para a CK-MB e LDH são similares ao observado na clínica, tendo em vista que alguns estudos relatam que intoxicações agudas por organofosforados podem ser acompanhadas por danos no miocárdio (DE BLEECKER, 1995; JOHN et al, 2003; KARASU-MINARECI, 2012). Saadeh e colaboradores (1997), inclusive, mostraram que dos 46 pacientes que foram admitidos no hospital com o diagnóstico de intoxicação por organofosforados e carbamatos, 5 manifestaram aumento das enzimas CK-MB e LDH. Ou seja, mesmo que este aumento não seja manifestado de forma significativa em todos aqueles expostos ao organofosforado, uma parcela destes apresenta evidências de lesão

cardíaca, o que evidencia a potencialidade e capacidade deste composto de promover tal alteração no sistema cardiovascular.

É importante ressaltar que, apesar do uso destes marcadores como indicativos de lesão cardíaca, existem limitações em seu uso, visto que a LDH pode estar associada também em casos de dano muscular esquelético e a sensibilidade da CK-MB, às vezes, não é suficientemente alta para detectar pequenas lesões no miocárdio, tendo em vista a ampla faixa de normalidade (HAMM & KATUS, 1995; NURSALIM et al, 2013).

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos da exposição aguda a doses subletais do clorpirifós, um inseticida organofosforado, sobre os reflexos cardiovasculares, sobre a atividade de algumas enzimas e sobre parâmetros comportamentais em animais experimentais.

No que diz respeito ao comportamento, o tratamento com o organofosforado induziu efeito ansiogênico e depressivo nos animais testados.

Nas dosagens enzimáticas, observou-se que a atividade da colinesterase plasmática foi significativamente reduzida após o tratamento com o clorpirifós. Houve também indícios de lesão cardiovascular em alguns dos animais tratados, evidenciados por aumento da atividade das enzimas CK-MB e LDH.

Por fim, em relação aos testes cardiovasculares, o tratamento com o clorpirifós foi capaz de causar prejuízo na resposta bradicárdica dos três reflexos testados. Adicionalmente, a exposição ao clorpirifós foi capaz de promover redução na resposta hipertensora do quimiorreflexo, na resposta hipotensora do RBJ e no *range* e ganho do barorreflexo. Estes efeitos observados podem contribuir para a toxicidade cardiovascular associada à exposição aguda aos compostos OF.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- ABIFINA. Defensivos agrícolas – notícias. In: Associação Brasileira de Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (2009). Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/noticiaSecao.asp?secao=1¬icia=76>>. Acesso em: 07 out. 2012.
- AGHABIKLOOEI, A.; MOSTAFAZADEH, B.; FARZANEH, E.; MORTEZA, A. Does Organophosphate poisoning cause cardiac injury? **Pakistan J. Pharmac. Sciences.** 26(6): 1247-1250, 2013.
- AKIMOV, G. A.; KOLESNICHENKO, I. P. Morphological changes in the nervous system in acute peroral chlorophos poisoning. **Arkh. Patol.** 47: 44-51, 1985.
- ALDRIDGE, J. E.; SEIDLER, F. J.; MEYER, A.; THILLAI, I.; SLOTKIN, T. A. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to Chlorpyrifos: effects during different critical periods. **Environm. Health Perspc.** 111(14): 1736-1743, 2003.
- ALDRIDGE, J. E.; LEVIN, E. D.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Developmantal Exposure of Rats to Chlorpyrifos Leads to Behavioral Alterations in Adulthood, Involving Serotonergic Mechanisms and Resembling Animal Models of Depression. **Environ. Health Persp.**, 113: 527-531, 2005.
- ANAND, S.; SINGH, S.; NAHAR SAIKIA, U.; BHALLA, A.; PAUL SHARMA, Y.; SNGH, D. Cardiac abnormalities in acute organophosphate poisoning. **Clin. Toxicol.**, 47(3): 230-235, 2009.
- ANTHON, A. A.; CAMPAÑA-SALCIDO, A. D. Chlorpyrifos induces hypertension in rats. **J. Environm. Chem. Ecotox.** 3(12): 304-308, 2011.
- ANTOV, G.; KAZAKOVA B.; POPOV, T. Morphological and biochemical changes in the connective tissue in chronic chloroacetophone poisoning. **Probl Khig.** 9: 59-65, 1984.
- ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. M.; AMARAL, A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; CONSENZA, C. A. N.; NEVES, C.; MARKOWITZ, C. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciên. Saúde Colet.**, 12(1): 115-130, 2007.
- ARAÚJO, M. T.; BARKER, L. A.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Inhibition of nitric oxide synthase causes profound enhancement of the Bezold-Jarisch reflex. **A. J. Hypert.**, 11: 66-72, 1998.
- AVIADO, D. M.; AVIADO, D. G. The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonar reflexes. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 940: 48-58, 2001.

