

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

IGOR SIMÕES ASSUNÇÃO FELIPPE

Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos da intoxicação aguda com o inseticida organofosforado, clorpirifós, e da eficácia do tratamento farmacológico empregado na intoxicação sobre a modulação cardiorrespiratória tônica e reflexa.

VITÓRIA
2017

IGOR SIMÕES ASSUNÇÃO FELIPPE

Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos da intoxicação aguda com o inseticida organofosforado, clorpirifós, e da eficácia do tratamento farmacológico empregado na intoxicação sobre a modulação cardiorrespiratória tônica e reflexa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karla Nívea Sampaio. Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Beijamini Harres

VITÓRIA

2017

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

F315a Felipe, Igor Simões Assunção, 1990 -
Avaliação *in vitro* e *in vivo* dos efeitos da intoxicação aguda com o
inseticida organofosforado, clorpirifós, e da eficácia do tratamento
farmacológico empregado na intoxicação sobre a modulação
cardiorrespiratória tônica e reflexa / Igor Simões Assunção Felipe – 2017.
158 f. : il.

Orientador: Karla Nívea Sampaio.

Coorientador: Vanessa Beijamini Harres.

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

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

CDU: 61

Igor Simões Assunção Felipe

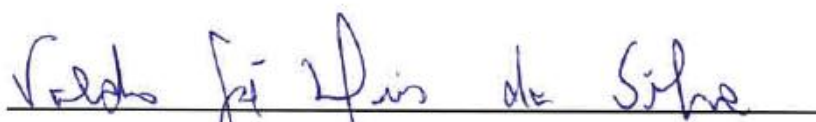
**"AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS EFEITOS DA
INTOXICAÇÃO AGUDA COM O INSETICIDA
ORGANOFOSFORADO, CLORPIRIFÓS, E DA EFICÁCIA DO
TRATAMENTO FARMACOLÓGICO EMPREGADO NA
INTOXICAÇÃO SOBRE A MODULAÇÃO
CARDIORRESPIRATÓRIA TÔNICA E REFLEXA"**

Trabalho de Dissertação de Mestrado aprovado em 08/08/2017 para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Espírito Santo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Julian Francis Richmond Paton / University of Bristol


Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva / (UFTM)

Profa. Dra. Karla Nívea Sampaio - (orientadora) / UFES

Vitória

2017

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois foi ele quem muitas vezes me guiou e me mostrou o caminho, mesmo que por algum momento não tenha sido aquele que planejei; no final se mostrou o caminho correto.

À minha mãe Eliane, aos meus avós José Nicomedes e Dalva, assim como toda minha família, por todo carinho e suporte ao longo de vários anos.

Aos “migos lab” dos laboratórios de “Investigação Fármaco-Toxicológica da Função Cardiovascular” e de “Psicofarmacologia”.

Agradeço também a todos os funcionários da UFES por todos esses anos e ajuda. Em especial ao Rodolfo e todos os funcionários do Biotério.

Aos amigos Guto, Vitor, Wanderson, Xandão, Marcelo, Rovená, Susi, Yuri, Kainá e tantos outros.

Gostaria de agradecer muito à professora Vanessa Beijamini Harres, por todos esses anos de ensinamento e amizade. Sem o auxílio da senhora eu não teria conseguido terminar essa dissertação. Além disso, de ter me passado um pouquinho do gosto e de seus conhecimentos sobre análise de dados e estatística.

Por fim, gostaria de agradecer em especial à minha orientadora, Karla Nívea Sampaio por todos esses anos de paciência, amizade e conhecimento. Eu devo muito da minha vida profissional e acadêmica a senhora. Cada conselho e ensinamento ao longo desses anos eu guardo de coração para o resto da vida. Você sabe o carinho e o apreço que tenho pela senhora, que com certeza não é apenas minha orientadora, para mim a senhora é minha família. Muito obrigado!!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS, QUADROS E FÓRMULAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS	18
RESUMO.....	22
ABSTRACT	25
1. INTRODUÇÃO	27
1.1. DEFINIÇÃO	27
1.2. MERCADO MUNDIAL E BRASILEIRO	28
1.3. COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS	30
1.3.1. História dos inseticidas organofosforados	30
1.3.2. Epidemiologia das intoxicações	31
1.3.3. Química e toxicologia dos inseticidas organofosforados	32
1.3.4. Quadro clínico das intoxicações por organofosforados	34
1.4. ORGANOFOSFORADOS E SISTEMA CARDIOVASCULAR	35
1.5. REFLEXOS NEURAIS E O SISTEMA CARDIORESPIRATÓRIO.....	36
1.6. ORGANOFOSFORADOS E OS REFLEXOS CARDIOVASCULARES	43
1.7. TRATAMENTO PADRÃO EM INTOXICAÇÕES POR ORGANOFOSFORADOS	44
1.8. CLORPIRIFÓS	46
2. OBJETIVOS	50
3. MÉTODOS	52
3.1. ANIMAIS.....	52
3.2. PRODUTO QUÍMICO.....	52
3.3. DELINEAMENTO DO PROTOCOLO <i>IN VITRO</i>	53
3.4. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADO (WHBP)	54
3.4.1. Cirurgia e isolamento dos nervos	54
3.4.2. Protocolo experimental na WHBP	57

3.4.3. Atividades dos nervos frênico, laríngeo recorrente, simpático torácico e acoplamento simpato-respiratório.....	58
3.4.4. Quimiorreflexo	59
3.4.5. Barorreflexo	60
3.4.6. Modulação da atividade simpática e parassimpática	60
3.5. DELINEAMENTO DO MODELO ANIMAL <i>IN VIVO</i>	62
3.5.1. Grupos de tratamento e doses adotadas:	62
3.6. ENSAIOS CARDIORESPIRATÓRIOS:	63
3.6.1. Canulação da artéria e veia femoral.....	63
3.6.2. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	65
3.6.3. Avaliação do quimiorreflexo	65
3.6.4. Análise da frequência respiratória (f_R)	67
3.6.5. Análise do volume corrente e do volume minuto nos animais	67
3.7. DOSAGENS ENZIMÁTICAS	69
3.7.1. Obtenção e processamento das amostras de plasma para dosagem da BuChE	69
3.7.2. Determinação da atividade da colinesterase plasmática (BuChE)	69
3.7.3. Obtenção e processamento das amostras do tronco encefálico para dosagem da AChE cerebral	70
3.7.5. Determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE)	72
3.7.3. Obtenção e processamento dos <i>punchs</i> de cortes do tronco encefálico contendo as amostras dos núcleos ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.	73
3.8. ANÁLISE DOS DADOS.....	76
3.8.1. Análise da atividade basal dos nervos frênico, laríngeo recorrente, acoplamento simpato-respiratório, atividade do barorreflexo, modulação simpática e parassimpática e atividade das enzimas BuChE e AChE na WHBP.....	76
3.8.2. Análise da atividade do quimiorreflexo na WHBP	76
3.8.5. Análise dos parâmetros de avaliação da toxicidade aguda no modelo <i>in vivo</i>	77
3.8.6. Análise dos valores das pressões arteriais médias e frequências cardíacas basais.	78
3.8.7. Análise das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo <i>in vivo</i>	79
3.8.8. Análise do volume corrente (V_T), volume minuto (V_E) e frequência respiratória basal (f_R) no modelo <i>in vivo</i>	79
3.8.9. Análise da resposta taquipneica do quimiorreflexo	80

3.8.11. Análise das atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) do modelo <i>in vivo</i>	81
3.8.12. Análise das atividades da acetilcolinesterase nos <i>punchs</i> de cortes do tronco encefálico contendo núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.	82
4. RESULTADOS	84
4.1. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADO (WHBP)	84
4.1.1. Atividade basal do nervo frênico (PNA).....	84
4.1.2. Atividade basal do nervo laríngeo recorrente (RLN)	86
4.1.3. Acomplamento simpato-respiratório.....	88
4.1.3. Quimiorreflexo na WHBP	90
4.1.4. Barorreflexo na WHBP	92
4.1.5. Modulação simpática e parassimpática na WHBP	93
4.2. MODELO ANIMAL <i>IN VIVO</i>	95
4.2.1. Avaliação da toxicidade aguda.....	95
4.2.2. Avaliação das pressões arteriais médias e frequências cardíacas basais.....	103
4.2.3. Avaliação da resposta cardiovascular do quimiorreflexo.....	104
4.1.3. Avaliação dos parâmetros respiratórios basais	106
4.1.4. Avaliação da resposta taquipneica do quimiorreflexo <i>in vivo</i>	108
4.3. DOSAGENS ENZIMÁTICAS	112
4.3.1. Atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) na preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP)	112
4.3.2. Atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) do modelo <i>in vivo</i>	113
Post Hoc de Bonferroni ** $P < 0,01$	114
Post Hoc de Bonferroni * $P < 0,05$	115
4.3.3. Atividade da acetilcolinesterase nos <i>punchs</i> de cortes do tronco encefálico contendo núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.	115
5. DISCUSSÃO	118
6. CONCLUSÃO.....	130
7. REFERÊNCIAS.....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisão do mercado mundial de agrotóxicos em 2010 (total: 38,3 bilhões).	29
Figura 2: Estimativa da participação do Brasil e EUA no mercado mundial de agrotóxicos em 2010.	29
Figura 3: Estrutura química básica de inseticidas organofosforados.	32
Figura 4: Compostos derivados de ácido fosfórico encontrados em inseticidas organofosforados.	32
Figura 5: Esquema de uma sinapse colinérgica. A: Acetil; AChE: acetilcolinesterase; Ch: colina; ChAT: acetilcolina transferase; ChT: transportador de colina; CoA: coenzima A; mAChR: receptor muscarínico; nAChR: receptor nicotínico.	33
Figura 6: Esquema mostrando as vias de conexão após ativação do barorreflexo, frente a um aumento de pressão arterial. NTS= núcleo do trato solitário, Amb= núcleo ambíguo, CVLM= bulbo ventrolateral caudal, RVLM= bulbo ventrolateral rostral, ILM= coluna intermediolateral.	37
Figura 7: Esquema mostrando as vias de conexão após ativação do quimiorreflexo frente a uma situação de hipóxia. NTS= núcleo do trato solitário, Amb= núcleo ambíguo, CVLM= bulbo ventrolateral caudal, RVLM= bulbo ventrolateral rostral, ILM= coluna intermediolateral.	39
Figura 8: Principais núcleos cardiorrespiratórios responsáveis pela geração do ritmo respiratório. O ciclo respiratório, baseado no padrão de disparo do nervo frênico, é dividido em 3 fases, de acordo com o padrão de despolarização de membrana de neurônios presentes dentro do tronco encefálico responsáveis pela geração de cada fase: inspiração (salmão), pós-inspiração (verde) e expiração (azul). Os núcleos, complexo Bötzinger e pré-Bötzinger estariam associados com a geração da fase inspiratória do ciclo, enquanto que os núcleos retrotrapezóide e parafacial estariam associados com a geração da fase de expiração do ciclo.	40
Figura 9: A. Localização anatômica do nervo laríngeo recorrente. B. Padrão de disparo bifásico do nervo laríngeo recorrente e sua associação com a contração dos músculos abdutores (inspiração) e adutores (pós-inspiração) da glote. RLN= Nervo Laringeo Recorrente; PNA = Atividade do nervo Frênico.	42

Figura 10: Acoplamento simpato-respiratório. Registros dos nervos simpático cardíaco (CN), simpático renal (RN), quinto nervo intercostal interno (Exp. FIL T ₅) e nervo frênico (PN), mostrando os disparos simpáticos ocorrendo nas fases L-I do frênico e E-2 do ciclo.....	43
Figura 11: Ação da pralidoxima reativando o sítio ativo da acetilcolinesterase inibida por um composto organofosforado.....	45
Figura 12: Estrutura química do inseticida organofosforado clorpirifós.	47
Figura 13: Delineamento do protocolo <i>in vitro</i> envolvendo a preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP).. CPF= clorpirifós.....	53
Figura 14: A. Mesa de registro circundada por gaiola de Faraday utilizada na execução da preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP). B. Câmara de registro demonstrando o cateter de duplo lúmen inserido na aorta descendente.	55
Figura 15: Registro típico da atividade basal dos nervos frênico (PNA), laríngeo recorrente (RLN) e simpático torácico (SNA), bem como do eletrocardiograma (ECG) e da pressão de perfusão (PP). A frequência cardíaca (FC) foi derivada do ECG, e as atividades integradas, identificados pelo o símbolo “J”, foram derivadas do respectivo registro basal de cada nervo por meio do software spike2 (CED).	56
Figura 16: Protocolo de experimento na preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP) indicando os tempos de intervalo e a sequência adotada.....	57
Figura 17: Traçado típico de um animal controle ilustrando a resposta induzida frente estimulação do quimiorreflexo com KCN (100 µg) na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA- Atividade do simpático torácico, J SNA – Atividade simpático torácico integrado, RLN – Nervo laríngeo recorrente, JRLN – Nervo laríngeo recorrente integrado, PNA – Atividade basal dos nervos frênico, JPNA – Atividade basal dos nervos frênico integrado e PP– Pressão de perfusão.	59
Figura 18: Traçado típico de um animal controle ilustrando a resposta induzida frente estimulação do barorreflexo com fenilefrina (30 µg) na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA - Atividade do simpático torácico, J SNA – Atividade simpático torácico integrado e PP – Pressão de perfusão.	60

Figura 19: Traçado típico ilustrando a secção bilateral do nervo vago em animais na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, RLN – Nervo laríngeo recorrente e ∫RLN – Nervo laríngeo recorrente integrado.....	61
Figura 20: Traçado típico ilustrando os efeitos dos bloqueios com atenolol e hexametônio na preparação tronco-cerebral coração isolados (WHBP) sobre a atividade simpática (% inibição da tSNA) e sobre a frequência cardíaca (Δ FC). ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA- Atividade do simpático torácico, ∫SNA – Atividade simpático torácico integrado.	61
Figura 21: Curso temporal dos tratamentos.	62
Figura 22: Curso temporal dos experimentos.....	63
Figura 23: Cirurgia de canulação da artéria e veia femoral.	64
Figura 24: Rato Wistar dentro da câmara pletismográfica que permitia o registro dos parâmetros respiratórios.....	66
Figura 25: Traçado típico da resposta do quimiorreflexo frente ativação com solução de cianeto de potássio (KCN) <i>in vivo</i> . PAP= Pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca, PAM= Pressão arterial média.	67
Figura 26: Esquema ilustrativo mostrando o local onde foi feito o corte na região mais anterior do tronco encefálico. Setas em cinza indicam a direção em que ocorreu a elevação no mesencéfalo para que fosse feito o corte; Linha em preto indica o caminho feito pelo corte transversal.....	71
Figura 27: Foto do tronco encefálico de um animal após procedimento de remoção descrito.....	71
Figura 28: Figura esquemática mostrando os locais dos cortes executados para obtenção posterior dos <i>punchs</i> tendo-se como referência o Obex. Primeiro corte contendo 2 mm e segundo 1 mm de espessura.....	74
Figura 29: Figura esquemática mostrando os cortes usados para obtenção dos <i>punchs</i> , com as respectivas identificações referentes aos núcleos obtidas do Atlas de Paxinos e Watson. Corte da direita: espessura de 2 mm, corte da esquerda: espessura de 1 mm. NTS= núcleo do trato solitário, RVLM/preBötC= bulbo rostral ventrolateral junto ao complexo Pré-Bötzinger e Amb= núcleo ambíguo.	75

Figura 30: Parâmetros derivados da atividade basal do nervo frênico. a) frequência de disparo (f-PNA), b) tempo de inspiração (TI), c) tempo de expiração (TE), d) tempo do ciclo respiratório total (Ttot), e) amplitude do pico inspiratório (P-AMP), f) tempo para o pico inspiratório (T-P), g) área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e h) área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI). * P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle.....85

Figura 31: Traçado típico de animais dos grupos controle e intoxicado (CPF) mostrando os disparos dos nervos laríngeo recorrente (RLN) e frênico (PNA). Note o prejuízo observado no post-I do RLN. [RLN- Nervos laríngeo recorrentes integrados e]PNA – Atividade do nervo frênico integrado.....86

Figura 32: Parâmetros derivados da atividade basal do nervo laríngeo recorrente. a) Área sob a curva na inspiração (AUC-I), b) Área sob a curva na inspiração normalizada pelo TI (AUC-I:TI), c) área sob a curva no P-I do RLN (AUC-PI), d) Área sob a curva no P-I normalizada pelo tempo de E1 (AUC-PI:E1), e) Duração do P-I (Dur-PI), f) Relação da duração do P-I pelo TE (Dur-PI:TE) g) Pico do P-I.....87

Figura 33: Registro típico de um animal mostrando as atividades basais dos nervos, frênico (PNA), laríngeo recorrente (RLN) e simpático torácico (tSNA), bem como a análise integrada do acoplamento simpato-respiratório no canal “] tSNA acoplado”. Demais canais referem-se ao eletrocardiograma (ECG), frequência cardíaca (FC) derivada do ECG e pressão de perfusão (PP).89

Figura 34: Traçado típico de animais controle e intoxicados (CPF) mostrando as respostas do quimiorreflexo frente a estimulação com cianeto de potássio (KCN – 0,03%; 50, 75 e 100 µL) na preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP). Nervo frênico (]PNA), simpático torácico (]tSNA), pressão de perfusão (PP) e frequência cardíaca (FC).90

Figura 35: Respostas do quimiorreflexo frente estimulação com KCN (50 µL, 75 µL, 100 µL). a) Variação da pressão de perfusão (Δ Resposta Pressora), b) Atividade simpática expressa em percentual de ativação (Simpatoexcitação %), c) Variação de frequência cardíaca (Δ FC) e d) Frequência respiratória derivada da taxa de disparo do nervo frênico (Taxa de Disparo do Nervo Frênico %). Análise através de modelo linear misto ou modelo generalizado misto (GLMM). **P<0,01 indica diferença estatisticamente significativa entre CPF e controle, indicado pela análise Post hoc de Bonferroni para interação entre os fatores dose e tratamento.91

Figura 36: Respostas induzidas pela ativação do barorreflexo com injeções <i>in bolus</i> de fenilefrina (30 µg) em animais controle e intoxicados (CPF). a) Ganho simpático (% inibição/mmHg), b) Variação da Pressão de Perfusão (Δ Resposta Pressora, em mmHg), c) Ganho bradicárdico (bpm/mmHg) d) Percentual de inibição da resposta simpática (% inibição tSNA), e e) Variação de Frequência Cardíaca (Δ FC). Análise realizada através de teste <i>t</i> -Student não pareado. ** $P < 0,01$; CPF VS Controle.	92
Figura 37: Variação de frequência cardíaca (Δ FC) em animais controle e intoxicados (CPF) após secção bilateral dos nervos vagos. Teste <i>t</i> -Student ** $P < 0,01$ indica diferença entre o grupo CPF e controle.	93
Figura 38: Efeitos do bloqueio com atenolol sobre a atividade simpática (% inibição da tSNA) (Painel A) e sobre a frequência cardíaca (Δ FC) (Painel B) em animais controle e intoxicados (CPF). Teste <i>t</i> -Student.....	94
Figura 39: Efeitos do bloqueio com hexametônio sobre a atividade simpática (% inibição tSNA) (Painel A), frequência cardíaca (Δ FC) (Painel B) e pressão de perfusão (PP) (Painel C) em animais controle e intoxicados (CPF). Teste <i>t</i> -Student, * $P < 0,05$ CPF vs Controle.	94
Figura 40: Curso temporal das manifestações de toxicidade aguda para as diferentes combinações de tratamento com clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). a) Ataxia. b) Tremor. c) Sialorreia.....	96
Ajuste de Bonferroni para dose de 80 µg de KCN.	106
Figura 44: Painel a) Atividade da butirilcolinesterase (BuChE, em plasma) entre os grupos controle (n= 6) e CPF (Clorpirifós, 30 mg/Kg, n= 7). *** $P < 0,001$ vs controle. teste U de Mann Whitney. Painel b) Atividade da AChE no tronco encefálico de ratos controle (n= 5) e CPF (Clorpirifós, 30 mg/Kg, n= 5) *** $P < 0,001$ vs controle. Teste <i>t</i> -Student não pareado.....	113
Figura 45: Atividade da butirilcolinesterase (BuChE, em plasma) antes e após os tratamentos com as diferentes combinações entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 10), CPF (n= 13), CPF + ATR (n= 10), CPF + 2-PAM (n= 11), CPF + ATR + 2-PAM (n= 12), Salina + ATR (n= 8), Salina + 2-PAM (n= 7), Salina + ATR + 2-PAM (n= 7).	114
Figura 46: Atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE, em tronco encefálico) após os tratamentos com as diferentes combinações entre clorpirifós (CPF), atropina	

(ATR) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 9), CPF (n= 11), CPF + ATR (n= 10), CPF + 2-PAM (n= 10), CPF + ATR + 2-PAM (n= 10), Salina + ATR (n= 9), Salina + 2-PAM (n= 9), Salina + ATR + 2-PAM (n= 9).115