AYGUN, D.; DOGANAY, Z.; ALTINTOP, L.; GUVEN, H.; ONAR, M.; DENIZ, T.; SUNTER, T. Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. **J. Toxicol.** 40(7), 903-910, 2002.

BERGEMEYER, H. U. **Lactate dehydrogenase.** In: Methods of Enzymatic Analysis. Ed: Bergemeyer, H. U. Academic Press. New York, pp. 576-579, 1974.

BOMSER, J. A.; CASIDA, J. E. Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by Chlorpyrifos oxon in vitro. **Toxicol. Lett.**, 119(1): 21-26, 2001.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology.** 94:147-160, 1988.

BRAQUENIER, J. B.; QUERTEMONT, E.; TIRELLI, E.; PLUMIER, J. C. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and Teratology.** 32: 234-239, 2010.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Brasília, 12 jul. 1989, Seção 1, p. 11459-11460.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Rev. Saúde Pública,** 34(5): 529-37, 2000.

CALORE, E. E.; PEREZ, N. M.; HERMAN, M. M. Morphometric studies of cardiac miocytes of rats chronically treated with na organophosphate. **Ecotox. Environm. Safety.** 66: 447-450, 2007.

CARR, R. L.; CHAMBERS, H. W.; GUARISCO, J. A.; RICHARDSON, J. R.; TANG, J.; CHAMBERS, J. E. Effects of Repeated Oral Postnatal Exposure to Chlorpyrifos on Open-Field Behavior in Juvenile Rats. **Toxicological Sciences.** 59: 260-267, 2001

CHEN, W. Q.; YUAN, L.; XUE, R.; LI, Y. F.; SU, R. B.; ZHANG, Y. Z.; LI, J. Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. **Neurotoxicology,** 32: 355-361, 2011.

CHHARBA, M. L.; SEPAHA, G. C.; JAIN, S. R.; BHAGWAT, R. R.; KHANDEKAR, J. D. ECG and necropsy changes in organophosphorus compound (malathion) poisoning. **Indian J. of Pshysiology,** 237(6): 655-661, 1979.

CHIANCA, D. A.; MACHADO, B. H. The sensitivity of the Bezold-Jarisch reflex is increased in rats with sinoaortic deafferentation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** 27: 775-781, 1994.

CHIANCA, D. A.; MACHADO, B. H. Microinjection of NMDA antagonist into the NTS of conscious rats blocks the Bezold-Jarisch reflex. **Brain Research.** 718: 185-188, 1996.

CHILADAKIS, J. A.; PATSOURAS, N.; MANOLIS, A. S. The Bezold-Jarisch reflex in acute inferior myocardial infarction: clinical and sympathovagal spectral correlates. **Clinical cardiology**. 26(7): 323-328, 2003.

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

DAVIES, R.; AHMED, G.; FREER, T. Chronic exposure to organophosphate: background and clinical picture. **J. Cont. Prof. Develop**. 6: 187-192, 2000.

DAVIES, J.; ROBERTS, D.; EYER, P.; BUCKLEY, N.; EDDLESTON, M. Hypotension in severe dimethoate self-poisoning. **Clin. Toxicol**. 46: 880-884, 2008.

DE BLEECKER, J. The intermediate syndrome in organophosphate poisoning> na overview of experimental and clinical observations. **J. Toxicol. Clin. Toxicol**. 33: 683-686, 1995.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. **Brain Research**. 949: 60-70, 2002.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 20(1): 180-186, 2004.

DETKE, M. J.; RICKELS, M.; LUCKI, I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. **Psychopharmacology**. 121(1): 66-72, 1995.

DHARMANI, C.; JAGA, K. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. **Reviews on environmental health**. 22(1): 57-73, 2007.

DIETZ, A. A.; RUBENSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of sérum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clin. Chem.**, 8: 41-46, 1977.

ECOBICHON, D. J. **Toxic effects of pesticides**. In: Amdur M. O., Doull J., Klaassen C. D., (Ed.) Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons. 4th ed. New York: McGraw Hill; p. 763-810, 2001.

EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; EYER, P.; DAWSON, A. H. Management of acute organophosphate pesticide poisoning. **Lancet**, 371: 597-607, 2008.

EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M. R. Self poisoning with pesticides. **British Medical Journal**. 328: 42-44, 2004.

FARAH, V. M. A.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32: 361-369, 1999.

FILE, S. E.; KENNY, P. J.; OUAGAZZAL, AM. Bimodal Modulation by Nicotine of Anxiety in the Social Interaction Test: Role of the Dorsal Hippocampus. **Behavioral Neuroscience.** 112(6): 1423-1429, 1998.

FILE, S. E.; KENNY, P. J.; CHEETA, S. The Role of the Dorsal Hippocampus Serotonergic and Cholinergic Systems in the Modulation of Anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** 66(1): 65-72, 2000.

FIOCRUZ. Manual de utilização de animais. **Comitê de Ética no uso de animais de experimentação – CEUA.** 1Ed. 2008.

FLETCHER, E. C.; LESSKE, J.; QIAN, W.; MILLAR, C. C.; UNGER, T. Repetitive episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. **Hypert.**, 19: 555-561, 1992.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 42: 63-70, 1993.

FRANQUNI, J. V.; NASCIMENTO, A. M.; LIMA, E. M.; BRASIL, G. A.; HERINGER, O. A.; CASSARO, K. O. S.; CUNHA, T. V. P.; MUSSO, C.; SANTOS, M. C. L. F. S.; KALIL, I. C.; ENDRINGER, D. C.; BOËCHAT, G. A. P.; BISSOLI, N. S.; ANDRADE, T. U. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by na imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. **Steroids.** 78: 379-385, 2013.

FUKUDA, Y.; SATO, A.; TRZEBSKI, A. Carotid chemoreceptor discharge responses to hypoxia and hypercapnia in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 19: 1-11, 1987.

GETACHEW, B.; HAUSER, S. R.; TAYLOR, R. E.; TIZABI, Y. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in Wistar-Kyoto (WKY) and Wistar rats. **Pharm. Biochem. Behav.** 91: 97-103, 2008.

GODOY, M. F.; BRAILE, D. M.; NETO, J. P. Troponina como marcador de injúria miocárdica. **Arq. Bras. Cardiol.**, volume 71, nº 04, 1998.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nature reviews: drug discovery.** 12:667-687, 2013.

HAMM, C. W.; KATUS, H. A. New biochemical markers for myocardial cell injury. **Curr. Opin. Cardiol.** 10: 355-360, 1995.

HANSON, M. A.; FAREED, M. T.; ARGENIO, S. L.; AGUNWAMBA A. O.; HANSON, T. R. Coronary artery disease. **Prim. Care.** 40(1): 1-16, 2013.

HEAD, G. A.; McCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, 21: 203-213, 1987.

HO, Y. J.; EICHENDORFF, J.; SCHWARTING, R. K. W. Individual response profiles of male Wistar rats in animal models for anxiety and depression. **Behav. Br. Res.** 136: 1-12, 2002.

HOWARD, M. D.; POPE, C. N. In vitro effects of Chlorpyrifos, parathion, methyl parathion and their oxons on cardiac muscarinic receptor binding in neonatal and adult rats. **Toxicol.** 170(1-2): 1-10, 2002.

HOWARD, M. D.; MIRAJKAR, N.; KARANTH, S.; POPE, C. N. Comparative effects of oral Chlorpyrifos exposure on cholinesterase activity and muscarinic receptor binding in neonatal and adult rat heart. **Toxicol.** 238: 157-165, 2007.

IDAF-ES. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo. Disponível em: <<http://www.idaf.es.gov.br/Pages/wfHome.aspx>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

JAGA, K.; DHARMANI, C. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. **Reviews on environmental health.** 22(1): 57-73, 2007.

JEYARATNAM, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World Health Stat.** 43: 139-144, 1990.

JOHN, M.; OOMMEN, A.; ZACHARIAH, A. Muscle injury in organophosphorous poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. **Neuro Toxicol.** 24: 43-53, 2003.