Figura 47: Painei a) Atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE) nos *punchs* contendo os principais núcleos cardiorespiratórios após os tratamentos combinados entre clorpirifós (CPF) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 6), CPF (n= 7), CPF + 2-PAM(n= 10), CPF + 2-PAM (n= 7). Painei b) Representação gráfica mostrando a interação entre o fator tratamento com CPF e os *punchs* contendo os núcleos responsáveis pelas respostas cardiorespiratórias.....116

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FÓRMULAS

Tabela 1: Participação da agricultura no PIB.....	28
Tabela 2. Sinais observados em pacientes intoxicados de forma aguda por organofosforados.	34
Tabela 3: Resultados da análise estatística dos parâmetros derivados da atividade basal do nervo frênico (PNA).	86
Tabela 4: Resultados da análise estatística para os parâmetros derivados da análise da atividade basal do nervo laríngeo recorrente (RLN).	88
Tabela 5: Resultados dos parâmetros basais do acoplamento simpato-respiratório.	89
Tabela 6: Resultados da análise estatística dos efeitos fixos para as variáveis medidas frente ativação do quimiorreflexo.	91
Tabela 7: Resultados da análise estatística para o barorreflexo.	93
Teste <i>t</i> -Student não pareado. ** $P < 0,01$	93
Tabela 8: Resultados da análise estatística para os bloqueios com atenolol e hexametônio e para a vagotomia bilateral.....	95
Tabela 9: Resultados da análise estatística para ataxia nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação <i>logit</i> acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.....	97
Tabela 10.a: Parâmetros estimados para manifestação de ataxia pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.	98
** $P < 0,01$. Categoria de referência: Ausente. OR= <i>odds ratio</i> . CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.	98
Tabela 11: Resultados da análise estatística para o tremor nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação <i>logit</i> acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.	99

Tabela 12: Parâmetros estimados para manifestação de tremor pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.	100
**P<0,01. Categoria de referência: Ausente. OR= <i>odds ratio</i> . CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.	
Tabela 13: Resultados da análise estatística para sialorreia nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação <i>logit</i> acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.	101
Tabela 14: Parâmetros estimados para manifestação de sialorreia pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.	102
**P<0,01. Categoria de referência: Ausente. OR= <i>odds ratio</i> . CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.	
Tabela 15: Valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basal para os diferentes grupos de tratamento.	103
Tabela 16: Resultados dos efeitos fixos e interações que apresentaram significância estatística pelas análises dos modelos lineares gerais (GLM) para pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), referente as diferentes combinações de tratamento com clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) no protocolo <i>in vivo</i>	104
Tabela 17: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF) e atropina (ATR).	106
Tabela 18: Análise post hoc da interação entre as doses de KCN, a intoxicação com clorpirifós (CPF) e o tratamento com atropina (ATR).	106
Tabela 18: Volumes respiratórios corrente (V_T) e minuto (V_E)	107
Tabela 20: Análise post hoc da interação entre atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) para o volume corrente.....	107
Tabela 21: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando animais intoxicados com animais não intoxicados com CPF para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.....	111

Tabela 22: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando animais que receberam ATR com animais que não receberam ATR para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.	111
Tabela 23: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando os animais que receberam 2-PAM com animais que não receberam 2-PAM para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.....	112
Tabela 24: Análise post hoc da interação entre CPF e tempo para a análise da atividade da butirilcolinesterase.	114
Tabela 25: Análise post hoc da interação entre atropina e pralidoxima para a atividade da acetilcolinesterase.....	115
Quadro 1. Quadro para coleta de dados de ensaios de toxicidade aguda.	63
Fórmula 1: Fórmula para avaliação dos parâmetros respiratórios	68
Fórmula 2: Fórmula para o cálculo da atividade da BChE	70
Fórmula 4: Fórmula para o cálculo da atividade da AChE em função da quantidade de proteína	73

LISTA DE ABREVIATURAS E/ OU SIGLAS

ACh – Acetilcolina;

AChE – Acetilcolinesterase;

AENDA - Associação Brasileira dos Defensivos Genéricos;

AIC – Critérios de informações de Akaike;

Amb- núcleo ambíguo;

ANOVA – Análise de variância;

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ATP – Adenosina trifosfato;

ATR - Atropina;

CEUA-UFES - Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFES;

BuChE - Butirilcolinesterase plasmática;

CNA - Confederação Nacional da Agricultura;

CPF – Clorpirifós;

CPO – Clorpirifós-oxon;

CVD – Doenças cardiovasculares;

CVLM – Bulbo ventrolateral caudal;

DDSIV - Departamento de defesa sanitária e inspeção vegetal;

DL50 – Dose Letal mediana é a dose capaz de matar 50% de uma população;

DTNB – Ácido ditiobisnitrobenzóico;

DVMN –Núcleo dorsal motor do vago;

ECG – Eletrocardiograma;

E-I – Início da inspiração;

EUA - Estados Unidos da América;

E-1 - Fase 1 da expiração;

E-2 – Fase 2 da expiração;

FC – Frequência cardíaca;

f_R – Frequência respiratória;

GA – Tabun;

GB – Sarin;

GD – Soman;

GEE- Equações de estimações generalizadas (*Generalized Estimating Equations*)

GLM – Modelo linear geral;

GLzM – modelo linear generalizado;

GLMM – Modelo generalizado misto;

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;

IDAF - Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo;

IML- Coluna intermédio-lateral;

i.p.- Intraperitoneal;

KCN – Cianeto de potássio;

L-I – Fase tardia da inspiração;

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

MMA - Ministério do Meio Ambiente;

MS - Ministério da saúde;

NO – Óxido nítrico;

NPGP – Neurônios pré-ganglionares parassimpáticos;

NPGS - Neurônios pré-ganglionares simpáticos;

NTS – Núcleo do trato solitário;

OF – Organofosforado;

OMPA – Octametilpirofosfato;

OPIDN - Neuropatia tardia induzida por organofosforados;

WHBP – Preparação tronco cerebral-coração isolado;

PA – Pressão arterial;

PAM – Pressão arterial média;

PAP – Pressão arterial pulsátil;

PNA – Atividade do nervo frênico;

PND - Plano Nacional de Desenvolvimento;

PIB - Produto Interno Bruto;

preBötC – Complexo pré-Bötzinger;

QIC - Quase verossimilhança sob o modelo de independência;

RVLM –Bulbo ventrolateral rostral;

r-I – inspiração da fase de rampa;

RLN –Nervo laringeo recorrente;

SCNN – Sistema colinérgico não-neuronal

SEAG - Secretaria de estado da agricultura, abastecimento, aquicultura e pesca do estado do Espírito Santo;

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas;

SNA – Sistema Nervo autônomo;

SNC – Sistema Nervoso Central;

SNCR - Sistema Nacional de Crédito Rural;

SNP - Sistema Nervoso Parassimpático;

SNS- Sistema Nervoso Simpático;

tSNA – Atividade do nervo simpático torácico;

TOXCEN - Centro Toxicológico do Espírito Santo;

U - Unidade de colinesterase corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato/minuto/mL de soro, a 37°C;

UFES - Universidade Federal do Espírito Santo;

UI - Unidade Internacional;

VE – Volume minuto;

VT – Volume corrente;

VRC – Coluna respiratória ventral;

ΔA - Variação de absorbância;

2-PAM – pralidoxima;

Resumo

RESUMO

No Brasil, o uso de agrotóxicos cresceu bastante nos últimos anos, tornando o país um dos líderes mundiais em seu consumo. Os organofosforados (OFs) têm sido associados a doenças cardiovasculares e a intoxicações por esses compostos apresenta uma alta taxa de mortalidade. Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram prejuízos nas respostas reflexas do barorreflexo e do quimiorreflexo em ratos expostos agudamente a um composto OF, o clorpirifós (CPF). Todavia, neste estudo não foi possível realizar uma abordagem dos efeitos da exposição aguda a este agente sobre a função respiratória, a despeito da importante modulação que os reflexos, particularmente o quimiorreflexo, exercem sobre esses parâmetros. Considerando a importância da função cardiorrespiratória na sobrevivência dos indivíduos intoxicados, estudos mais detalhados investigando os efeitos da exposição ao CPF tanto *in vitro*, quanto *in vivo* sobre a modulação cardiorrespiratória tônica e reflexa se fazem necessários. Adicionalmente, a controvérsia envolvendo o tratamento padrão empregado na intoxicação por OF e a ausência de estudos com enfoque voltado para o efeito do mesmo sobre a restauração dos danos cardiovascular gerados, reforça ainda mais a importância de estudos voltados para se investigar essa questão. No presente estudo foram executados protocolos *in vitro* e *in vivo* visando avaliar os efeitos da intoxicação aguda com CPF sobre a atividade cardiorrespiratória tônica e reflexa, e visando avaliar se o tratamento farmacológico com os antídotos atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) era capaz de reverter os prejuízos previamente observados sobre a função quimiorreflexa. Dois grupos (CPF e controle) foram submetidos ao protocolo *in vitro* envolvendo a preparação tronco cerebral-coração isolados (WHBP). Nesta preparação as atividades basais dos nervos frênico (PNA), laringeo recorrente (RLN), simpático torácico (tSNA), além da frequência cardíaca e pressão de perfusão foram registradas. Associados a estes registros foi promovida a ativação *in situ* do quimiorreflexo e barorreflexo, seguida da vagotomia bilateral e dos bloqueios com atenolol e hexametônio. No modelo *in vivo* os animais foram agrupados em diferentes combinações de tratamentos com CPF, ATR e 2-PAM, vinte e quatro horas antes dos registros e da ativação do quimiorreflexo. A presença dos sinais de intoxicação, ataxia, tremor e sialorreia, foi avaliada durante três horas após as injeções com CPF ou salina e os tratamentos com ATR e 2-PAM. Para ambos modelos *in vitro* e *in vivo*, as atividades das enzimas

butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase (AChE) cerebral do tronco encefálico, foram quantificadas. Adicionalmente, no protocolo *in vivo*, *punchs* de cortes do tronco encefálico contendo os núcleos ambíguo, bulbo ventrolateral rostral (RVLM), complexo pré-Bötzinger (preBöTC) e núcleo do trato solitário (NTS) foram coletados para quantificação individualizada das atividades da AChE cerebral. Nossos dados mostraram que a exposição aguda ao CPF levou a um prejuízo da resposta do quimiorreflexo tanto no modelo *in vitro*, quanto no modelo *in vivo*. Adicionalmente no estudo *in vitro*, também foi observado um prejuízo barorreflexo identificado pela menor inibição da atividade simpática induzida pela ativação reflexa em animais intoxicados. No plano respiratório foi observado um prejuízo da amplitude de disparo do PNA e da amplitude da descarga pós-inspiratória do RLN nos animais intoxicados quando comparados aos animais controle avaliados na WHBP. Os animais intoxicados com CPF também apresentaram uma maior taquicardia pós-seção vagal quando comparada aos animais controle. O bloqueio com hexametônio promoveu um aumento na pressão de perfusão de animais intoxicados com CPF. No modelo *in vivo*, os efeitos do tratamento com os antídotos ATR e 2-PAM sobre as respostas promovidas pela ativação do quimiorreflexo em animais intoxicados foram diferenciados para cada componente da resposta. O tratamento com a 2-PAM restaurou o prejuízo observado sobre a resposta pressora do quimiorreflexo em animais intoxicados com CPF. Já o tratamento com atropina promoveu uma atenuação do prejuízo induzido pela intoxicação sobre a resposta bradicárdica do quimiorreflexo. Ambos tratamentos parecem exercer um efeito protetor sobre a resposta taquipneica do quimiorreflexo. Todos os animais intoxicados apresentaram uma marcante inibição da atividade das enzimas butirilcolinesterase plasmática e acetilcolinesterase tanto no tronco encefálico quanto nos *punchs* isolados. Animais intoxicados com CPF também exibiram sinais de intoxicação aguda, que foram atenuados ou abolidos pelos tratamentos com os antídotos. Nossos dados indicam que a intoxicação com CPF promove um prejuízo das respostas reflexas do quimio e do barorreflexo e que os tratamentos com os antídotos parecem restaurar parte do prejuízo observado no plano cardiorespiratório.

Palavras-chave: clorpirifós, quimiorreflexo, barorreflexo, atropina, 2-PAM, BuChE, AChE, respiratório.

Abstract

ABSTRACT

In Brazil, the usage of agrochemicals has grown significantly in recent years, making the country one of the world leaders in consumption. Organophosphates (OPs) have been associated with cardiovascular diseases and intoxication induced by these compounds has a high mortality rate. Previous studies from our laboratory have shown that acute exposure to an OP compound, chlorpyrifos (CPF), in rats impairs the cardiovascular responses of the baroreflex and chemoreflex. However, it was not possible to address in this study the effects induced by the exposure to this compound on the respiratory function, despite the important modulation that the cardiovascular reflexes, particularly the chemoreflex, exert on respiratory parameters. Considering that the cardiorespiratory function plays a major role in the survival of intoxicated individuals, it seems of pivotal importance the development of detailed studies, using *in vitro* and *in vivo* approaches, to investigate the effects of CPF exposure on the tonic and reflex cardiorespiratory modulation. Additionally, the present controversy surrounding the standard treatment adopted in OP intoxication and the absence of studies focusing on antidote treatment and restoration of OP-induced cardiovascular damage, further reinforces the importance of studies in the field. In the present study, *in vitro* and *in vivo* protocols were used to evaluate the effects of acute intoxication with CPF on tonic and reflex cardiorespiratory activity and to evaluate whether the pharmacological treatment with the antidotes atropine (ATR) and pralidoxime (2-PAM) was capable of reversing the damage on the chemoreflex function previously observed. Two groups (CPF and control) were submitted to the *in vitro* protocol involving the working heart-brain stem preparation (WHBP). In this preparation, basal activities of the phrenic (PNA), recurrent laryngeal (RLN) and thoracic sympathetic (tSNA) nerves, in addition to heart rate and perfusion pressure were recorded. Associated with these recordings, *in situ* activation of the chemoreflex and baroreflex was also performed, followed by procedures of bilateral vagotomy and blockade with atenolol and hexamethonium. In the *in vivo* model, animals were grouped according to different combinations of treatments with CPF, ATR and 2-PAM. Twenty-four hours after treatment, activation and records of the chemoreflex function were performed. The presence of intoxication signs, ataxia, tremor and sialorrhea, was evaluated along three hours after receiving injections of CPF or saline; and after the treatment with ATR and/or 2-PAM. For both *in*

vitro and *in vivo* models, the activities of plasma butyrylcholinesterase (BuChE) and cerebral acetylcholinesterase (AChE) in the brainstem were quantified. Additionally, in the *in vivo* protocol, punches of brain stem sections containing the nucleus ambiguus, rostral ventrolateral medulla (RVLM), the pre-Bötzinger complex (preBöTC) and the nucleus of the solitary tract (NTS) were collected for individualized quantification of cerebral AChE activity. Our data showed that acute exposure to CPF led to impairment of the chemoreflex responses either in the *in vitro* or *in vivo* models. Additionally in the *in vitro* study, an impairment of baroreflex function was also observed, indicated by the reduced reflex-induced inhibition of the sympathetic activity in poisoned animals. Concerning the respiratory function in the WHBP, a reduction in the amplitude of PNA and of the RLN post-inspiratory discharge was also observed in intoxicated animals when compared to the control group. CPF poisoned animals also presented a higher tachycardia following vagal section when compared to control group. Blockade with hexamethonium induced an increase in perfusion pressure of CPF intoxicated animals. In the *in vivo* model, treatment with the antidotes, ATR and 2-PAM, induced differentiated effects on chemoreflex responses in intoxicated animals. Treatment with 2-PAM restored the impairment of the chemoreflex-induced hypertension observed in CPF intoxicated animals. On the other hand, treatment with atropine attenuated the impairment of the bradycardic response of the chemoreflex observed in poisoned animals. Both treatments seemed to exert a protective effect on the tachypneic response of the chemoreflex. All CPF intoxicated animals showed a marked inhibition of the plasma butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activities either in the brainstem or in the isolated punches. CPF animals also exhibited signs of acute intoxication, which were attenuated or abolished by the antidote treatments. Our data indicate that CPF intoxication induces an impairment of the chemo and baroreflex responses and that the antidote treatment seems to partially restore the damage observed in the cardiorespiratory function.

Key-words: chlorpyrifos, chemoreflex, baroreflex, atropine, 2-PAM, BuChE, AChE, respiratory.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. DEFINIÇÃO

Defensivos agrícolas, pesticidas, agrotóxicos, praguicidas ou biocidas são terminologias diferentes que exemplificam a multiplicidade de visões que cercam as substâncias químicas utilizadas na agricultura. Para a indústria, o termo utilizado é “defensivo agrícola”, pois são aqueles que defendem ou protegem os produtos agrícolas. Na literatura anglo-americana, o termo usado é “*pesticides*” ou pesticidas em português, porém a conotação da palavra peste em português não é a mesma do inglês, o que tornaria o termo praguicida mais adequado, apesar de também ser um termo limitado pelo fato destes compostos atuarem também sobre organismos que não são pragas. Alguns autores defendem que o termo mais correto seria “biocidas”, já que o termo significa “mata a vida” e com isso incluiria também organismos não-alvo atingidos pelo amplo espectro destes produtos químicos. Entretanto, o termo mais popular e adotado pela legislação Brasileira é “agrotóxico”, que significa “tóxico de uso agrícola” (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

Segundo o artigo 2º da lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, são considerados agrotóxicos:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimulantes e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

1.2. MERCADO MUNDIAL E BRASILEIRO

No Brasil, o uso de agrotóxicos cresceu bastante nos últimos anos. Enquanto que o mercado mundial cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190% (PELAEZ, 2012). Parte disso se deve à importância da agricultura na economia brasileira, que pode ser demonstrada por sua participação no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, como pode ser verificado na tabela 1 (ABIFINA, 2009; VEIGA, 2007). O mercado mundial de agrotóxico movimentou 38,3 bilhões de dólares em 2010, sendo que o mercado nacional movimentou U\$ 7,3 bilhões, o que representa 19% do mercado global de agrotóxicos (Figuras 1 e 2). Com isso, o mercado brasileiro passa os EUA e assume o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Dentre os agrotóxicos mais consumidos, os herbicidas aparecem em 1º lugar com 45% do total de agrotóxicos consumidos, seguido de fungicidas com 41% e inseticidas com 12% (PELAEZ, 2012).

Tabela 1: Participação da agricultura no PIB.

Participação da agricultura no PIB do Brasil (R\$ milhões de 2004)			
Ano	PIB	Agricultura	%
2004	1.775.700	379.897	21,39%
2003	1.702.492	369.204	21,69%
2002	1.693.265	342.970	20,25%
2001	1.661.256	309.959	18,66%
2000	1.639.733	304.160	18,55%
1999	1.571.217	310.476	19,76%
1998	1.558.972	310.100	19,89%
1997	1.556.918	312.836	20,09%
1996	1.507.599	312.253	20,71%
1995	1.468.556	315.043	21,45%
1994	1.409.041	309.487	21,96%

Fonte: VEIGA, 2007.

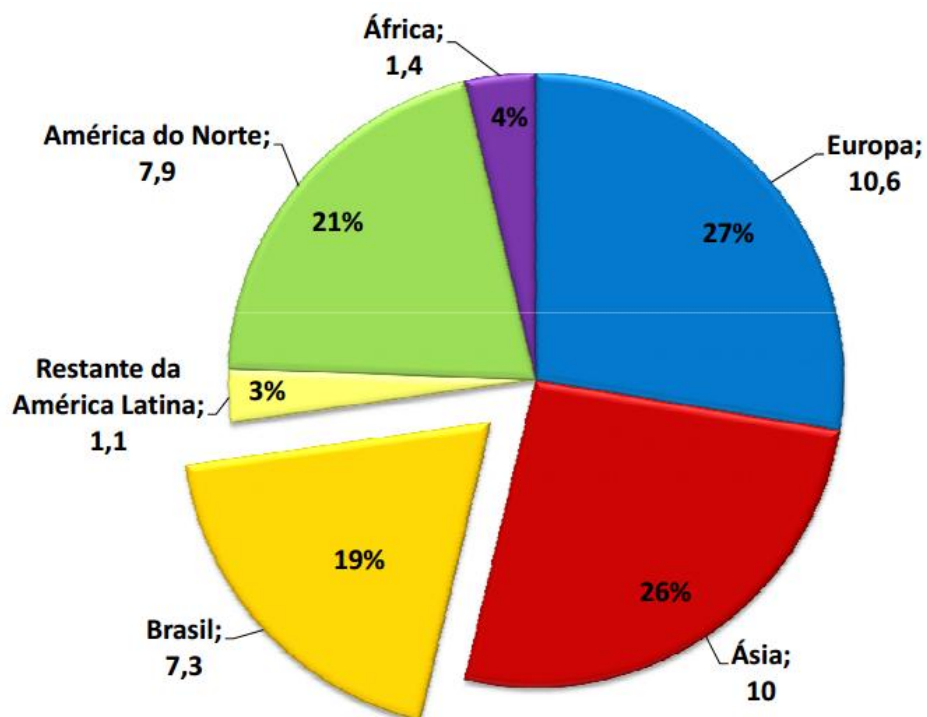


Figura 1: Divisão do mercado mundial de agrotóxicos em 2010 (total: 38,3 bilhões).
Fonte: PELAEZ, 2012.

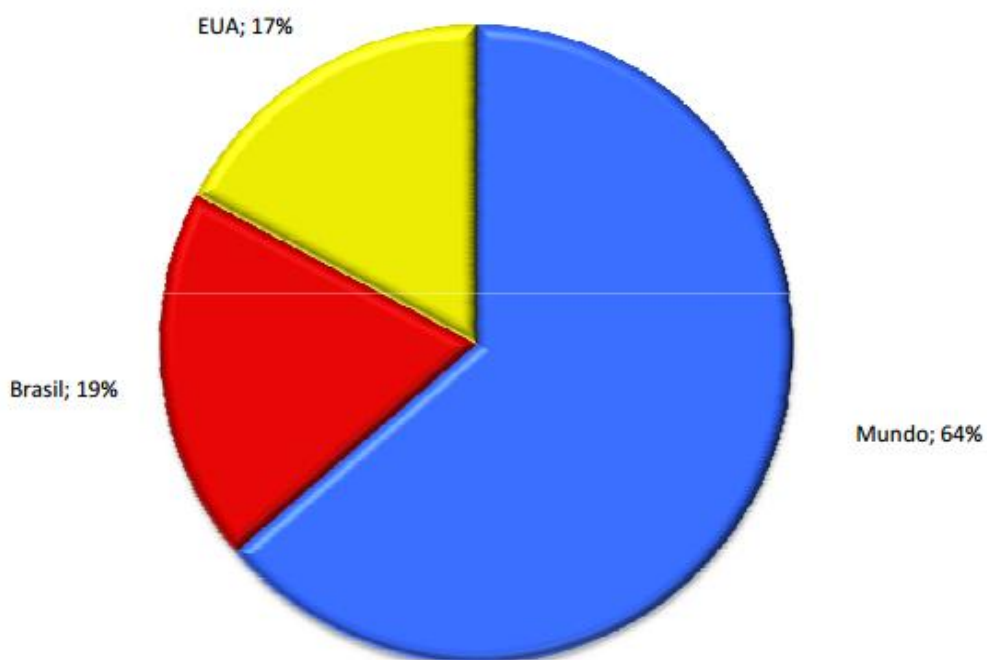


Figura 2: Estimativa da participação do Brasil e EUA no mercado mundial de agrotóxicos em 2010.
Fonte: PELAEZ, 2012.

1.3. COMPOSTOS ORGANOFOSFORADOS

A partir da década de 1970, os organofosforados se tornaram os inseticidas mais utilizados no mundo como alternativa para substituir os compostos organoclorados no controle de insetos, pelo fato de apresentarem baixa ação residual, pouca estabilidade no ambiente e acumulação limitada em organismos vivos, sendo 80-90% dos compostos eliminados em 48h após contato (ARAÚJO et al., 2007; MÍDIO; MARTINS, 2000; SANTOS et al., 2007).

Os primeiros compostos organofosforados (OF) foram preparados por alquimistas na idade média, porém um grande avanço em seus estudos se deu a partir do século XIX, por Lassaigne em 1820, com a esterificação do ácido fosfórico (TOY, 1976). O átomo de fósforo pode ser encontrado com dois números de coordenação, na forma trivalente, altamente reativa, e pentavalente (QUIN, 2000; SANTOS et al., 2007). Atualmente vários compostos de fósforo utilizados são compostos inorgânicos, porém a importância dos compostos orgânicos vem aumentando, principalmente, por suas atividades biológicas, como agentes agroquímicos (inseticidas, fungicidas e herbicidas), antitumorais (agentes alquilantes, como a ciclofosfamida) e inibidores da reabsorção óssea como os bifosfonatos (alendronato) (CAO et al., 2014; KLING; CLARKE; SANDHU, 2014; SANTOS et al., 2007).

1.3.1. História dos inseticidas organofosforados

O primeiro relato de síntese de um composto OF, que mais tarde teria seu uso como inseticida, foi documentado por Moschine seguido por Philippe de Clermont em 1854 (GUPTA, 2006; LARINI, 1999; SANTOS et al., 2007). Já na década de 1940, por observações e relatos de efeitos tóxicos de compostos OF's, Gerhard Schrader, na Alemanha, passou a estudar os OF's visando ao desenvolvimento de compostos inseticidas, tendo sido o octametilpirofosfato (OMPA) e o paration os primeiros compostos sintetizados (GUPTA, 2006; LARINI, 1999; SANTOS et al., 2007).

Antes da segunda guerra mundial, sob a autoridade do ministro da defesa alemão sua prioridade mudou de inseticida para agentes químicos de guerra, o que resultou no desenvolvimento dos agentes de nervo da série G – GA, GB e GD (Tabun, sarin

e soman, respectivamente). Já na década de 1950 foram sintetizados os da série V, como o VX no Reino Unido e o VR na União Soviética, apresentando esses compostos uma supertoxicidade aguda (GUPTA, 2006; MUNRO, 1994; SILVA et al., 2012). Após a Segunda Guerra Mundial, muito do conhecimento adquirido e estruturas laboratoriais foram aproveitados, e muitos compostos OF's com uma maior seletividade para espécie e menor toxicidade foram desenvolvidos para uso como inseticidas, sendo este, por exemplo, o caso do malation (GUPTA, 2006).

1.3.2. Epidemiologia das intoxicações

Envenenamentos por agrotóxicos constituem um sério problema entre populações, principalmente onde o seu uso é amplamente disseminado (DELGADO; PAUMGARTTEN, 2004; MOREIRA et al., 2002). Aliado ao seu uso diverso, observa-se também, na maioria dos casos, o desconhecimento dos riscos associados à sua utilização. O contínuo desrespeito às normas de segurança básica, a ausência de controles eficazes sobre a comercialização e a dificuldade na realização de estudos epidemiológicos são fatores que contribuem para o agravamento de um cenário nacional que se caracteriza por um perfil de intoxicação mais prevalente entre praguicidas de uso agrícola (41,5%) (BEDOR et al., 2009; BOCHNER, 2007; FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007). Cerca de 2 milhões de tentativas de suicídios, envolvendo o uso de praguicidas ocorreram nos anos 80 (JEYARATNAM, 1990). Segundo London e colaboradores (2005), a tentativa de suicídio é citada como a maior causa de intoxicação por agrotóxicos, ultrapassando exposições ocupacionais e acidentais em países orientais, como Malásia, Indonésia e Tailândia. Estatística similar é relatada pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX no Brasil (BOCHNER, 2007) e no Centro Toxicológico do Espírito Santo - TOXCEN (2014).

Não obstante, a preocupação sobre o uso de compostos organofosforados como armas químicas em atentados terroristas cresceu recentemente. Essa preocupação não mais se restringe apenas ao uso de agentes de nervo, como VX e o próprio sarin usado recentemente na Síria (BBC, 2017), mas também quanto aos inseticidas organofosforados que tem o potencial de serem usados como armas. Por esse

motivo, um melhor entendimento de como essa classe de compostos é capaz de levar os indivíduos a prejuízos orgânicos e fisiológicos após uma exposição aguda, bem como da eficácia dos tratamentos empregados na prevenção ou atenuação desses efeitos, se tornou de grande valor para campo da toxicologia moderna (MUNRO, 1994; WOREK et al., 2016).

1.3.3. Química e toxicologia dos inseticidas organofosforados

Os inseticidas organofosforados são compostos derivados dos ácidos fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico e fosfônico, Figuras 3 e 4 (SANTOS et al., 2007).

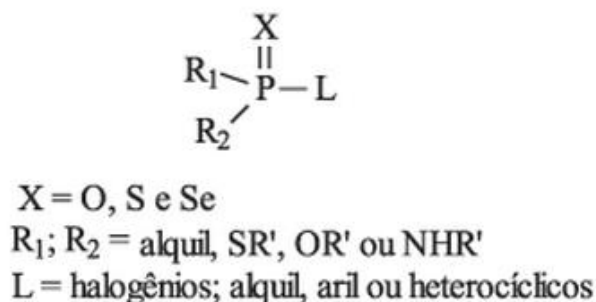


Figura 3: Estrutura química básica de inseticidas organofosforados.
Fonte: SANTOS et al., 2007.

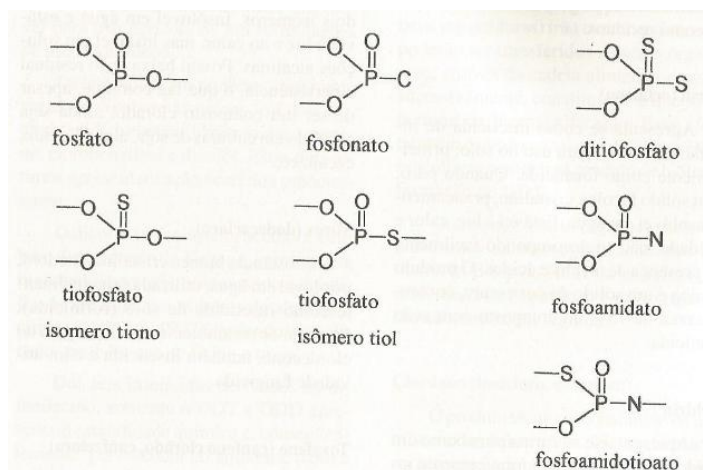


Figura 4: Compostos derivados de ácido fosfórico encontrados em inseticidas organofosforados.
Fonte: MÍDIO; MARTINS, 2000.

Os organofosforados têm sua ação tóxica básica através da inibição das enzimas hidrolases de ésteres carboxílicos nas diversas sinapses, tanto periféricas quanto

centrais, que utilizam a acetilcolina (ACh) como neurotransmissor, sendo a enzima acetilcolinesterase (AChE) reconhecida como fator de maior interesse nos casos de intoxicação por esses agentes (LARINI, 1999). A neurotransmissão colinérgica é essencial para funcionamento do sistema nervoso. A acetilcolina participa do controle central e periférico do movimento, funcionamento do sistema nervoso autônomo, regulação do sono e de múltiplos processos cognitivos como memória, atenção e aprendizado (GOLD, 2003a, 2003b; POWER, 2003; SARTER; PARIKH, 2005). Alterações no sistema colinérgico estão associadas com Doença de Alzheimer, miastenia gravis, doença de Huntington e algumas desordens psiquiátricas (ARMSTRONG, 2013; CASTRO, 2006; CICCHETTI et al., 2000; SCARR et al., 2013; SMITH; PADNOS; CORDON, 2001). Nas diversas sinapses colinérgicas (Figura 5) a ACh interage com receptores dos tipos nicotínicos e muscarínicos para exercer suas ações fisiológicas e sua inativação ocorre, principalmente, pela ação da enzima AChE e com menor especificidade pela butirilcolinesterase no plasma (CASTRO, 2006).

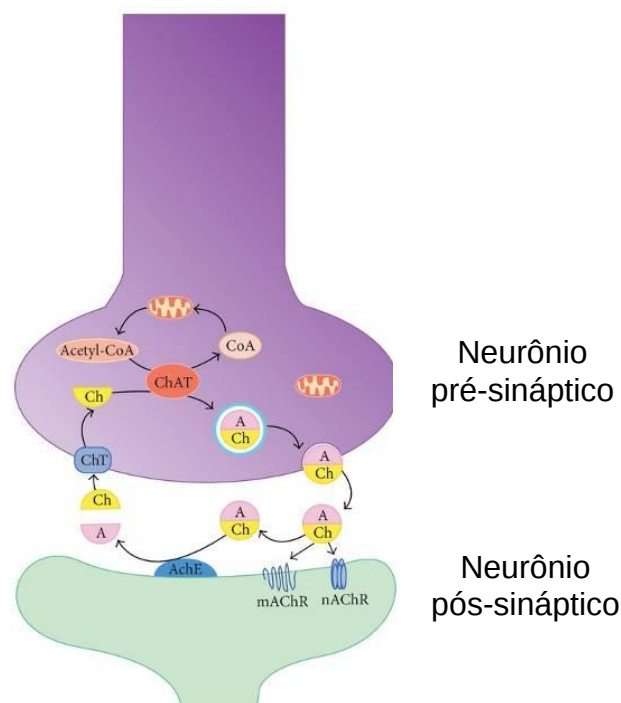


Figura 5: Esquema de uma sinapse colinérgica. A: Acetil; AChE: acetilcolinesterase; Ch: colina; ChAT: acetilcolina transferase; ChT: transportador de colina; CoA: coenzima A; mAChR: receptor muscarínico; nAChR: receptor nicotínico.

Fonte: Modificado de Toledo-Ibarra; Rojas-Mayorquín; Girón-pérez, (2013).

1.3.4. Quadro clínico das intoxicações por organofosforados

O quadro clínico causado pelas intoxicações agudas por organofosforados pode ser dividido em três fases: a primeira denominada síndrome colinérgica aguda, a segunda ocorrendo alguns dias após exposição, chamada de síndrome intermediária e a última ocorrendo mais tardiamente denominada de neuropatia tardia induzida por organofosforados (*Organophosphate-Induced Delayed Neuropathy* - OPIDN) (HULSE et al., 2014). O acúmulo de ACh causado pela ação tóxica dos inseticidas organofosforados provoca efeitos de hiperestimulação colinérgica. A síndrome colinérgica aguda, ou insuficiência respiratória do tipo 1, pode ser ainda dividida em síndrome colinérgica muscarínica ou nicotínica de acordo com os sinais clínicos de intoxicação apresentados pelo paciente; sendo a insuficiência cardiorespiratória a principal causa de morte em intoxicações agudas, Tabela 2 (CAREY; DUNN; GASPARI, 2013; LARINI, 1999; OLSON, 2014).

Tabela 2. Sinais 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		

A síndrome intermediária, também conhecida como insuficiência respiratória do tipo 2, é uma manifestação clínica de etiologia não totalmente compreendida. Ela ocorre geralmente entre 24-96h levando o paciente a uma fraqueza da musculatura respiratória e de membros proximais (JAYAWARDANE et al., 2008; KARALLIEDDE; BAKER; MARRS, 2006). Têm-se proposto como etiologias, possíveis efeitos miopáticos *in loco*, alterações das junções neuromusculares ou até mesmo uma dessensibilização de receptores nicotínicos nas placas motoras, já que a atropina,

fármaco utilizado no tratamento, não teria efeito sobre esse tipo de receptor (DE BLEECKER, 1995; HULSE et al., 2014; JOHN; OOMMEN; ZACHARIAH, 2003; YANG; DENG, 2007). Por último a OPIDN pode aparecer e persistir por semanas ou anos após exposição ao composto OF. Acredita-se que os OF's são capazes de inibir esterases nos axônios de neurônios e inibindo-as; essas esterases inibidas permitiriam o acúmulo de substâncias endógenas tóxicas que causaria degeneração axonal (HULSE et al., 2014; SHAH et al., 2016).

1.4. ORGANOFOSFORADOS E SISTEMA CARDIOVASCULAR

Um fator relevante que desperta preocupação sobre as intoxicações por inseticidas organofosforados se refere ao sistema cardiovascular (ROTH et al., 1993). Diversos estudos têm relacionado os inseticidas organofosforados com anormalidades cardíacas e miotoxicidade (AGHABIKLOOEI et al., 2013; ANAND et al., 2009; CAVALIERE et al., 1996). Alterações eletrocardiográficas, como arritmias ventriculares, prolongamento do intervalo QT e *torsade de pointes* também têm sido relatadas na literatura (KARKI et al., 2004; KLEIN et al., 1982). Em um estudo clínico, Saadeh e colaboradores (1997) avaliaram 46 pacientes intoxicados por organofosforados e carbamatos internados na unidade de terapia intensiva no Princess Basma Teaching Hospital no norte da Jordânia. Os autores observaram várias alterações cardíacas, desde anormalidades eletrocardiográficas até alterações de pressão arterial. Os autores discutem que esses achados sugerem que a toxicidade cardíaca associada com a intoxicação por organofosforados e carbamatos, é causada por mais de um mecanismo. Como possíveis mecanismos estariam a hiperatividade simpática e parassimpática, hipoxemia, acidose, alterações hidro-eletrolíticas e efeitos tóxicos direto dos compostos sobre o miocárdio (LUDOMIRSKY et al., 1982) afirma que existem 3 fases da toxicidade cardíaca após intoxicação por organofosforados. A fase 1 seria um período curto de aumento do tônus simpático, já a fase 2 seria um período prolongado de atividade parassimpática e a fase 3 seria aquela em que ocorreria prolongamento QT seguido de arritmias ventriculares polimórficas do tipo *torsade de pointes*, taquicardia ventricular e por último fibrilação ventricular. Esses achados indicam que os compostos organofosforados teriam seus efeitos sobre a pressão arterial através de

alterações da atividade autonômica central e periférica. De fato, segundo Chan e colaboradores (2005), a intoxicação pelo mevinfos, um outro composto OF, produz respostas cardiovasculares fásicas através da cascata de sinalização PKG/GMPc e através da produção de peroxinitrito via óxido nítrico (NO) dentro do bulbo ventrolateral rostral (RVLM). Não obstante, efeitos de longo prazo após intoxicações aguda por OF's, podem persistir por mais de 5 anos, levando os pacientes a serem mais suscetíveis às doenças cardiovasculares (CVD) (HUNG et al., 2015).

1.5. REFLEXOS NEURAIS E O SISTEMA CARDIORESPIRATÓRIO

Embora os sinais clínicos estejam bem identificados, a extensão, a frequência e a patogênese da toxicidade cardíaca dos OF's ainda não estão claramente definidas. Particularmente, muito pouco se sabe em relação aos efeitos dos organofosforados sobre os reflexos neurais de controle da pressão arterial (PA). O objetivo principal 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. Esses mecanismos consistem na regulação em curto prazo ao fazerem ajustes rápidos e eficientes para a estabilização da pressão arterial a cada batimento cardíaco (RICHTER; SPYER, 1990; SALMAN, 2016; VASQUEZ et al., 1997).

Um dos principais mecanismos neurais envolvidos na regulação da pressão arterial é o barorreflexo. Nesse reflexo neural, a rápida e eficiente estabilização da pressão arterial ocorre por meio da ativação de mecanorreceptores sensíveis à elevação da pressão sanguínea, conhecidos como barorreceptores e localizados no seio carotídeo e no arco aórtico. Através de sua complexa circuitaria presente no sistema nervoso central (figura 6) o barorreflexo é capaz de promover ajustes, rápidos e finos, nos eferentes simpático e parassimpático que se projetam, principalmente, para os vasos e tecido cardíaco, respectivamente.

O bulbo ventrolateral rostral (*Rostral ventrolateral medulla* - RVLM) normalmente está ativo, ao passo que o fluxo sanguíneo homeostático é suficiente para a ativação dos barorreceptores que mantêm um tônus mínimo de ativação sobre o núcleo do trato solitário (*Nucleus tractus solitarius* - NTS). Este por sua vez estimula

os núcleos, ambíguo (Amb) e motor dorsal do vago (*Dorsal vagal motor nucleus* - DVMN), onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares parassimpáticos (NPGP), promovendo um tônus basal desse componente do sistema nervoso autônomo (SNA). Quando ocorre uma elevação de pressão arterial, a ativação dos barorreceptores irá enviar um sinal, via inervação aferente dos nervos glossofaríngeo e vago, ativando assim o NTS. A partir deste núcleo partem projeções estimulatórias para os núcleos, bulbo ventrolateral caudal (*Caudal ventrolateral medulla* - CVLM), DVMN e Amb. Estes dois últimos irão aumentar ainda mais a atividade do sistema nervoso parassimpático (SNP), enquanto o CVLM irá inibir atividade do RVLM. Do RVLM partem projeções estimulatórias para os neurônios pré-ganglionares simpáticos (NPGS), localizados na coluna intermédio-lateral (IML) da medula espinhal. Portanto, a ativação do barorreflexo irá promover a inibição do RVLM via CVLM, retirando, assim, o componente simpático e levando a uma redução da resistência vascular periférica e do *Drive* simpático para o coração. Além disso, a ativação do barorreflexo irá levar a uma ativação do componente parassimpático, que juntamente com a redução do tônus simpático leva a uma queda da frequência cardíaca. A ação combinada de redução da resistência vascular periférica e queda da frequência cardíaca restaura a pressão arterial a seu nível basal (GUYENET, 2006; SALMAN, 2016; SPYER, 1990; THOMAS, 2011; VASQUEZ et al., 1997).