JOSHI, P.; MANORIA, P.; JOSEPH, D.; GANDHI, Z. Acute myocardial infarction: can it be a complication of acute organophosphorus compound poisoning? **J. Postgrad. Med.** 59(2): 142-144, 2013.

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

KARA, T.; NARKIEWICZ, K.; SOMERS, V. K. Chemoreflexes-physiology and clinical implications. **Acta Physiol. Scand.** 177(3): 377-384, 2003.

KARASU-MINARECI, E.; GUNAY, N.; MINARECI, K.; SADAN, G.; OZBEY, G. What may be happen after an organophosphate exposure: acute myocardial infarction? **J. For. Leg. Med.** 19: 94-96, 2012.

KELLY, A. E. **Locomotor activity and exploration.** In: Behavioural Neuroscience: a Practical Approach, Vol. II. Ed: Sahgal, A. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 1-21, 1993.

KWONG, T. C. Organophosphate Pesticides: Biochemistry and Clinical Toxicology. **Therapeutic Drug Monitoring**, 24: 144-149, 2002.

LIU, J.; POPE, C. N. Effects of Chlorpyrifos on high-affinity choline uptake and [³H]Hemicholinium-3 binding in rat brain. **Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology**. 34(1): 84-90, 1996.

LONDON, L.; FLISHER, A. J.; WESSELING, C.; MERGLER, D.; KROMHOUT, H. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? **Am. J. Ind. Med.** 47(4): 308-321, 2005.

LÓPEZ-CRESPO, G. A.; CARVAJAL F.; FLORES, P.; SÁNCHEZ-SANTED, F.; SÁNCHEZ-AMATE, M. C. Time course of biochemical and behavioural effects of a single high dose of Chlorpyrifos. **Neurotoxicology**. 28: 541-547, 2007.

LUPINSKI, S. L.; SCHLICKER, E.; PEDZINSKA-BETIUK, A.; MALINOWSKA, B. Acute myocardial ischemia enhances the vanilloid TRPV1 and serotonin 5-HT₃ receptor-mediated Bezold-Jarisch reflex in rats. **Pharm. Rep.** 63: 1450-1459, 2011.

MARETTO, G. X.; NASCIMENTO, C. P.; PASSAMANI, L. M.; SCHENBERG, L. C.; ANDRADE, T. U.; FIGUEIREDO, S. G.; MAUAD, H.; SAMPAIO, K. N. Acute exposure to the insecticide O,S-dimethyl phosphoramidothioate (methamidophos) leads to impairment of cardiovascular reflexes in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 80: 203-207, 2012.

MARSHALL, J. M. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. **Physiological Reviews**, 74: 543-593, 1994.

MÉGARBANE, B. Measurement of cholinesterase activity in poisoning with an organophosphate compound: the clinical approach remains essential. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.** 32(12): 825-826, 2013.

MENA, F.; AZZOPARDI, M.; PFENNIG, S.; RUEPERT, C.; TEDENGREN, M.; CASTILLO, L. E.; GUNNARSSON, J. S. Use of cholinesterase activity as a biomarker of pesticide exposure used on Costa Rica banana plantations in the native tropical fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). **J. Environ. Biol.** 35(1): 35-42, 2014.

MEYRELLES, S. S.; BERNARDES, C. F.; MODOLO, R. P.; MILL, J. G.; VASQUEZ, E. C. Bezold-Jarisch reflex in myocardial infarcted rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 63: 144-152, 1997.

MEYRELLES, S. S.; MAUAD, H.; MATHIAS, S. C.; CABRAL, A. M.; VASQUEZ, E. C. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 73(2-3): 135-142, 1998.

MEYRELLES, S. S.; MILL, J. G.; CABRAL, A.; VASQUEZ, E. C. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 60: 163-168, 1996.

MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; PERES, F.; LIMA, J. S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J. J.; SARCINELLI, P. N.; BATISTA, D. F.; EGLER, M.; FARIA, M. V. C.; ARAÚJO, A. J.; KUBOTA, A. H.; SOARES, M. O.; ALVES, S. R.; MOURA, C. M.;

CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciênc. Saúde Colet.**, São Paulo, v. 7, n. 2, 2002.