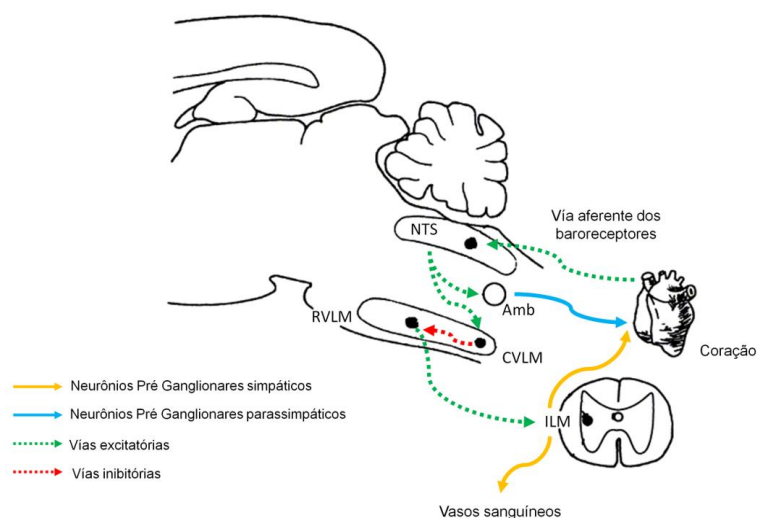


Figura 6: Esquema mostrando as vias de conexão após ativação do barorreflexo, frente a um aumento de pressão arterial. NTS= núcleo do trato solitário, Amb= núcleo ambíguo, CVLM= bulbo ventrolateral caudal, RVLM= bulbo ventrolateral rostral, ILM= coluna intermediolateral.

Fonte: Modificado de Misu et al.(1996).

Além do reflexo supracitado, o quimiorreflexo consiste também de um mecanismo neural que participa ativamente da regulação cardiorrespiratória através dos quimiorreceptores centrais e periféricos (KARA et al., 2003). Esse reflexo é capaz de controlar a ventilação alveolar, relacionando à demanda metabólica de captação de O_2 e de eliminação de CO_2 com a frequência respiratória e troca gasosa nos pulmões, além de exercer atividade importante no mecanismo de controle da pressão arterial (SCHULTZ; LI, 2007; VASQUEZ et al., 1997). Os quimiorreceptores periféricos estão localizados nos corpúsculos aórticos e carotídeos, sendo esses especialmente sensíveis aos estados de hipóxia (NURSE, 2010; PRABHAKAR; PENG, 2004).

Os corpúsculos carotídeos, principais fontes de quimiorreceptores periféricos, estão localizados de forma estratégica na bifurcação das artérias carótidas (ITURRIAGA; OYARCE; DIAS, 2017). Em uma situação de hipóxia os quimiorreceptores ali presentes despolarizam e liberaram uma gama de neurotransmissores que irão estimular neurônios da via aferente, localizados no gânglio petroso. Os tipos celulares localizados dentro do corpúsculo carotídeo são as células quimiorreceptoras glomais, também conhecidas como células do tipo I, e as células gliais tipo II. Esta última parece ter importância diminuta em relação às células glomais na geração do estímulo quimiorreflexo (NURSE, 2014). Os principais neurotransmissores liberados pelas células glomais parecem ser a adenosina e o ATP, enquanto que neurônios eferentes do nervo glossofaríngeo parecem exercer atividade moduladora através da liberação de óxido nítrico (NO). Todavia, hoje já se sabe que vários neurotransmissores estão envolvidos com a geração de estímulo pelas células glomais, como serotonina, GABA, dopamina e acetilcolina (ACh). A ACh, particularmente, parece exercer sua ação principalmente, via receptores nicotínicos, mas envolvendo também uma ação via receptores muscarínicos (NURSE; PISKURIC, 2013).

De forma semelhante ao barorreflexo, o quimiorreflexo exerce sua função através de uma complexa circuitaria presente no sistema nervoso central. Porém, quando os quimiorreceptores são ativados ocorre tanto um aumento do tônus vagal cardíaco, quanto do tônus simpático vascular. Acredita-se que isso ocorra devida à ativação

do RVLM pelo NTS através de uma via de sinalização diferente do barorreflexo (Figura 7). Além disso, de uma forma sincronizada, o quimiorreflexo leva a uma resposta hiperventilatória visando restaurar os níveis de oxigênio (BARROS et al., 2002; MACHADO, 2001; SAPRU, 2002; SPYER; GOURINE, 2009).

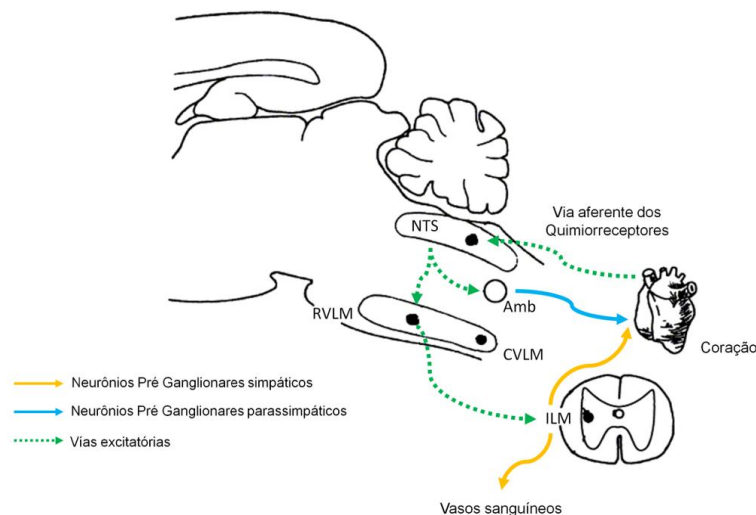


Figura 7: Esquema mostrando as vias de conexão após ativação do quimiorreflexo frente a uma situação de hipóxia. NTS= núcleo do trato solitário, Amb= núcleo ambíguo, CVLM= bulbo ventrolateral caudal, RVLM= bulbo ventrolateral rostral, ILM= coluna intermediolateral.

Fonte: Modificado de Misu et al.(1996).

O padrão respiratório de um indivíduo é estabelecido através do centro de controle respiratório. Este, recebe três tipos de aferências que serão integradas e com isso serão modificados os padrões, como tempo e intensidade de cada respiração. As três aferências são: química, de centros corticais superiores e mecânica através dos movimentos de distensão dos pulmões. Este ultimo, principalmente, através do reflexo de Hering-Breuer (BRAUN, 1990). O ritmo respiratório é dividido em três fases diferentes: inspiração, pós-inspiração e expiração. Os principais núcleos de controle do padrão respiratório estão presentes no tronco encefálico e lá estão localizados, principalmente, no grupo respiratório dorsal e na coluna respiratória ventral (*Ventral respiratory column* - VRC). Os núcleos presentes na VRC são essenciais para geração do ritmo respiratório, com destaque maior para o complexo Bötzinger e pré-Bötzinger que estariam associados com a geração do ritmo e da fase inspiratória do ciclo, enquanto que os agrupamentos dos núcleos retrotrapezóide e parafacial estariam associados com a geração da fase expiratória do ciclo (figura 8) (IKEDA et al., 2017; RICHTER; SPYER, 2001; SPYER; GOURINE, 2009).

Na fase de inspiração acontece entrada de ar nos pulmões através da contração de músculos respiratórios, como diafragma, intercostais externos e esternocleidomastóideos. A contração desses músculos faz com que ocorra uma expansão da caixa torácica e isso irá promover a formação de uma pressão negativa dentro dos pulmões, fazendo com que o ar entre passivamente em certa quantidade. Esse volume de ar é chamado de volume corrente (V_T) (LUTFI, 2017; SIECK et al., 2013). O principal nervo respiratório estudado em experimentos fisiológicos é o nervo frênico (PN), que controla a contração do músculo diafragma. O padrão de disparo do nervo frênico é, ainda, subdividido em três fases: uma fase inicial da inspiração (*Early inspiration*, E-I), uma fase de rampa (*Ramp inspiration*, R-I) e a fase pós-inspiratória (*Post inspiration*, p-I) que acontece durante a fase de pós-inspiração do ciclo respiratório. Entretanto, esta última fase, muitas vezes não é observada em experimentos fisiológicos, sendo assim, o nervo frênico rotineiramente associado com a fase inspiratória do ciclo (figuras 9) (RICHTER; SPYER, 1990).

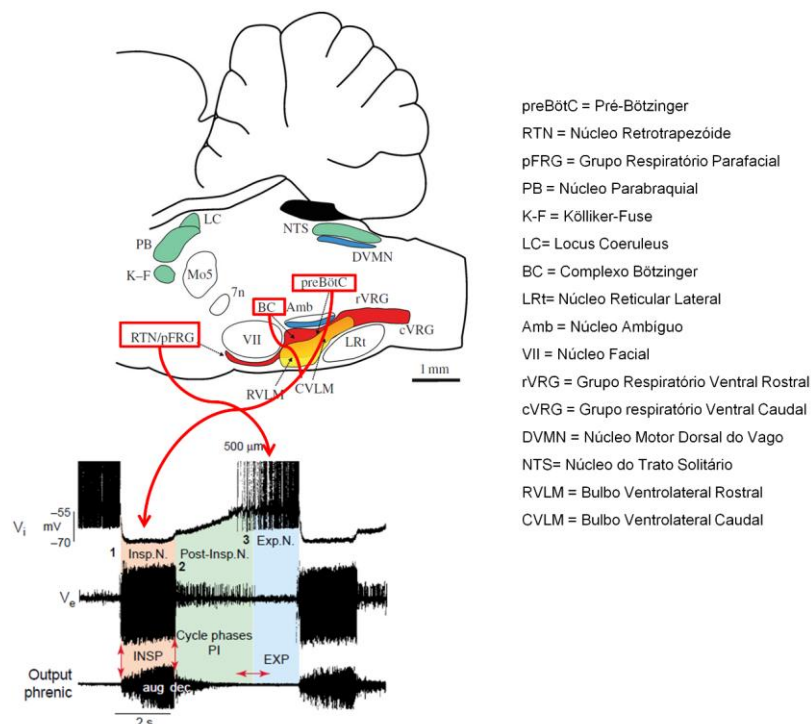


Figura 8: Principais núcleos cardiorrespiratórios responsáveis pela geração do ritmo respiratório. O ciclo respiratório, baseado no padrão de disparo do nervo frênico, é dividido em 3 fases, de acordo com o padrão de despolarização de membrana de neurônios presentes dentro do tronco encefálico responsáveis pela geração de cada fase: inspiração (salmão), pós-inspiração (verde) e expiração (azul). Os núcleos, complexo Bötzing e pré-Bötzing estariam associados com a geração da fase inspiratória do ciclo, enquanto que os núcleos retrotrapezoide e parafacial estariam associados com a geração da fase de expiração do ciclo.

Fonte: Modificado de Richter; Spyer, 2001; Spyer; Gourine, 2009.

A segunda fase, pós-inspiração, também conhecida como fase 1 da expiração (E-1) está relacionada com a saída passiva do ar presente nos pulmões. A duração de E-1 corresponde a aproximadamente 70% do intervalo expiratório. Os disparos dos neurônios que promovem E-1 controlam ativamente os movimentos de recuo dos pulmões e do tórax, regulando, assim, a pressão intratorácica (RICHTER; SPYER, 1990). Também na fase E-1, neurônios que controlam as vias aéreas superiores, modulam a resistência da passagem de ar sobre essas vias, através da atividade dos músculos adutores e abdutores da glote. Estes são controlados ativamente pelos disparos do nervo laríngeo recorrente (*Recurrent laryngeal nerve* - RLN) que apresenta dois padrões de disparo: o primeiro sincronizado com a fase inspiratória, controla os músculos abdutores da glote, permitindo a passagem do ar durante a inspiração, enquanto o segundo ocorre durante a fase E-1 do ciclo respiratório (DUTSCHMANN; PATON, 2002; PATON; NOLAN, 2000; SIECK et al., 2013). Este padrão de disparo é muitas vezes referido como disparo post-I (P-I) do RLN e controla a contração dos músculos adutores da glote. Os dois padrões de disparos são em rampa, fazendo com que a glote se abra e feche para passagem de ar de forma gradativa. A contração dos adutores da glote durante a fase E-1 do ciclo respiratória é algo extremamente importante para impedir que todo o ar saia de uma só vez dos pulmões após a inspiração, essa retenção prolongada facilita as trocas gasosas nos alvéolos além de evitar que os mesmos colabem com a diferença de pressão (DUTSCHMANN; PATON, 2002).

A terceira fase do ciclo respiratório, a expiração, também conhecida como fase 2 da expiração (E-2) é caracterizada pela expiração ativa e contração de músculos expiratórios, como os intercostais internos (RICHTER; SPYER, 1990, 2001).

Os sistemas cardiovascular e respiratório estão integrados em funcionamento, modulação e sincronismo, dando origem ao termo, sistema cardiorrespiratório (RICHTER; SPYER, 1990). Essa interação entre o sistema respiratório e cardiovascular parece estar associada com interações sinápticas entre neurônios respiratórios e cardiovasculares dentro do tronco encefálico e de aferentes vindo da medula espinha (MOLKOV et al., 2014; RICHTER; SPYER, 1990).

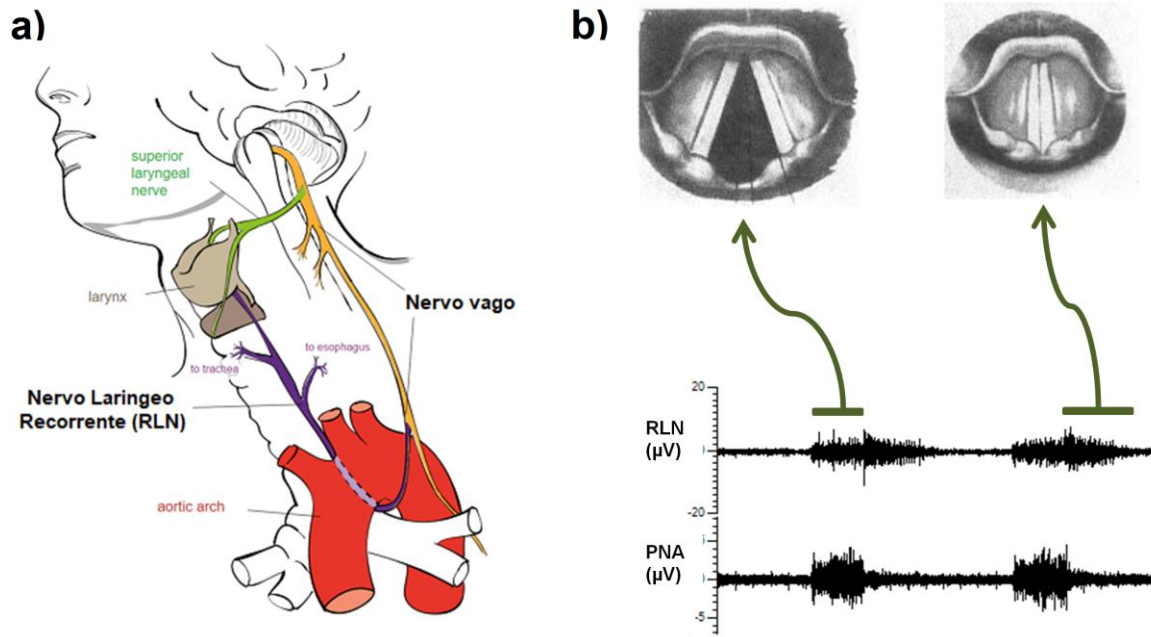


Figura 9: A. Localização anatômica do nervo laríngeo recorrente. B. Padrão de disparo bifásico do nervo laríngeo recorrente e sua associação com a contração dos músculos abdutores (inspiração) e adutores (pós-inspiração) da glote. RLN= Nervo Laringeo Recorrente; PNA = Atividade do nervo Frênico.

Fonte: Modificado de (Google imagens: nervo laríngeo recorrente; adutores e abdutores da glote).

Quando o nervo frênico dispara acontecem oscilações de frequência cardíaca de forma acoplada com o ciclo respiratório. Durante a fase inspiratória ocorre aumento da frequência cardíaca, ao passo que nas fases E-1 e E-2 a frequência cardíaca diminui. Os aumentos e diminuições de frequência cardíaca durante a inspiração e expiração, estão associados, principalmente, a uma retirada, seguida do aumento do tônus vagal, respectivamente (PATON, 1996). Reflexos de estiramento pulmonar, quando os pulmões inflam com ar na inspiração, também contribuem para a modulação alterando a frequência cardíaca. Essas alterações mostram o quão próximas são as interações dos sistemas cardiovascular e respiratório. Não obstante, durante a fase inspiratória ocorre aumento da atividade simpática, o que contribui para essa alteração de frequência cardíaca (BAINTON et al., 1985; MOLKOV et al., 2014).

A atividade simpática tônica é intimamente modulada pela respiração sendo essa modulação denominada acoplamento simpato-respiratório. O acoplamento simpato-respiratório acontece de forma sincronizada; o padrão de disparo simpático ocorre na fase tardia da inspiração (L-I) e também na fase E-2 do ciclo respiratório,

enquanto que nas fases E-I e E-1 a atividade é mínima (DICK et al., 2009; MOLKOV et al., 2014; ZOCCAL et al., 2014; ZOCCAL; MACHADO, 2011; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009) (figura 10).

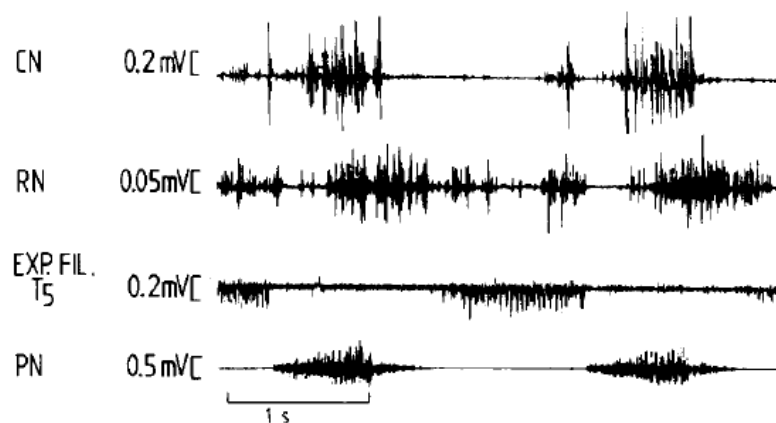


Figura 10: Acoplamento simpato-respiratório. Registros dos nervos simpático cardíaco (CN), simpático renal (RN), quinto nervo intercostal interno (Exp. FIL T₅) e nervo frênico (PN), mostrando os disparos simpáticos ocorrendo nas fases L-I do frênico e E-2 do ciclo.

Fonte: (BAINTON et al., 1985)

1.6. ORGANOSFOSFORADOS E OS REFLEXOS CARDIOVASCULARES

Sabe-se que ambos, barorreflexo e, em especial, o quimiorreflexo integram e modulam respostas respiratórias frente a sua ativação. Esses dois reflexos ainda sofrem processos de adaptação em diversas patologias, tais como hipertensão, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (GUYENET, 2006; MEYRELLES et al., 1996; PRABHAKAR, 2016; WOLK; SHAMSUZZAMAN; SOMERS, 2003). Em um estudo anterior de nosso laboratório promovendo a exposição aguda a doses subletais do metamidofós, um pesticida representante da classe dos organofosforados (MARETTO et al., 2012), observamos que este composto foi capaz de causar prejuízo na resposta bradicárdica de dois importantes reflexos envolvidos na regulação da pressão arterial (o quimiorreflexo e o reflexo de Bezold-Jarisch). Estudos mais recentes de nosso laboratório mostraram que a exposição aguda ao clorpirifós (CPF), outro composto OF, foi capaz de prejudicar o funcionamento dos três reflexos: barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo de Bezold-Jarisch (CUNHA, 2014). Essas alterações podem ser de relevância clínica tanto para morbidade quanto mortalidade, nas fases de síndrome colinérgica aguda e intermediária de pacientes intoxicados agudamente. Apesar destas evidências no

plano cardiovascular, muito pouco se sabe sobre a ação discriminada exercida pelo tratamento padrão empregado numa intoxicação por compostos OF, no plano cardíaco.