MORENO, M.; CAÑADAS, F.; CARDONA, D.; SUÑOL, C.; CAMPA, L.; SÁNCHEZ-AMATE, C.; FLORES, P.; SANCHEZ-SANTED, F. Long-term monoamine changes in the striatum and nucleus accumbens after acute Chlorpyrifos exposure. **Toxic. Lett.** 176: 162-167, 2008.

NURSALIM, A.; SURYAATMADJA, M.; PANGGABEAN, M. Potential clinical application of novel cardiac biomarkers for acute myocardial infarction. **Acta Med. Indones.** 45(3): 240-250, 2013.

O'CONNOR J. C.; ANDRE, C.; WANG, Y.; LAWSON, M. A.; SZEGEDI, S. S.; LESTAGE, J. Interferon-gama and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice response to bacillus Calmette-Guerin. **J. Neurosci.** 29: 4200-4209, 2009.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; ALVES, S. R.; INACIO, A. F.; MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MATTOS, R. C.; FERREIRA, M. F. A.; CUNHAM J. C.; MOREIRA, J. C. Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries. **Hum. Exp. Toxicol.** 19: 173-177, 2000.

O'MALLEY, M. Clinical evaluation of pesticide exposure and poisoning. **Lancet**, 349: 1161-1166, 1997.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 24: 525-529, 1985.

PEOLTTA, V. A.; VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S. Cardiovascular neural reflexes in L-NAME-induced hypertension in mice. **Hypertension**, 38: 555-559, 2001.

POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. **Bratisl. Lek. Listy.** 114(12): 726-734, 2013.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur. J. Pharmacol.** 47: 379-391, 1978.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Europ. J. Pharmacol.** 463: 3-33 (2003).

RAINES, K. W.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. **Developmental Brain Research.** 130: 65-72, 2001.

RECENA, M. C. P.; PIRES, D. X.; CALDAS, E. D. Acute poisoning with pesticides in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Sci. Total Environ.**, 357: 88-95, 2006.

RESSTEL, L. B.; FERNANDES, K. B.; CORRÊA, F. M. Medial pré-frontal córtex modulation of the baroreflex parasympathetic componente in the rat. **Brain Res.** 1015(1-2): 136-144, 2004.

RISHER, J. F.; NAVARRO, H. A., 1997. **Toxicological profile for Chlorpyrifos.** U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services. Atlanta, Georgia, 1997.

ROBERTSON, D.; HOLLISTER, A. S.; FORMAN, M. B.; ROBERTSON, R. M. Reflexes unique to myocardial ischemia and infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 5: 99B-104B, 1985.

ROCHA, E. S.; SWANSON, K. L.; ARACAVA, Y.; GOOLSBY, J. E.; MAELICKE, A.; ALBUQUERQUE, E. X. Paraoxon: Cholinesterase-Independent Stimulation of Transmitter Release and Selective Block of Ligand-Gated Ion Channels in Cultured Hippocampal Neurons. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** 278(3): 1175-1187, 1996.

ROTH, A.; ZELLINGER, I.; ARAD, M.; ATSMON, J. Organophosphates and the heart. **Chest**, 103: 576-582, 1993.

RUIZ-MUÑOZ, A. M.; NIETO-ESCAMEZ, F. A.; AZNAR, S.; COLOMINA, M. T.; SANCHEZ-SANTED, F. Cognitive and histological disturbances after chlopyrifos exposure and chronic alfabeta (1-42) infusions in Wistar rats. **Neurotoxicology**, 32: 836-844, 2011.

RYGULA, R.; ABUMARIA, N.; FLUGGE G.; HIEMKE C.; FUCHS R.; RUTHER E.; HAVEMANN-REINECKE U. Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. **Behav. Pharmacol.** 17: 19-29, 2006.

SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A.; AL-ALI, M. K. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, 77: 461-464, 1997.

SALAZAR, V. C. R. **Investigação de mecanismos bioquímicos e fisiológicos em organismos expostos a anatoxina-a(s).** 2011.187f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) –Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo., 2011.

SÁNCHEZ-AMATE, M. C.; FLORES, P.; SÁNCHEZ-SANTED, F. Effects of Chlorpyrifos in the plus-maze modelo f anxiety. **Beh. Pharm.** 12: 285-292, 2001.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L. Carotid body function in heart failure. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, 157(1):171-185, 2007.