1.7. TRATAMENTO PADRÃO EM INTOXICAÇÕES POR ORGANOFOSFORADOS

A terapia padrão utilizada na clínica para tratamento da intoxicação por compostos organofosforados tem como princípios: reduzir a absorção do organofosforado através da lavagem gástrica ou uso de carvão ativado, somado com a administração dos antídotos atropina (ATR) e das oximas, como a pralidoxima (2-PAM). Esses compostos tem o objetivo de conter os efeitos daqueles agentes que já foram absorvidos (EDDLESTON et al., 2008; OLSON, 2014). O uso de doses altas de atropina já está bem estabelecido, enquanto que o uso das oximas é mais controverso (BUCKLEY et al., 2011; EDDLESTON et al., 2002; EYER et al., 2008; JOHNSON et al., 2000). O tratamento com atropina consiste em administração de doses escalonadas até que seja observada melhora clínica. Inicia-se o tratamento com doses de 2 a 5 mg i.v. (intravenoso) e dobra-se a dose administrada a cada 5 minutos até que seja observado uma diminuição das secreções respiratórias, sendo esse, um parâmetro utilizado para avaliação da efetividade do tratamento (OLSON, 2014). Vale lembrar que a atropina reverte apenas os efeitos muscarínicos e que a taquicardia não representa uma contraindicação para o uso adicional da atropina (JOHNSON et al., 2000; OLSON, 2014). As oximas, como a 2-PAM e a obidoxima são reativadores enzimáticos que tem por sua ação reverter a inibição que o composto OF exerceria sobre a enzima AChE, que de outra forma seria irreversível. Existe muita controvérsia quanto ao uso desses compostos pelo fato de sua efetividade depender do tipo de composto organofosforado (dimetil ou dietil), do tipo da oxima e pelo fato de alguns ensaios indicarem que esses compostos podem não beneficiar alguns pacientes e até ser prejudicial para outros (BUCKLEY et al., 2011; PETER; MORAN; GRAHAM, 2006; RAHIMI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2006). Entretanto, elas continuam sendo recomendadas no tratamento das intoxicações agudas por OF através de uma administração *in bolus* inicial, seguida por uma infusão intravenosa contínua para se alcançar concentrações plasmáticas da ordem de 85–170 $\mu\text{mol/L}$ de 2-PAM e 10–20 $\mu\text{mol/L}$ de obidoxima (JOHNSON et al., 2000). A 2-PAM deverá ser administrada em uma dose inicial de 30 a 50 mg/Kg, num total

de 1 a 2 g em adultos durante 30 minutos e seguida de uma infusão contínua de 8 a 20 mg/Kg/h (OLSON, 2014). As oximas tem sua efetividade aumentada quando administradas o mais rapidamente possível, antes que ocorra o envelhecimento da enzima, tornando a fosforilação irreversível. A administração da 2-PAM deve ser mantida por pelo menos 24h (BUCKLEY et al., 2011; EDDLESTON et al., 2008, 2009; JOHNSON et al., 2000). Todavia, a despeito destas indicações, a utilidade das oximas no tratamento de pacientes intoxicados ainda é cercada por muitas dúvidas, inclusive porque alguns estudos clínicos falharam em mostrar efeitos benéficos desses fármacos em pacientes intoxicados com organofosforados (BAJGAR, 2004; BUCKLEY et al., 2011). Além disso, a pralidoxima é um fármaco altamente polar, sendo sua penetração cerebral relativamente limitada (KALÁSZ et al., 2009; LORKE et al., 2008). Uma vez que os inseticidas organofosforados são compostos altamente lipossolúveis e de ampla penetração no SNC, não se sabe se o tratamento convencional com a pralidoxima é capaz de reverter possíveis danos decorrentes da inibição da enzima acetilcolinesterase ao nível central (Figura 11).

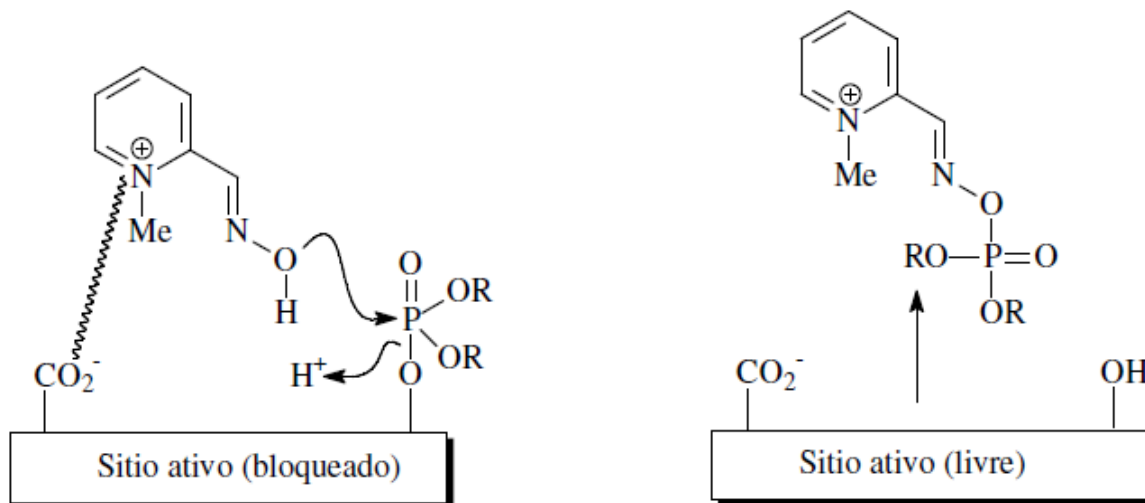


Figura 11: Ação da pralidoxima reativando o sítio ativo da acetilcolinesterase inibida por um composto organofosforado.

Fonte: (GONÇALVES, 2009)

Mesmo recebendo suporte em unidades de tratamento intensivo, alguns pacientes vêm a óbito. As taxas de mortalidade de pacientes intoxicados agudamente por OF's em unidades de tratamento giram em torno de 30-50% dos pacientes (MUNIDASA et al., 2004). Eddleston e colaboradores (2006) relataram, em seu estudo, que mais de 50% dos pacientes entubados morreram após se alto intoxicarem com OF's. Os

motivos para esses pacientes virem a óbito, mesmo recebendo suporte necessário, muitas vezes não é bem compreendido. Por esse motivo, pesquisas que visem desvendar as alterações fisiopatológicas provocadas por OF's são de grande importância.

Poucos estudos experimentais têm avaliado os efeitos do tratamento padrão de atendimento do paciente intoxicado por organofosforados sobre a função cardíaca. Por exemplo, Kose e colaboradores(2009) investigaram os efeitos da atropina e da pralidoxima sobre o dano cardíaco em ratos intoxicados com o organofosforado diclorvós. Nesse estudo, os autores evidenciaram que o tratamento foi capaz de impedir a morte dos animais, além de não induzir alterações em marcadores cardíacos ou detectar apoptose nesse tecido. Por outro lado, a administração do tratamento previamente ao organofosforado e a avaliação dos danos apenas nas seis primeiras horas após a intoxicação limitam a interpretação dos resultados do estudo supracitado. Deste modo, nota-se a importância de avaliar se o tratamento padrão adotado nos casos de intoxicação por esses agentes tóxicos é realmente capaz de prevenir ou atenuar o aparecimento de efeitos tóxicos graves e potencialmente fatais.

1.8. CLORPIRIFÓS

O clorpirifós (CPF, Figura 12) [0,0-dietil-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato], comercializado, dentre outras marcas, como Lorsban 480BR®, Catcher 480 ec® e Piritilen®, é um dos organofosforados mais utilizados mundialmente, sendo o Lorsban o segundo inseticida mais utilizado no mundo e com registro de uso em mais de 100 países (DOW AGROSCIENCES, 2014). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA – enquadra o CPF como produto agrotóxico da classe II (Altamente Tóxico) e tem seu uso agrícola autorizado, principalmente, na aplicação do controle de formigas em culturas de algodão, batata, café, milho e soja (ANVISA, 2014). Este inseticida está presente em 12 diferentes produtos registrados no Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF, 2014), entidade, vinculada através do Departamento de Defesa Sanitária e Inspeção Vegetal - DDSIV - à Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca do Estado do Espírito Santo (SEAG). Dentre suas atribuições, esse órgão

visa estabelecer as políticas de controle, fiscalização, defesa sanitária vegetal e inspeção; assim como a fiscalização e a defesa sanitária dos produtos de origem animal (SEAG, 2014).

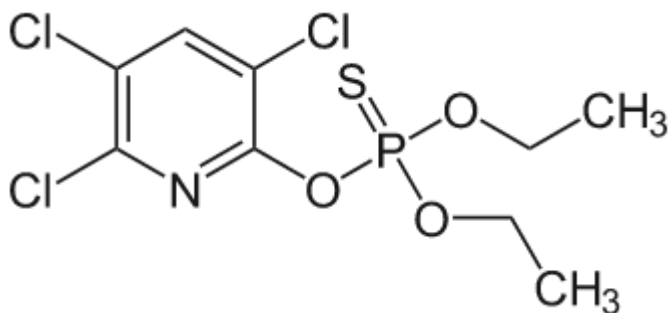


Figura 12: Estrutura química do inseticida organofosforado clorpirifós.

Fonte: Google (imagens: clorpirifós)

A ação tóxica do clorpirifós depende de ativação hepática via citocromo P450, numa reação de dessulfuração oxidativa que gera como produto o clorpirifós-oxon (CPO) (CRANE et al., 2012; KHOKHAR; TYNDALE, 2012; LAVADO; SCHLENK, 2011) ativo este, que promove a inibição das enzimas hidrolases de éster carboxílicos nas diversas sinapses que utilizam acetilcolina como neurotransmissor (MARABLE et al., 2007; MARTY et al., 2012; REISS et al., 2012).

Alterações cardiovasculares associadas ao CPF têm sido relatadas na literatura, como hipertensão e interação com receptores muscarínicos M_2 cardíacos em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (ANTHON, 2011; BOMSER; CASIDA, 2001). Conforme anteriormente mencionado, em um estudo anterior de nosso laboratório, Cunha (2014) demonstrou um prejuízo nas respostas reflexas induzidas do barorreflexo, quimiorreflexo e reflexo Bezold-Jarisch em ratos expostos agudamente ao CPF. Todavia, neste estudo não foi possível realizar uma abordagem dos efeitos da exposição aguda aos compostos OF sobre a modulação respiratória, a despeito da importante modulação que os reflexos, particularmente o quimiorreflexo, exercem sobre esses parâmetros. Alterações na atividade barorreflexa e quimiorreflexa têm sido associadas com desenvolvimento de hipertensão, sendo esta um importante fator de risco para diversas doenças cardiovasculares, como doenças coronarianas, insuficiência cardíaca, derrame e doenças renais (FERNANDEZ et al., 2015; GUYENET, 2006; HERMANSEN, 2000; KARA et al., 2003; NARKIEWICZ et al.,

1999; PERSSON, 2005; ROSENTHAL; ALTER, 2012). Em intoxicações por organofosforados, o uso necessário e prolongado de ventilação mecânica tem sido associado à um prognóstico ruim (BANDAY et al., 2015). Além disso, a hipóxia tecidual global e cerebral é relatada como um importante contribuinte para o aumento da mortalidade de pacientes intoxicados por OF's (EDDLESTON et al., 2005; HULSE et al., 2014; TANG et al., 2016). Considerando a importância do quimiorreflexo na modulação cardiorespiratória, um prejuízo do seu funcionamento na exposição ao CPF poderia contribuir significativamente para o agravamento do quadro de intoxicação, uma vez que o organismo não responderia de forma adequada à presença de hipóxia. Desta forma, estudos mais detalhados, investigando os efeitos da exposição ao CPF tanto *in vitro*, quanto *in vivo* sobre o padrão cardiorrespiratório tônico e reflexo, particularmente envolvendo o quimiorreflexo, se fazem necessários. Adicionalmente, a controvérsia envolvendo o tratamento padrão empregado na intoxicação por OF e a ausência de estudos com enfoque voltado para o efeito do mesmo sobre a restauração dos danos cardiovascular gerados, reforça ainda mais a importância de estudos voltados para se investigar essa questão.

Com base no anteriormente exposto, nós testamos a hipótese de que os prejuízos reflexos do barorreflexo e quimiorreflexo são reproduzidos em um modelo *in vitro* e que atividade reflexa respiratória do quimiorreflexo também está comprometida. Como as taxas de mortalidade em pacientes intoxicados por OF's continuam altas, mesmo entre aqueles que recebem suporte e tratamento via antídotos em unidades de tratamento intensivo, nossa segunda hipótese testada é que os tratamentos como ATR e 2-PAM não são capazes de reverter os prejuízos sobre o quimiorreflexo.

A elucidação deste aspecto é de fundamental importância uma vez que pode se apresentar como um fator que contribui para as mortalidades observadas nas fases de síndrome colinérgica aguda e intermediária, além de poder contribuir para o desenvolvimento tardio de doenças cardiovasculares em pacientes que sobrevivem aos efeitos da intoxicação aguda.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar os efeitos da exposição aguda ao CPF sobre a atividade cardiorrespiratória tônica e reflexa *in vitro* e avaliar se o tratamento padrão adotado na intoxicação é capaz de reverter os prejuízos observados sobre o quimiorreflexo *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar, na preparação tronco cerebral-coração isolados (WHBP), os padrões de disparos basais dos nervos frênico, laríngeo recorrente e simpático torácico bem como o acoplamento simpato-respiratório de animais intoxicados agudamente com CPF.
- Avaliar, na WHBP, as respostas reflexas do quimiorreflexo e do barorreflexo de animais intoxicados agudamente com CPF.
- Avaliar, na WHBP, os efeitos do bloqueio simpático, da secção vagal e do bloqueio ganglionar em animais intoxicados agudamente com CPF.
- Avaliar a efetividade *in vivo* do tratamento com atropina e pralidoxima frente às manifestações de intoxicação aguda pelo CPF.
- Avaliar a efetividade *in vivo* do tratamento com atropina e pralidoxima na reversão do prejuízo da resposta quimiorreflexa causada pela intoxicação aguda com o CPF.
- Quantificar a atividade da enzima butirilcolinesterase como marcador de efetividade para intoxicação por CPF.
- Quantificar a atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral no tronco encefálico e em núcleos bulbares envolvidos com a regulação cardiorrespiratória após a intoxicação aguda com CPF e após o emprego dos antídotos.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para os estudos *in vitro* envolvendo a preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP) foram utilizados ratos Wistar jovens com peso variando entre 60-90 g (n=16). Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos CPF e controle conforme descrição a seguir.

Para os estudos *in vivo* envolvendo a intoxicação aguda com o CPF e o emprego dos antídotos, atropina e pralidoxima, foram utilizados ratos Wistar adultos, com peso variando entre 300-400 g (n=66). Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos tratamentos e controles, conforme descrição a seguir.

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. Todos os ensaios biológicos respeitaram as normas de proteção aos animais e os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA-UFES nº 057/2014 e nº 058/2014).

3.2. PRODUTO QUÍMICO

O Clorpirifós [0,0-dietil-0-(3,5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato] foi utilizado em grau comercial (Lorsban 480 BR[®], 48% m/v, Dow[®] Agrosiences Industrial Ltda.) e diluído em solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9% - m/v) para a administração intraperitoneal (i.p.) nos animais experimentais na dose de 30 mg/Kg. A administração foi feita com injeções únicas em seringa de 1 mL no volume de 1 ml/Kg de peso corporal do rato, volume este dentro dos limites recomendados na literatura (DIEHL et al., 2001). A solução de CPF foi preparada e utilizada no mesmo

dia e os animais dos grupos controle receberam somente o veículo (solução fisiológica preparada).

Atropina e pralidoxima (Sigma-aldrich, SP-Brazil) foram preparadas no dia do experimento. Para isso foi pesada a quantidade necessária e diluída em solução fisiológica (cloreto de sódio, 0,9% - m/v) para a administração intraperitoneal (i.p.) nos animais experimentais nas doses de 10 e 40 mg/kg, respectivamente. A administração foi feita com injeções únicas em seringa de 1 mL no volume de 1 ml/Kg de peso corporal do rato.

3.3. DELINEAMENTO DO PROTOCOLO *IN VITRO*.

Os animais foram divididos aleatoriamente entre os grupos intoxicados e controle. Os animais intoxicados receberam o tratamento com clorpirifós (i.p.) 24h antes do experimento, enquanto que o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. O experimento foi executado 24h após o tratamento, quando os animais passaram por uma cirurgia preparatória para a execução da preparação tronco cerebral-coração isolados (WHBP). Durante a cirurgia preparatória; amostras de sangue foram coletadas para posterior dosagem da enzima butirilcolinesterase (BuChE). Em seguida, foi executado o experimento na WHBP e, ao término do mesmo, os animais tiveram o tronco encefálico coletado, pesado e armazenado em freezer -80°C para posterior dosagem da enzima acetilcolinesterase cerebral (AChE) (figura 13).

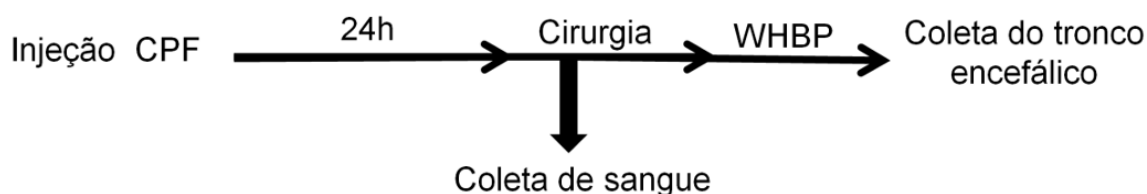


Figura 13: Delineamento do protocolo *in vitro* envolvendo a preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP).. CPF= clorpirifós.

3.4. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADO (WHBP)

3.4.1. Cirurgia e isolamento dos nervos

A preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP) é uma técnica *in vitro* que permite uma abordagem do sistema cardiorespiratório e da integração autonômica no tronco encefálico (PATON, 1996). Os animais foram profundamente anestesiados em câmara anestésica com isoflurano (Isoforine, Cristália –Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP- Brasil) até cessamento dos movimentos respiratórios torácicos. Em seguida, os animais foram retirados da câmara e foi feita uma transecção subdiafragmática. Nesse momento foi feita a coleta de aproximadamente 0,5 mL de sangue em eppendorff para posterior dosagem da enzima BuChE. Em seguida os animais foram rapidamente submergidos em solução Ringer em banho de gelo. O processo entre anestesia, transecção e coleta de sangue até a submersão na solução era executado em menos de 1 minuto. A solução ringer tinha como composição (concentrações em milimolar: 1,25 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,25 KH_2PO_4 ; 3 KCl; 25,0 NaHCO_3 ; 125,0 NaCl; 2,5 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 D-glicose). Em solução os animais foram descerebrados acima dos colículos e tiveram sua pele retirada. Em seguida, o diafragma foi retirado deixando apenas uma pequena porção onde o nervo frênico esquerdo se inseria. Após isolamento do nervo frênico ligado ao diafragma, o coração com suas inervações foi exposto através da retirada de parte das costelas e dos pulmões. Para isolamento do feixe vagal cervical bilateral, foi feita a remoção de toda musculatura adjacente. O feixe nervoso foi identificado através da sua adesão as carótidas e, após o isolamento, a visualização do feixe foi mantida por um fio de sutura passado ao redor do nervo durante o procedimento cirúrgico, de forma a permitir sua posterior secção. A identificação do nervo laríngeo recorrente, para o posterior registro, foi feita através de sua íntima adesão à lateral da traqueia.

Os animais foram então levados para a mesa de registro circundada por uma gaiola de Faraday (figura 14). Lá eles foram canulados pela aorta descendente com um cateter de duplo-lúmen. Através desse cateter, os animais foram perfundidos de forma retrógrada com solução ringer contendo o agente oncótico polipropilenoglicol

(1,25% - Sigma-Aldrich, SP-Brasil) e gaseificada com mistura carbogênica (4,93:1 mols CO_2/O_2 - White Martins, ES-Brasil), durante todo o experimento. Este perfusato era aquecido (31°C) através da passagem por um trocador de calor acoplado a um banho-maria, sendo recirculado pelo sistema por meio de uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 502s, Falmouth, Cornwall, UK). No circuito de entrada, o perfusato ainda passava por papa bolhas e por um filtro (Millipore, Billerica, MA). O segundo lúmen do cateter, estava acoplado a um transdutor de pressão permitindo o monitoramento da pressão de perfusão (PP) durante todo o experimento. Após a canulação e início da perfusão, foi administrado $70\ \mu\text{L}$ de arginina vasopressina ($4\ \text{nM}$ - Sigma-Aldrich, SP -Brasil) no perfusato de forma a obter níveis adequados de PP. Após o retorno dos movimentos respiratórios o bloqueio neuromuscular foi executado com a administração $300\ \mu\text{L}$ de brometo de rocurônio ($10\ \text{mg/mL}$ – Eurofarma laboratórios Ltda, SP-Brasil) no perfusato. A PP foi mantida acima de $60\ \text{mmHg}$, sendo a bomba peristáltica mantida numa rotação máxima de $30\ \text{rpm}$.

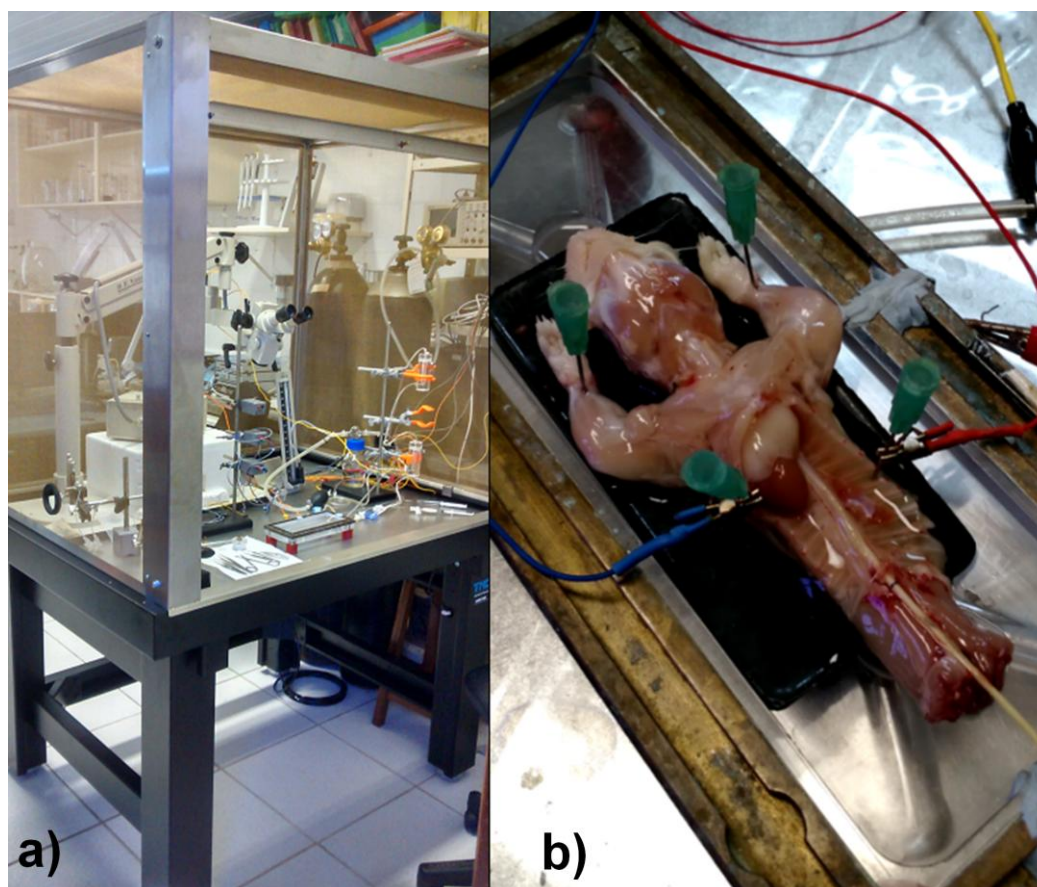


Figura 14: A. Mesa de registro circundada por gaiola de Faraday utilizada na execução da preparação tronco cerebral-corção isolado (WHBP). B. Câmara de registro demonstrando o cateter de duplo lúmen inserido na aorta descendente.

A frequência cardíaca foi derivada do eletrocardiograma (ECG). Os nervos frênico esquerdo (PNA), laríngeo recorrente direito (RLN) e simpático torácico (SNA) (T8-T10) foram registrados de forma simultânea através de um eletrodo de sucção. Todos os sinais foram amplificados e filtrados (ECG - Gain= x1000 , Low Cut-off= 10 Hz, High Cut-off= 5 kHz; PNA - Gain= x1000, Low Cut-off= 300 Hz, High Cut-off= 5 kHz; RLN - Gain= x1000, Low Cut-off= 300 Hz, High Cut-off= 5 KHz; SNA - Gain= x10k, Low Cut-off= 100 Hz, High Cut-off= 500 Hz) usando o sistema de aquisição A-M Systems (modelo 1700) e convertidos pelo conversor analógico-digital CED 1401 A/D (Cambridge Electronic Design). A escala definida foi 50 μ V para todos os canais e a taxa de conversão analógico-digital foi de 10 mil. O sistema utilizado para aquisição do sinal do transdutor de pressão foi o CED 1902, também conectado ao CED 1401. Todas as análises e coletas de dados foram feitas via Software Spike2 (CED). As atividades dos nervos foram corrigidas e integradas passo a passo em intervalos de 50 ms (figura 15).

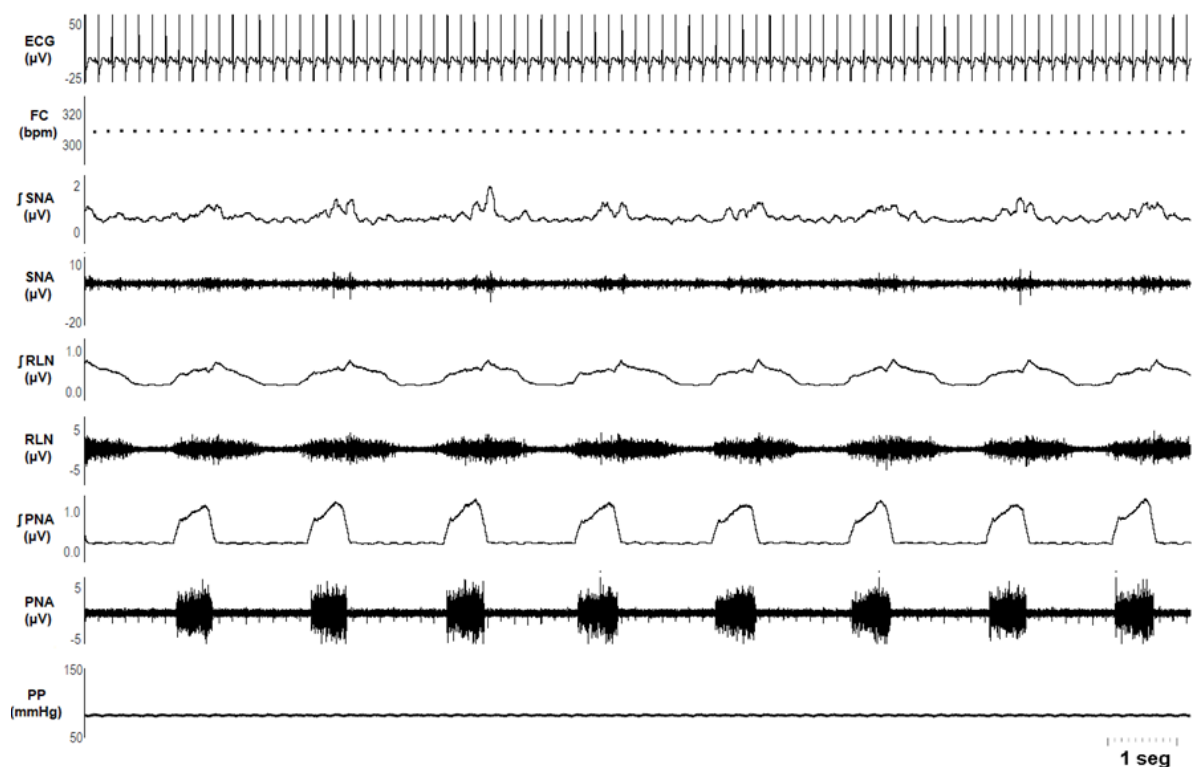


Figura 15: Registro típico da atividade basal dos nervos frênico (PNA), laríngeo recorrente (RLN) e simpático torácico (SNA), bem como do eletrocardiograma (ECG) e da pressão de perfusão (PP). A frequência cardíaca (FC) foi derivada do ECG, e as atividades integradas, identificados pelo o símbolo "J", foram derivadas do respectivo registro basal de cada nervo por meio do software spike2 (CED).

3.4.2. Protocolo experimental na WHBP

Após a captação do sinal de todos os nervos de forma simultânea, o registro dos parâmetros basais foi mantido por 15 minutos. Após o tempo de registro basal, o quimiorreflexo foi estimulado pela administração de três doses de KCN 0,03% (50, 75 e 100 μ L) *in bolus*, diretamente na cânula inserida na aorta. Foi respeitado um intervalo de 5 minutos entre cada dose. Posterior à ativação do quimiorreflexo, após um intervalo de 10 minutos, procedeu-se a ativação do barorreflexo via administração de 30 μ g de fenilefrina *in bolus* no volume de 100 μ L. Após novo intervalo de 10 minutos deu-se início às intervenções visando avaliar as alterações dos tônus simpático e parassimpático. Inicialmente fez-se a secção bilateral dos nervos vago e após 10 minutos, administrou-se atenolol ao perfusato (20 μ g/mL). Passados 5 minutos da administração do atenolol, foi feita a administração de hexametônio (também na dose de 300 nM) via perfusato. Ao final dos experimentos a bomba de perfusão foi desligada e manteve-se o registro por um intervalo de tempo entre 5-10 minutos para captação do sinal do ruído (figura 16).

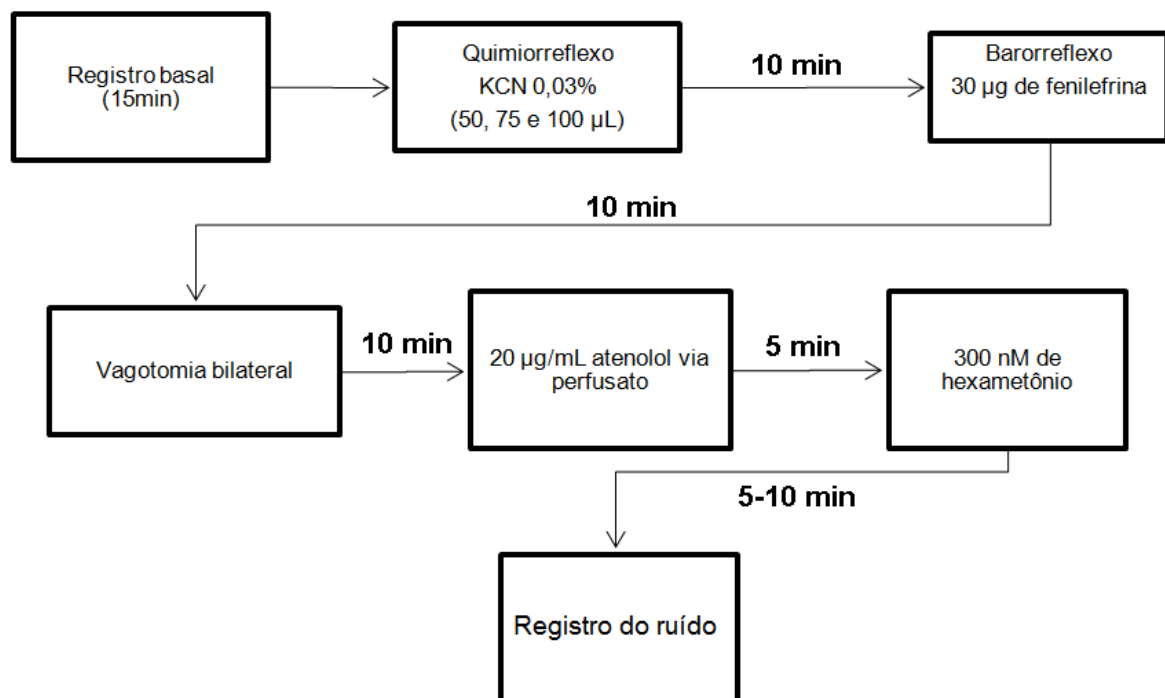


Figura 16: Protocolo de experimento na preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP) indicando os tempos de intervalo e a sequência adotada.

3.4.3. Atividades dos nervos frênico, laríngeo recorrente, simpático torácico e acoplamento simpato-respiratório

A atividade basal dos nervos frênico, laríngeo recorrente, bem como a análise do acoplamento simpato-respiratório, derivada dos registros dos nervos frênico e simpático torácico foram processadas através de Script próprio desenvolvido pela Dr. Ana Paula Abdala (detentora dos direitos autorais) usando-se o canal integrado do nervo frênico como referência para o ciclo respiratório. A coleta dos parâmetros basais ocorreu ao final do período de registro basal em um período equivalente a 1 minuto.

Os parâmetros oriundos da análise da descarga basal do nervo frênico foram: frequência de disparo (f-PNA), tempo da inspiração (TI), tempo da expiração (TE), tempo do ciclo respiratório total (Ttot), amplitude do pico inspiratório (P-AMP), tempo para o pico inspiratório (T-P), área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e a área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI).

Os parâmetros derivados da análise da atividade basal do nervo laríngeo recorrente foram: área sob a curva na inspiração (AUC-I), área sob a curva na inspiração normalizada pelo TI (AUC-I:TI), área sob a curva do disparo pós inspiratório (Post-I) do RLN (AUC-PI), área sob a curva do disparo post-I do RLN normalizada pelo tempo da primeira fase da expiração (E1) (AUC-PI:E1), Duração do disparo Post-I do RLN (Dur-PI), relação da duração do disparo Post-I do RLN pelo tempo expiratório (Dur-PI:TE) e o pico do disparo post-I do RLN.

Por fim, os parâmetros derivados da análise do acoplamento simpato-respiratório foram: atividade simpática no pico inspiratório (Pico-I), atividade simpática no pico da fase E1 (Pico-E1), atividade simpática no pico da segunda fase da expiração (E2) (Pico-E2), média da atividade simpática na fase inspiratória (I-trough), média da atividade simpática na fase E1 (E1-trough), média da atividade simpática na fase E2 (E2-trough), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória (I-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória normalizada pelo TI (I-

AUC:TI), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 (E1-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 normalizada pelo tempo de E1, área sob a curva da atividade simpática na fase E2 (E2-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E2 normalizada pelo tempo de E2 (E2-AUC:E2).

3.4.4. Quimiorreflexo

O quimiorreflexo foi quantificado através das medidas da variação do aumento da pressão de perfusão (ΔPP), do porcentual de aumento da taxa de disparo do nervo frênico e da atividade simpática durante o pico da primeira descarga do nervo, além da bradicardia máxima atingida. Um traçado típico ilustrando a resposta do baroreflexo obtida na WHBP é mostrado na figura 17.

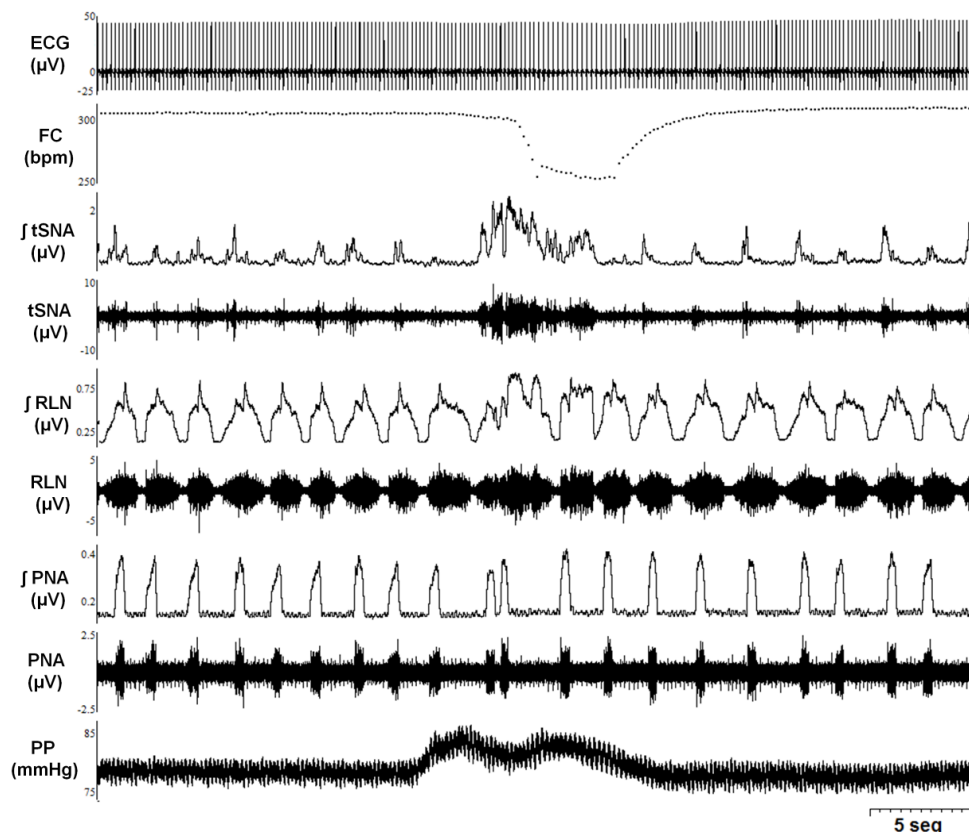


Figura 17: Traçado típico de um animal controle ilustrando a resposta induzida frente estimulação do quimiorreflexo com KCN (100 μ g) na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA- Atividade do simpático torácico, $\int$ SNA – Atividade simpático torácico integrado, RLN – Nervo laríngeo recorrente, $\int$ RLN – Nervo laríngeo recorrente integrado, PNA – Atividade basal dos nervos frênico, $\int$ PNA – Atividade basal dos nervos frênico integrado e PP– Pressão de perfusão.

3.4.5. Barorreflexo

Para o barorreflexo foi determinado o percentual de inibição da atividade simpática no pico máximo da resposta pressora induzida pela fenilefrina e a bradicardia máxima alcançada; o ganho simpático, determinado pela razão do percentual de inibição da atividade simpática pela resposta pressora e o ganho bradicárdico, determinado pela razão da bradicardia máxima pela resposta pressora. Um traçado típico ilustrando a resposta do barorreflexo obtida na WHBP é mostrado na figura 18.

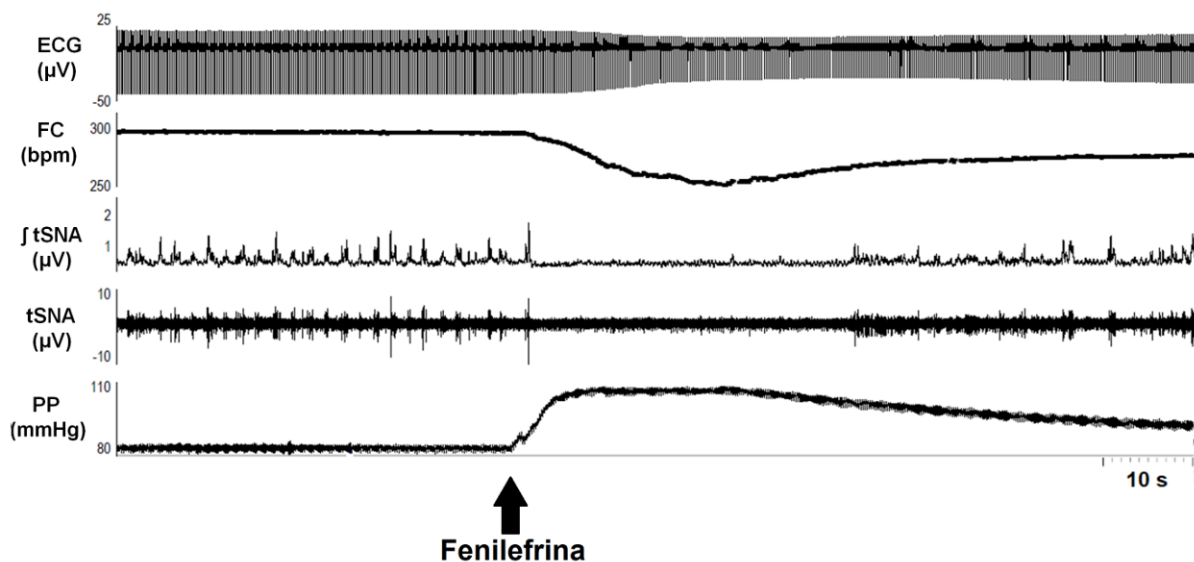


Figura 18: Traçado típico de um animal controle ilustrando a resposta induzida frente estimulação do barorreflexo com fenilefrina (30 µg) na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA - Atividade do simpático torácico, ∫SNA – Atividade simpático torácico integrado e PP – Pressão de perfusão.

3.4.6. Modulação da atividade simpática e parassimpática

Após a vagotomia, foi avaliada a variação da frequência cardíaca basal a fim de determinar o tônus parassimpático nos animais. O atenolol e o hexametônio foram utilizados para avaliar o tônus simpático cardíaco e a atividade simpática remanescente, respectivamente. A variação total da frequência cardíaca e o percentual de inibição da atividade simpática foram analisados pós administração do atenolol. O percentual de inibição da atividade simpática foi determinado pela diferença das médias de atividade tSNA do canal integrado 5 segundos antes da administração do atenolol e durante 5 segundos, ao final de 5 minutos pós bloqueio.

Após a administração do hexametônio foram analisados o percentual de inibição da atividade simpática, semelhante ao descrito para o atenolol, a variação da pressão de perfusão, assim como a variação da frequência cardíaca. Traçados típicos das respostas pós vagotomia e bloqueios com atenolol e hexametônio, obtidos na WHBP, são mostrados nas figura 19 e 20.

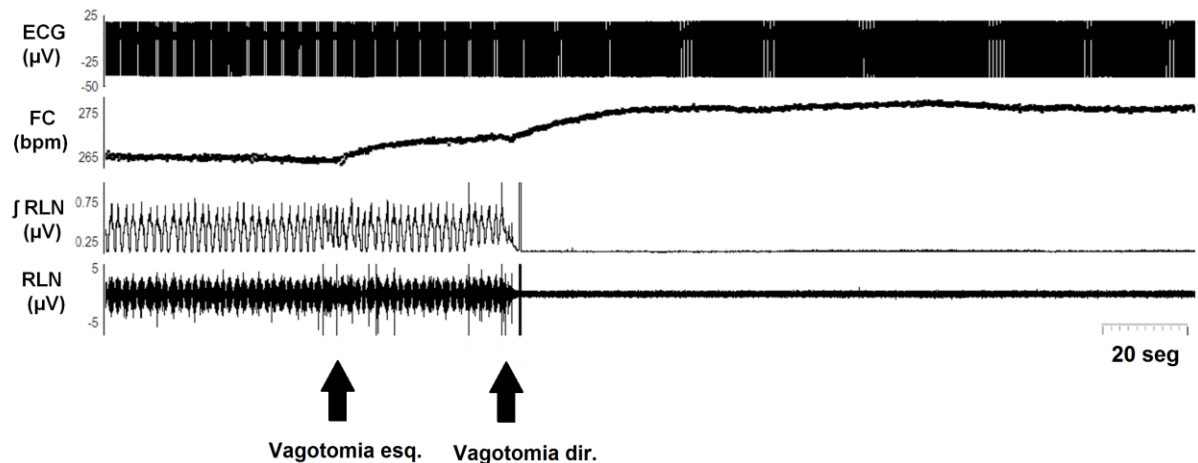


Figura 19: Traçado típico ilustrando a secção bilateral do nervo vago em animais na WHBP. ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, RLN – Nervo laríngeo recorrente e $\int$ RLN – Nervo laríngeo recorrente integrado.