SILVEIRA, C. L. P.; ELDEFRAWI, A. T.; ELDEFRAWI, M. E. Putative M2 muscarinic receptors on rat heart have high affinity for organophosphorus anticholinesterase. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 103: 474-481, 1990.

SINITOX (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas). Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e circunstâncias. Brasil, 2014. Centro de Informações Científica e Tecnológicas (CICT/FIOCRUZ), Rio de Janeiro. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em: 01 mai. 2014.

SLOTKIN, T. A.; TATE, C. A.; RYDE, I. T.; LEVIN, E. D.; SEIDLER, F. J. Organophosphate Insecticides Target the Serotonergic System in Developing Rat Brain Regions: Disparate Effects of Diazinon and Parathion at Doses Spanning the Threshold for Cholinesterase Inhibition. *Environmental Health Perspectives*, 114(10): 1542-1546, 2006.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Developmental exposure to terbutaline and chlorpyrifos, separately or sequentially, elicits presynaptic serotonergic hyperactivity in juvenile and adolescent rats. *Brain Research Bulletin*, 73: 301-309, 2007.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 233: 211-219, 2008.

SOMERS, V. K.; MARK, A. L.; ABOUD, F. M. Potentiation of sympathetic nerve responses to hypoxia in borderline hypertensive subjects. **Hypert.**, 11: 608-612, 1988.

SPYER, K. M. Central nervous integration of cardiovascular control. **J. Exp. Biol.**, 100: 109-128, 1982.

SPYER, K. M. **The central nervous organization of reflex circulatory control.** In: *Central Regulation of Autonomic Functions.* Oxford University Press. Ed: Loewy, A. D.; Spyer, K. M. New York, pp. 168-188, 1990.

SZASZ, G.; GRUBER, W.; BERNT, E. Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions. **Clin. Chem.**, 22: 650-656, 1976.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advan. In Physiol. Edu.** 35: 28-32, 2011.

TRZEBSKI, A.; MALGORZATA, T.; ZOLTOWSKI, M.; PRZYBYLSKI, J. Increased sensitivity of the arterial chemoreceptor drive in young men with mild hypertension. **Cardiovasc. Res.**, 16: 163-172, 1982.

TUNA, B. G.; OZTURK, U. COMELEKOGLU, U.; YILMAZ, B. C. Effects of organophosphate insecticides on mechanical properties of rat aorta. **Physiol. Res.** 60: 39-46, 2011.

UGGERE, T. A.; ABREU, G. R.; SAMPAIO, K. N.; CABRAL, A. M.; BISSOLI, N. S. The cardiopulmonary reflexes of spontaneously hypertensive rats are normalized

after regression of the left ventricular hypertrophy and hypertension. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 33(5): 589-594, 2000.

VASQUEZ, E. C.; MEYRELLES, S. S.; MAUADA, H.; CABRAL, A. M. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30(4): 521-532, 1997.

VERBENE, A. J.; SAITA, M.; SARTOR, D. M. Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone. **Brain Research Reviews**, 41: 288-305, 2003.

WALLACH, J. **Interpretação de exames laboratoriais**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 1358–1359, 2009.

YANG, C. C.; DENG, J. F. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. **J. Chin. Med. Assoc.** 70(11): 467-472, 2007.

YAVUZ T.; DELIBAS N.; YILDIRIM B.; ALTUNTAS I.; CANDIR O.; CORA A.; KARAHAN N.; IBRISIM E.; KUTSAL A. Vascular wall damage in rats induced by organophosphorus insecticide methidathion. **Toxicol. Lett.** 155: 59-64, 2005.

YEN, D. H. T.; YIEN, H. W.; WANG, L. M.; LEE, C. H.; CHAN, S. H. H. Spectral analysis of systemic arterial pressure and heart rate signals of patients with acute respiratory failure induced by severe organophosphate poisoning. **Crit. Care Med.** 28(8): 2805-2811, 2000.

WU, M. L.; DENG, J. F.; TSAI, W. J.; GER, J.; WONG, S. S.; LI, H. P. Food poisoning due to metamidophos – contaminated vegetables. **Clin. Toxicol.** 39(4): 333-336, 2001.