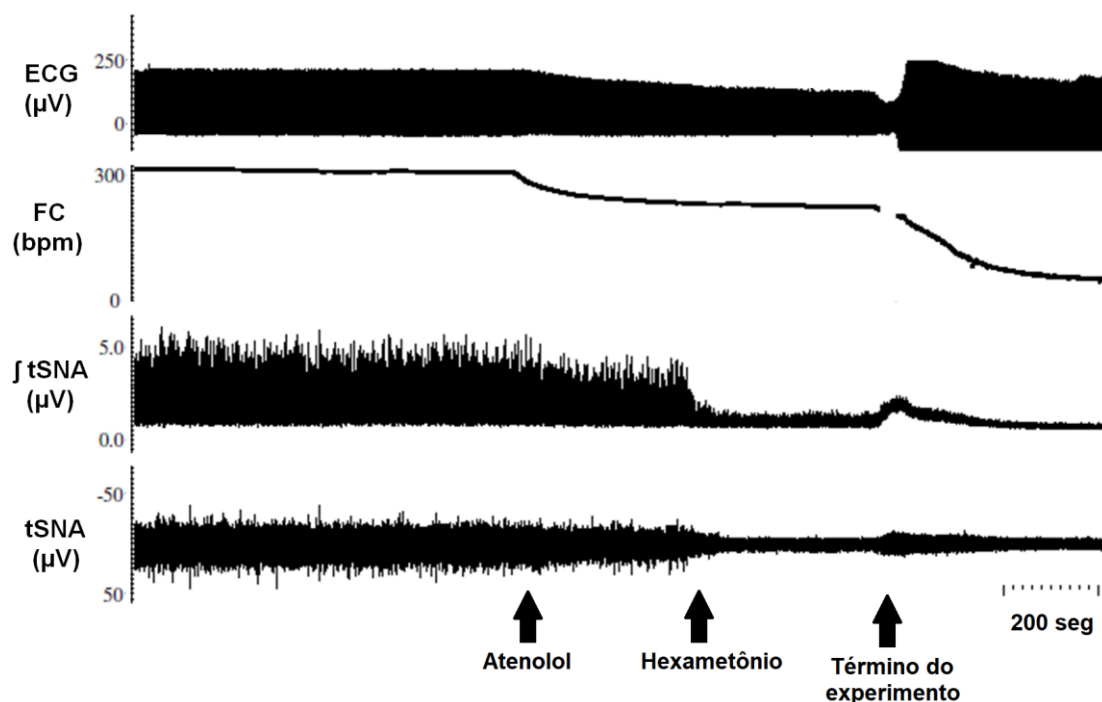


Figura 20: Traçado típico ilustrando os efeitos dos bloqueios com atenolol e hexametônio na preparação tronco-cerebral coração isolados (WHBP) sobre a atividade simpática (% inibição da tSNA) e sobre a frequência cardíaca (Δ FC). ECG – Eletrocardiograma; FC – Frequência Cardíaca derivada do ECG, SNA- Atividade do simpático torácico, $\int$ SNA – Atividade simpático torácico integrado.

3.5. DELINEAMENTO DO MODELO ANIMAL *IN VIVO*

Os animais passaram por uma cirurgia de canulação da artéria e veia femoral e 24h após foram divididos aleatoriamente entre os grupos: intoxicados e controles. Os animais foram injetados com clorpirifós ou salina e após 1h da administração foi feito o tratamento com os antídotos de acordo com os grupos apresentados no esquema da figura 21, gerando os grupos de tratamento final. Os animais foram observados por um período de aproximadamente 3 horas quanto à presença ou ausência de sinais clínicos característicos da intoxicação por organofosforados, tais como tremor, sialorreia, e ataxia seguindo metodologia descrita por Salazar (2011). O quadro 1 exibe o modelo de relatório utilizado para o registro destes sinais durante os testes; a avaliação quanto a manifestação do sinais de intoxicação foram categorizados em graus de intensidade de 0-4. Sendo 0= ausente, 1= presente leve, 2= presente moderado, 3= presente intenso e 4= presente muito intenso. A identificação destes sinais, juntamente com a dosagem plasmática da butirilcolinesterase, colabora com a avaliação da efetividade do tratamento em cada animal.

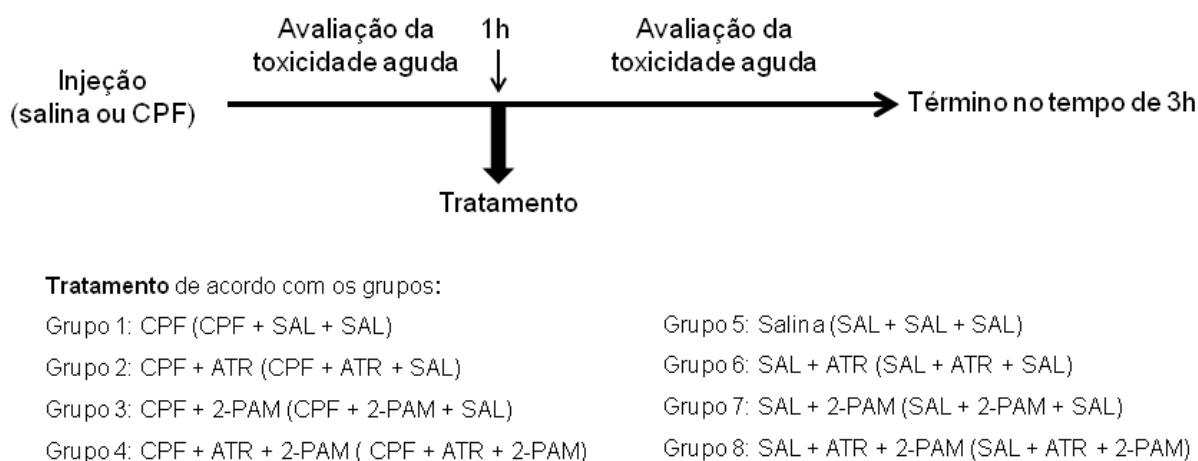


Figura 21: Curso temporal dos tratamentos.

3.5.1. Grupos de tratamento e doses adotadas:

Grupo 1: CPF na dose de 30 mg/Kg

Grupo 2: CPF + atropina na dose de 10 mg/Kg

Grupo 3: CPF + pralidoxima na dose de 40 mg/Kg

Grupo 4: CPF + atropina (10 mg/Kg) + pralidoxima (40 mg/Kg)

Grupo 5: Salina

Grupo 6: Salina + atropina na dose de 10 mg/Kg

Grupo 7: Salina + pralidoxima na dose de 40 mg/Kg

Grupo 8: Salina + atropina (10 mg/Kg) + pralidoxima (40 mg/Kg)

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

Parâmetros	10'	30'	45'	60'	1h 20'	1h 40'	2h	3h
Ataxia								
Tremores								
Sialorreia								

0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso e 4= presente muito intenso

A dose de CPF foi definida em estudos prévios de nosso laboratório como sendo a dose que apresentava sinais de intoxicação sem produzir letalidade (CUNHA, 2014). As doses de atropina e pralidoxima foram definidas com base no trabalho de Kose e colaboradores (2009). Os experimentos seguiram o curso temporal demonstrado na figura 22.

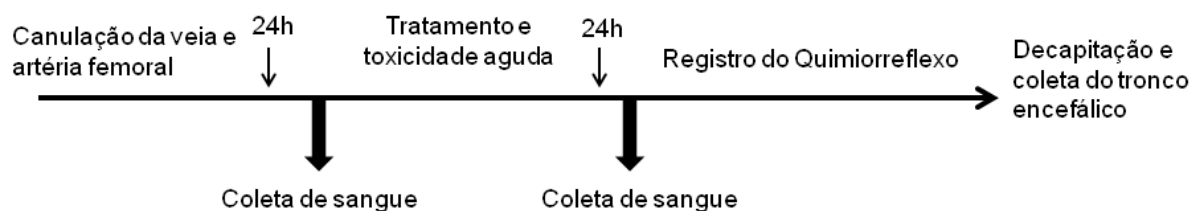


Figura 22: Curso temporal dos experimentos.

3.6. ENSAIOS CARDIORESPIRATÓRIOS:

3.6.1. 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 do procedimento de intoxicação e da administração dos tratamentos. A cânulação foi realizada na artéria e na veia femoral; a cânula arterial permitiu o registro dos parâmetros citados acima, enquanto que a venosa permitiu a administração intravenosa de drogas para a ativação dos reflexos. A cânula arterial possibilitou ainda a coleta de sangue para a análise da atividade da enzima butirilcolinesterase.

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 foram distintas das cânulas venosas no pino de metal. Os animais foram previamente anestesiados com tribromo etanol (250 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 fibrosa entrelaçada foi limpa, permitindo a visualização do feixe vâsculo 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 foi lavada com solução salina heparinizada para evitar a formação de coágulos (Figura 23).



Figura 23: Cirurgia de cânulação da artéria e veia femoral.

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

3.6.2. Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

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).

Em protocolos anteriores de nosso laboratório foi verificado que na coleta dos valores de frequência cardíaca obtidos pelo software frente à ativação dos reflexos há discrepância entre a resposta no canal derivado da FC e o evento fisiológico observado no canal de PAP. Assim, a avaliação do quimiorreflexo foi processada em modo *off line* através da contagem dos pulsos pressóricos registrados no canal de PAP ao longo da resposta hipertensora a partir do início da resposta. A bradicardia real foi determinada pela razão dos picos pressóricos em função do tempo.

3.6.3. Avaliação do quimiorreflexo

A avaliação do quimiorreflexo foi feita a partir da administração intravenosa da solução aquosa de cianeto de potássio (KCN), segundo o método descrito por Franchini e Krieger (1993). Nesse estudo foram registradas as respostas hipertensoras, bradicárdicas e taquipneica promovidas por meio da ativação dos quimiorreceptores periféricos. Para avaliação do componente respiratório foi

utilizada uma câmara pletismográfica de corpo inteiro para pequenos animais através do método barométrico de medição (Figura 24) (BARTLETT; TENNEY, 1970). O método de pletismografia se baseia na concepção de que, quando o animal está na câmara, o volume corrente de ar inspirado é aquecido e saturado com vapor de água pelo corpo do animal. Isso faz com que o ar se expanda dentro dos pulmões e aumente a pressão na câmara, o que é detectado pelo transdutor. Quando o animal expira o ar presente nos pulmões, o mecanismo é inverso. Este ar é resfriado pela temperatura da câmara, ocorre perda de umidade e com isso ocorre uma pequena compressão do volume pulmonar, que também gera uma alteração de pressão na câmara detectada pelo transdutor (MORTOLA; FRAPPELL, 1998). Os componentes respiratórios avaliados através da pletismografia foram frequência respiratória (f_R), volume corrente (V_T) e volume minuto (V_E). A Câmara pletismográfica foi acoplada a um espirômetro (ML141 Spirometer, PowerLab, AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia), sendo o registro feito através do software do sistema (LabChart®, AD Instruments, Bella Vista, NSW, Australia).



Figura 24: Rato Wistar dentro da câmara pletismográfica que permitia o registro dos parâmetros respiratórios.

Foram administradas em cada rato as doses de 10, 20, 40 e 80 μg de KCN de forma aleatória (FRANCHINI; KRIEGER, 1993). Entre cada dose houve intervalo mínimo de 10 minutos para a estabilização dos parâmetros cardiorrespiratórios. A ativação deste reflexo foi avaliada a partir das respostas registradas após a administração do KCN: diminuição da FC, aumento da PAM e aumento da f_R (Figura 25).

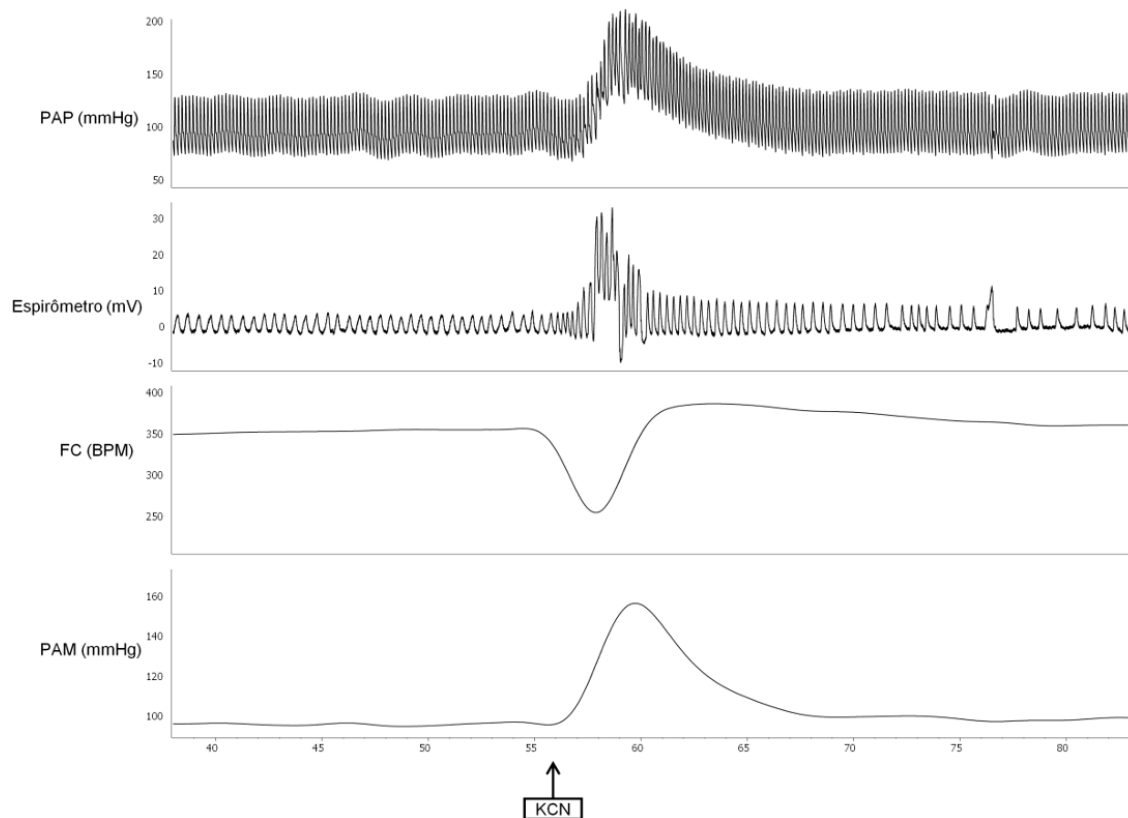


Figura 25: Traçado típico da resposta do quimiorreflexo frente ativação com solução de cianeto de potássio (KCN) *in vivo*. PAP= Pressão arterial pulsátil, FC= frequência cardíaca, PAM= Pressão arterial média.

3.6.4. Análise da frequência respiratória (f_R)

A f_R foi calculada manualmente, durante os intervalos de 20 segundos antes e 20 segundos após a injeção intravenosa de KCN. A câmara era fechada no momento da administração, não podendo ficar vedada por mais de 2 minutos. Para a quantificação da f_R foi contado o número de picos em intervalos de 2 em 2 segundos e calculado a frequência respiratória de cada intervalo. Os valores de frequência respiratória foram plotados ao longo do tempo para análise longitudinal (CRESTANI et al., 2009; RAISMAN; COWAN; POWELL, 1966).

3.6.5. Análise do volume corrente e do volume minuto nos animais

Foram calculados os valores basais de V_T e V_E dos animais nos 20 segundos antes da estimulação do KCN. Estes cálculos foram efetuados a partir da fórmula (1) (DRORBAUGH; FENN, 1955). Somente a f_R foi avaliada durante a ativação do

quimiorreflexo, pois a resposta comportamental de fuga induzida pelo KCN leva a um aumento da amplitude do sinal respiratório, prejudicando a análise do V_T e do V_E . Para a obtenção de uma análise confiável dos parâmetros respiratórios, o animal precisou permanecer em estado de repouso. A movimentação do animal interfere na captação e análise dos ciclos respiratórios, sendo esse um fator limitante da técnica. Portanto, os animais foram ambientados à câmara pletismográfica pelo menos 30 minutos antes do início dos experimentos e somente após a ambientação foram submetidos à experimentação.

A calibração do volume foi obtida para cada experimento injetando-se um volume de 1 mL dentro da câmara do animal através de uma seringa graduada. Este procedimento foi efetuado três vezes e a média aritmética das amplitudes geradas por essas injeções, em milivolts, foram utilizadas na fórmula. O V_T e o V_E foram obtidos no intervalo de 20 segundos antes da administração de KCN calculando a amplitude em milivolts para cada intervalo de 2 segundos. A partir dos pontos gerados foi feita a média aritmética, que por fim foi utilizada na fórmula. A temperatura da câmara foi medida durante todo o experimento e computada para cada administração de KCN.

Fórmula 1: Fórmula para avaliação dos parâmetros respiratórios

$$V_T = \frac{PT}{PK} \times V_k \times \frac{T_c (PB - PA)}{T_c (PB - PA) - TA (PB - PC)}$$

$$V_E = V_T \times f_R$$

V_T : Volume corrente

V_K : Volume de ar injetado para calibração

PT : Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente

PK : Deflexão de pressão associada com o volume injetado para calibração

TC : Temperatura corporal

TA : Temperatura do ar dentro da câmara do animal

PB : Pressão barométrica

PC: Pressão de vapor de água na temperatura corporal

PA: Pressão de vapor de água na temperatura da câmara do animal

V_E: Volume minuto

3.7. DOSAGENS ENZIMÁTICAS

Foram avaliadas neste estudo a atividade das enzimas butirilcolinesterase (BuChE) no plasma e, acetilcolinesterase cerebral (AChE) em todo tronco encefálico e em *punchs* do tronco encefálico contendo os núcleos bulbares: núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.

3.7.1. Obtenção e processamento das amostras de plasma para dosagem da BuChE

As amostras de sangue foram coletadas através da cânula inserida na artéria femoral dos animais. A coleta de sangue foi feita em Eppendorf heparinizado antes e após o tratamento, permitindo que o animal fosse controle dele mesmo. O plasma foi obtido por centrifugação das amostras de sangue a 7.200 G por 10 minutos a 4°C utilizando uma microcentrífuga (Centrifuge 5415R – Eppendorf AG. Hamburgo, Alemanha) e armazenado até o momento da dosagem, em temperatura -80°C. O método utilizado seguiu as etapas indicadas no kit de determinação da enzima.

3.7.2. Determinação da atividade da colinesterase plasmática (BuChE)

A atividade colinesterásica foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Dietz; Rubinstein; Lubrano, (1973) com modificações, utilizando o kit para determinação de colinesterase da marca Bioclin (Colinesterase – K094[®] Quibasa química básica LTDA., Minas Gerais, Brasil) no analisador bioquímico semi-automático (TP Analyzer Plus[®], Thermoplate, China). A inibição na atividade dessa enzima permite a avaliação da eficácia do tratamento com o inseticida clorpirifós.

O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da colinesterase sobre a butirilticolina, 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 absorbância é medido a 405 nm. No teste, foram adicionados a um tubo de ensaio 10 µL da amostra e 500 µL do reagente 1 (tampão reagente: pirofosfato pH 7,6 e hexacianoferrato (III) de potássio). Em outro tubo – reagente branco – foram adicionados 10 µL de água destilada e 500 µL deste mesmo reagente. Após misturar e incubar a 37°C os tubos por aproximadamente 3 minutos em banho-maria, adicionou-se em ambos 125 µL do reagente 2 (substrato: butiriltiocolina). Por fim, os tubos foram incubados por mais 2 minutos e a leitura colorimétrica foi feita no analisador bioquímico semi-automático termostatizado (37°C) em 405 nm. A mudança de absorbância é medida por minuto ($\Delta A/\text{min}$) após 1, 2 e 3 minutos exatos. As dosagens foram feitas em duplicatas e a atividade expressa em U/L (um U de colinesterase corresponde à quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de substrato/minuto/mL de soro, a 37°C) e calculada a partir da fórmula (2), disponível nas descrições do kit utilizado:

Fórmula 2: Fórmula para o cálculo da atividade da BChE

$$\Delta A/\text{min} = (\Delta A/\text{min da amostra}) - (\Delta A/\text{min do branco})$$

$$\text{Atividade (U/L)} = \Delta A/\text{min} \times 68500$$

3.7.3. Obtenção e processamento das amostras do tronco encefálico para dosagem da AChE cerebral

O tronco encefálico foi obtido através da decapitação dos animais utilizando guilhotina (EB-271[®] Insight - Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP). Num prazo entre 2 a 5 minutos o tronco encefálico foi isolado, acondicionado em Eppendorf previamente pesado em balança analítica (Celtac modelo FA2104N - TDS Instrumental Tecnologia Ltda. Tijucas Do Sul, PR) e armazenado em freezer -80°C até o momento da dosagem. Todo procedimento de retirada e isolamento do tronco encefálico foi realizado em gelo e com lavagens periódicas de solução salina gelada. Após a decapitação do animal o SNC foi removido da caixa craniana e colocado sobre uma placa de petri com papel de filtro. O tronco encefálico foi obtido através de um corte transversal na região da primeira cervical e outro no final da ponte

segundo o atlas de Paxinos e Watson (2009). O cerebelo foi delicadamente removido com a pinça através da desconexão dos pedúnculos cerebelares e deslocamento horizontal. Após esse procedimento foi permitido a visualização do início do aqueduto de Sylvius e da matéria cinzenta periaquedutal. Com a identificação dessas regiões anatômicas, foi feita uma leve elevação do mesencéfalo no sentido frontal com a pinça, permitindo que um corte transversal pegasse estruturas de projeções mais anteriores da ponte (Figura 26 e 27), objetivando a inclusão dos núcleos parabraquial, Kölliker-Fuse e locus ceruleus que apresentam funções sobre o sistema respiratório (SPYER; GOURINE, 2009).