APÊNDICE I

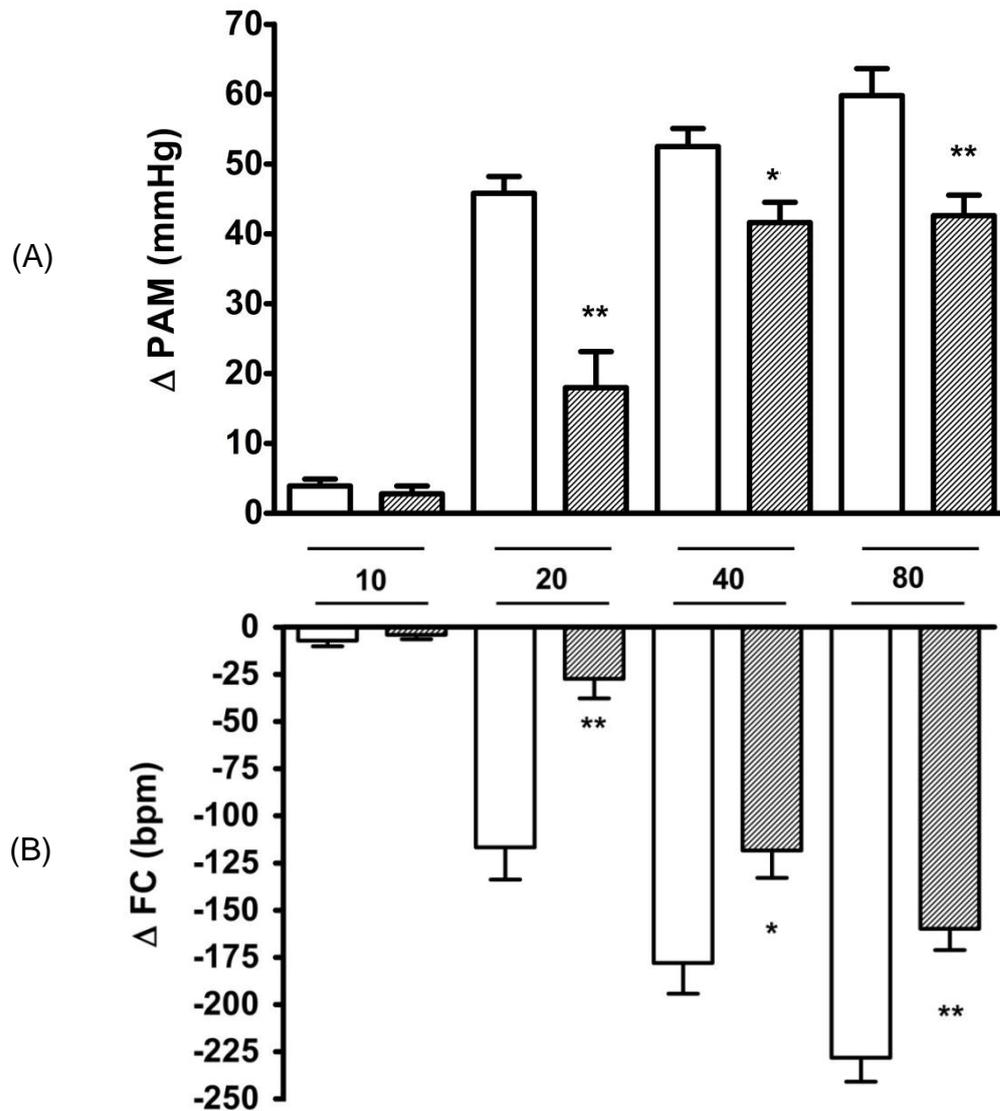


Figura 18. Variação de pressão arterial média (A) e de frequência cardíaca (B) após a ativação do quimiorreflexo por meio da administração de doses crescentes de KCN (10, 20, 40 e 80 µg) em animais tratados com salina (CON, n=10, barras brancas) e com clorpirifós 30 mg/kg (CPF, n=10, barras hachuradas). Os dados foram obtidos por análise manual dos registros cardiovasculares. *p<0,05 e **p<0,01 quando comparados com o grupo controle.

APÊNDICE II

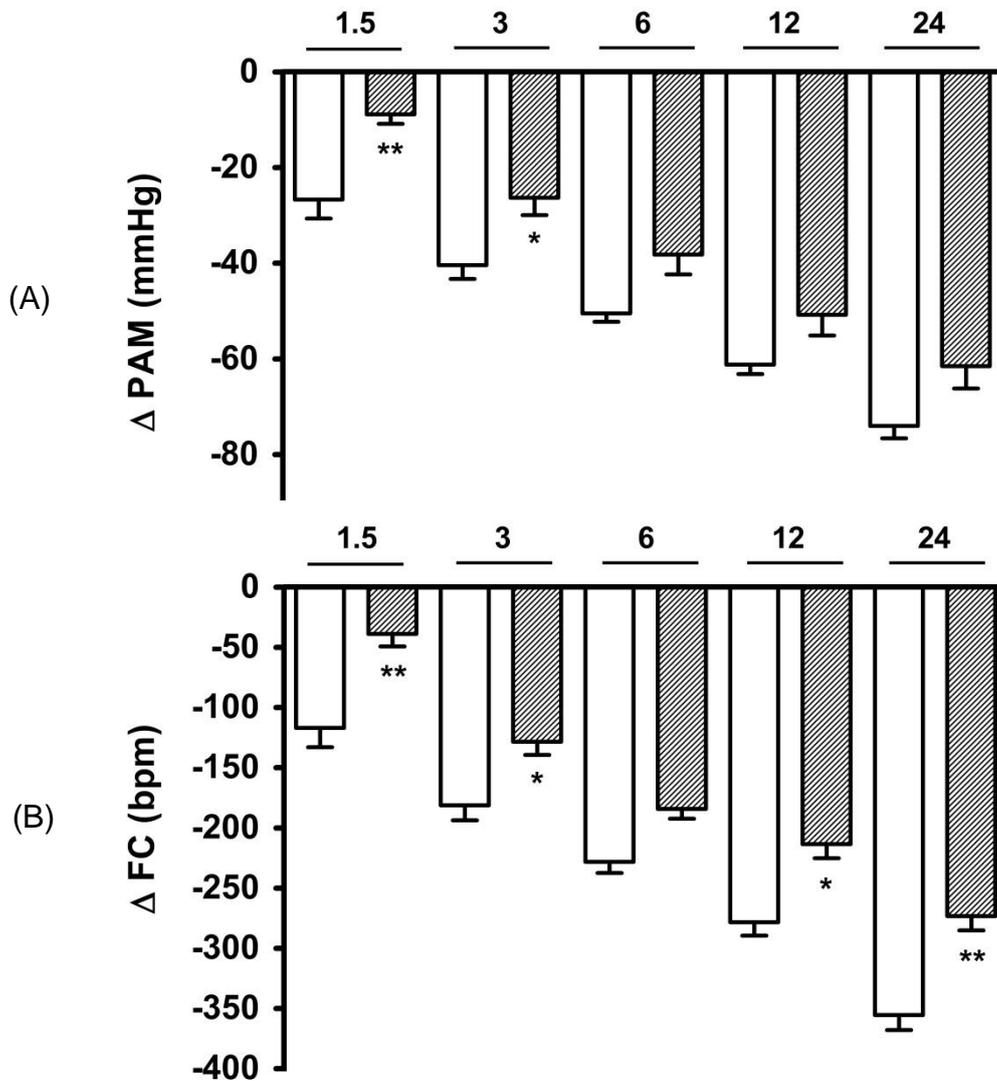


Figura 19. Variação de pressão arterial média (A) e de frequência cardíaca (B) após a ativação do RBJ por meio da administração de doses aleatórias de fenilbiguanida (1,5; 3; 6; 12 e 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em animais tratados com salina (CON, $n=10$, barras brancas) e com clorpirifós 30 mg/kg (CPF, $n=10$, barras hachuradas). Os dados foram obtidos por análise manual dos registros cardiovasculares. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ quando comparados com o grupo controle.

APÊNDICE III

Grupo	PT	PB	Range	Ganho	PA50
CON	433,9 ± 10,32	247,8 ± 10,70	186,0 ± 13,60	-2,77 ± 0,21	105,2 ± 2,27
CPF 30	412,3 ± 16,48	300,8 ± 17,82*	121,6 ± 21,32*	-1,73 ± 0,23*	105,3 ± 4,19

Tabela 10. Parâmetros das curvas sigmóides obtidas pelo método de avaliação do barorreflexo por doses aleatórias para os animais tratados com salina (CON, n=09) ou clorpirifós 30 mg/kg (CPF 30, n=10). *p<0,05 quando comparados com o grupo controle.