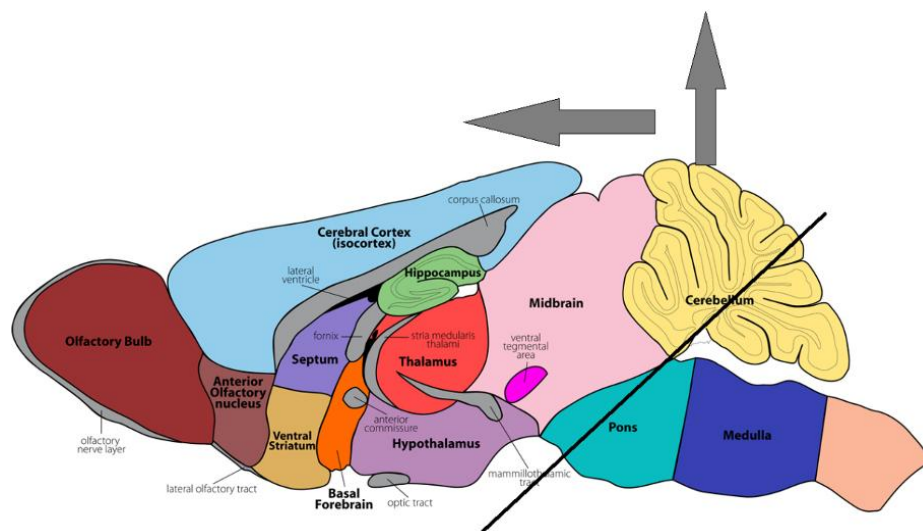


Figura 26: Esquema ilustrativo mostrando o local onde foi feito o corte na região mais anterior do tronco encefálico. Setas em cinza indicam a direção em que ocorreu a elevação no mesencéfalo para que fosse feito o corte; Linha em preto indica o caminho feito pelo corte transversal.

Fonte: Google (imagens: rat brain atlas).



Figura 27: Foto do tronco encefálico de um animal após procedimento de remoção descrito.

3.7.5. Determinação da atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE)

A atividade da acetilcolinesterase cerebral foi mensurada de acordo com o método colorimétrico descrito por Ellman e colaboradores (1961) e modificado por Lassiter e colaboradores (2003). A amostra do tronco cerebral do animal, previamente pesada, foi homogeneizada em tampão fosfato (pH= 8,0; 0,1M) e 1% de Triton (Triton X-100) (v/v) na proporção de 20 mg de tecido para cada 1 mL de tampão. A homogeneização foi feita em um macerador de tecido Potter-Elvehjem (TE-099, Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda, SP-Brazil) e pistilo de teflon durante um tempo total de 5 minutos, sendo feita a trituração em períodos de 30 segundos com intervalos de 10 segundos para o descanso da amostra. Após a homogeneização a amostra foi transferida para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado (Centrifuge 5804R – Eppendorf AG. Hamburgo, Alemanha) sob refrigeração a 4°C durante 5 minutos a 7.800G. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um Eppendorf. Todo o procedimento foi executado em gelo.

Uma alíquota de 135 µL desse homogenato foi adicionada em uma cubeta contendo 820 µL de tampão (pH= 8,0) e 35 µL de DTNB. O reagente ácido Ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M foi preparado no dia do experimento; 1,9 mg do ácido foi dissolvido em 100 µL de NaOH 0,1M e q.s.p. de água para 1mL, seguido de agitação em vortex. A amostra com os reagentes na cubeta foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente na bancada e em seguida adicionado 10 µL do substrato. O substrato foi o iodato de acetiltiocolina 0,075 M (21,67 mg/mL). O princípio de ação desta técnica consiste na ação catalítica da acetilcolinesterase sobre a Acetiltiocolina, a qual é hidrolisada em tiocolina e acetato. A tiocolina então reage com o DTNB em uma reação de substituição nucleofílica liberando o ânion de cor amarelo ácido 5-tio-2-nitro-benzóico. A análise foi feita pelo método cinético e lida no comprimento de onda de 412 nm em espectrofotômetro (Epoch 2 Microplate Spectrophotometer – BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA). Nas amostras ainda foi feita a quantificação da proteína pelo reagente de Bradford e a atividade da enzima calculada segundo a fórmula (3) (BRADFORD, 1976).

Fórmula 4: Fórmula para o cálculo da atividade da AChE em função da quantidade de proteína

$$U = (1000 \cdot \Delta A \cdot 60) / (13,6 \cdot 13 \cdot X)$$

Δ abs: Variação de Absorbância (calculada pelo equipamento)

1000: Volume total reação

X: Concentração de proteína em mg

60: minutos

13.6: Valor de correção

135: Volume amostra

3.7.3. Obtenção e processamento dos *punchs* de cortes do tronco encefálico contendo as amostras dos núcleos ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.

Para a obtenção dos *punchs*, um grupo adicional de 20 ratos Wistar foi aleatoriamente dividido em grupos de acordo com os tratamentos: Salina, CPF e CPF + 2-PAM. Os animais foram tratados seguindo o protocolo do modelo *in vivo* e 24h depois foram guilhotinados e as amostras dos *punchs* coletadas. O tronco encefálico foi posicionado na matriz de acrílico para cérebros e as porções rostral, a partir do mesencéfalo, e caudal da medula espinhal foram removidas por meio de secção com lâmina de micrótomo. Posteriormente, foram feitos dois cortes transversais tendo como referência a ponta do obex. O primeiro corte de espessura de 2 mm no sentido rostral objetivava atingir, aproximadamente, as seguintes coordenadas: Bregma -12,96 mm e interaural -3,96 mm. Já o segundo corte, agora com espessura de 1 mm, partia do final do primeiro corte seguindo o mesmo sentido rostral e objetivava atingir, aproximadamente, as seguintes coordenadas: Bregma -12,00 mm e interaural -3,00mm. As referências das coordenadas foram seguidas pelo atlas de Paxinos e Watson (2009) (Figura 28).

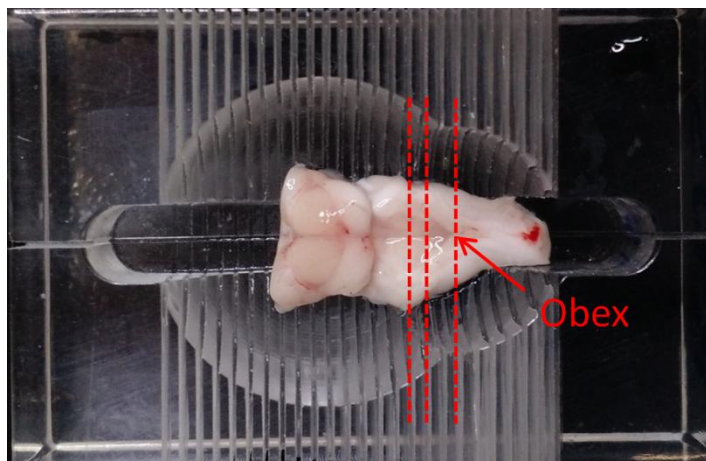


Figura 28: Figura esquemática mostrando os locais dos cortes executados para obtenção posterior dos *punchs* tendo-se como referência o Obex. Primeiro corte contendo 2 mm e segundo 1 mm de espessura.

Em seguida, os cortes foram colocados em uma placa de petri de fundo escuro com o papel de filtro molhado com solução salina gelada. Uma vez identificado os núcleos de interesse, foram utilizados os trocâteres para Punch (1 e 2mm de diâmetro) para coleta dos tecidos. Estes foram transferidos para um eppendorf contendo tampão fosfato com volume previamente estabelecido com base na massa total de tecido referente a cada *punch*. No primeiro corte com 2 mm de espessura porções contendo os núcleos ambíguos foram retiradas usando o trocáter de 1 mm de diâmetro e adicionados em eppendorf contendo 265 μ L de tampão. Como os núcleos RVLM/preBötC estão anatomicamente muito próximos um do outro, para obtenção dos *punchs* contendo esses núcleos, foi utilizado o trocáter de 2 mm de diâmetro no corte de 1 mm de espessura, sendo os tecidos colocados em eppendorf contendo 352 μ L de tampão. Já o NTS foi retirado de ambos os cortes; sendo que para sua remoção na fatia de 2 mm foi utilizado o trocáter de 2 mm de diâmetro, removendo-se todo o NTS ao redor do canal central, e na fatia de 1 mm de espessura, foi utilizado o mesmo trocáter, todavia procedendo a remoção bilateralmente. Todas as secções contendo o NTS foram colocados em eppendorf contendo 579 μ L de tampão (Figura 29). Os tecidos cerebrais foram homogeneizados (adaptado – Dremel 7700 7,2V MultiPro, EUA) no mesmo dia da coleta dos tecidos. O homogenato então foi centrifugado e o sobrenadante coletado nas mesmas condições previamente mencionadas. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da dosagem, e esta seguiu o mesmo protocolo previamente descrito para o tronco inteiro.

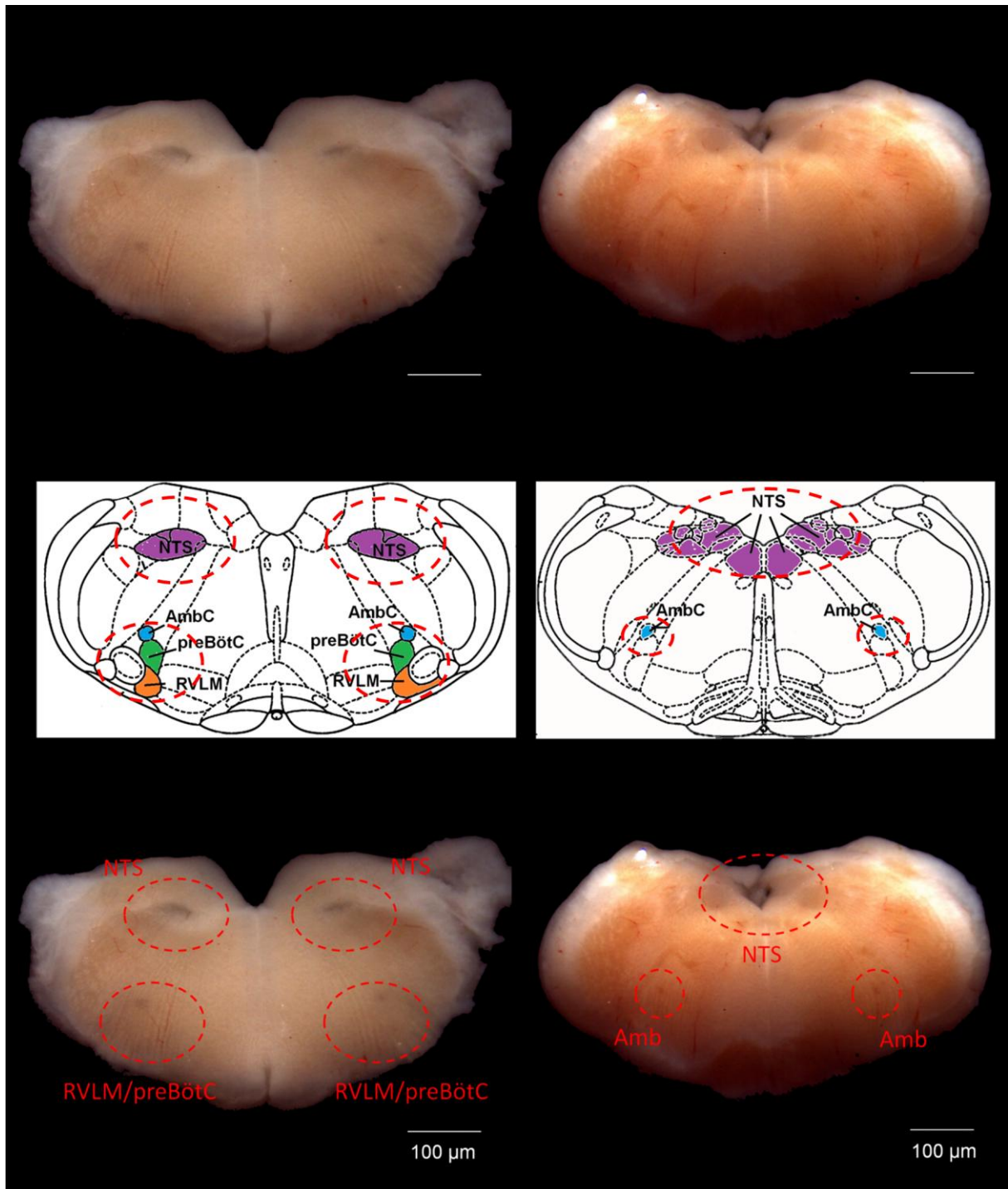


Figura 29: Figura esquemática mostrando os cortes usados para obtenção dos punches, com as respectivas identificações referentes aos núcleos obtidas do Atlas de Paxinos e Watson. Corte da direita: espessura de 2 mm, corte da esquerda: espessura de 1 mm. NTS= núcleo do trato solitário, RVLM/preBötC= bulbo rostral ventrolateral junto ao complexo Pré-Bötzinger e Amb= núcleo ambíguo.

3.8. ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 para Windows (IBM SPSS Statistics®, Chicago, IL, EUA). A presença de “outliers” foi verificada através do programa XLSTAT para excel. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software®, San Diego California USA). O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$ e os dados apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os métodos de análise empregados para cada conjunto de parâmetros se encontram descritos nos itens a seguir.

3.8.1. Análise da atividade basal dos nervos frênico, laríngeo recorrente, acomplamento simpato-respiratório, atividade do barorreflexo, modulação simpática e parassimpática e atividade das enzimas BuChE e AChE na WHBP.

Para análise desses dados foi efetuado teste *t*-Student não pareado. Antes da análise estatística todos os dados foram checados para a presença de “outliers” pelo teste de Grubb unicaudal. Quando se suspeitava de mais de um “outlier” presente, então, a verificação foi feita seguindo método de Hoaglin e Iglewicz (1987). Adicionalmente, a distribuição de normalidade foi testada através do teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Quando uma variável não apresentava distribuição normal, esta foi transformada matematicamente ($\log_{10}$, raiz quadrada ou $\ln$) a fim de se alcançar a normalidade.

3.8.2. Análise da atividade do quimiorreflexo na WHBP

A resposta pressora, a simpatoexcitação e a resposta bradicárdica tiveram suas análises feitas através de um modelo linear misto. Sendo assim, para essas três respostas o modelo foi desenhado com dois fatores fixos. O KCN foi considerado um fator categórico ordinal com três níveis (50, 75 e 100 μl), funcionando como um fator de bloqueio pareado para diminuir a variabilidade das respostas da nossa variável dependente. O segundo fator fixo foi o tratamento com CPF, apresentando dois níveis (sim e não) sendo “sim” o animal que recebeu o CPF e “não” o animal

controle. Além disso, a identificação do animal "Rato ID" foi considerada um fator aleatório, pois todos os animais receberam as três doses de KCN, o que acaba com a independência das respostas. A necessidade de incluir cada animal como fator aleatório foi checada pela alta variabilidade dos coeficientes de variância (CV) referente a cada animal na tabela descritiva do modelo; tendo animais apresentado CV= 6,9% enquanto que outros apresentaram CV= 87,3%. Além dos efeitos principais, os fatores independentes fixos foram cruzados através da análise da interação, já o fator aleatório "Rato ID" foi aninhado dentro do fator CPF e a análise de post hoc executada segundo ajuste de Bonferroni. Não foi possível proceder a interação entre o fator aleatório e o KCN, pois promoveria a adição de uma quantidade de parâmetros superiores ao número de observações do modelo, não havendo graus de liberdade suficientes para as estimações. A matriz de covariância adotada para o fator aleatório para as variáveis, resposta pressora, simpatoexcitação e a taxa de disparo do nervo frênico foi a "simetria composta", já para a resposta bradicárdica foi a "simetria composta: métrica de correlação". As matrizes de covariância foram determinadas a partir dos critérios de informações de Akaike (AIC), sendo escolhida a matriz que apresentasse o menor valor de AIC. A suposição do modelo ainda foi checada quanto à normalidade dos resíduos através da análise do QQ-PLOT (ver em anexo 1-4).

O aumento da taxa de disparo do nervo frênico não apresentou distribuição normal de seus resíduos. Portanto, para a análise desse parâmetro, foi executado um modelo misto generalizado (GLMM), sendo a distribuição de probabilidade e a função de ligação definidos através do valor de AIC. Para ambos o desenho do modelo seguiu ao anteriormente descrito, porém a função de probabilidade foi do tipo gama e a função de ligação utilizada foi o *log*.

3.8.5. Análise dos parâmetros de avaliação da toxicidade aguda no modelo *in vivo*

No intuito de avaliar os efeitos dos tratamentos com atropina e 2-PAM sobre as manifestações de toxicidade aguda, os animais foram agrupados apenas entre aqueles que manifestaram determinado sinal (ataxia, tremor e sialorreia). Portanto,

avaliando cada sinal de toxicidade de forma individual, aqueles animais que não manifestaram seus efeitos em nenhum momento ao longo das 3h foram excluídos da análise estatística. Para a análise foi feita uma regressão logística multinomial ordinal com função de ligação *Logit* acumulativo através do modelo misto generalizado. O modelo foi desenhado tendo uma variável dependente categórica ordinal com cinco níveis de ordenamento (ausente, leve, moderado, intenso e muito intenso). Como o tratamento com os antídotos ATR e 2-PAM foi administrado somente a partir do tempo de 1 hora, o modelo referente aos tempos de 30 e 45 minutos foi desenhado tendo apenas um fator fixo CPF, já para os tempos a partir de 1 hora, o modelo foi desenhado tendo três fatores fixos CPF, ATR e 2-PAM com dois níveis cada (sim e não). Sujeitos (Rato ID) como fator aleatório e com estrutura de covariância “simetria composta”. Cada instante do tempo foi analisado de forma individual não levando em conta o efeito do tempo no modelo. Na análise, a categoria de referência utilizada foi “ausente” e o nível “não” dentro dos fatores. A simetria composta foi escolhida como estrutura de covariância para o fator aleatório por ser uma estrutura mais simples de estimativa dos parâmetros, porém não tão simples quanto a “componente de variância”. Como os animais que não manifestaram toxicidade frente ao tratamento com CPF foram excluídos, esperávamos que os sujeitos (ratos) se comportassem de forma simétrica frente aos tratamentos, justificando então a escolha dessa matriz de covariância.

3.8.6. Análise dos valores das pressões arteriais médias e frequências cardíacas basais.

Para análise das pressões arteriais médias e frequências cardíacas basais foi utilizado um modelo linear geral (GLM). O modelo foi desenhado utilizando três fatores fixos CPF, ATR e 2-PAM com dois níveis cada (sim e não) e o cruzamento de seus níveis. O GLM foi comparado com um modelo linear misto adicionando o sujeito (rato) como fator aleatório e com um modelo linear generalizado (GLZM) de distribuições de probabilidade gama e *tweedie*. Em ambos os casos não houve melhora de informação no modelo, sendo todos equivalentes em resultado e com valores de AIC semelhantes. Por esse motivo foi optado pela execução de um GLM simples, pois esse exige um menor custo computacional para o cálculo.

3.8.7. Análise das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo *in vivo*

Para a análise das respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo, foi utilizado um modelo linear misto. Os modelos foram desenhados de forma semelhante ao *in vitro*, porém com quatro fatores fixos. O KCN foi considerado um fator categórico ordinal com quatro níveis (10, 20, 40 e 80 μg), funcionando como um fator de bloqueio pareado para diminuir a variabilidade das respostas da nossa variável dependente. Os demais fatores fixos foram os tratamentos com CPF, ATR e 2-PAM dois níveis (sim e não) sendo “sim” o animal que recebeu o tratamento e “não” o animal controle. Além disso, o sujeito “Rato ID” foi considerado um fator aleatório. Além dos efeitos principais, os fatores fixos foram cruzados através da análise da interação de quatro vias para a resposta pressora; para a resposta bradicárdica. Como esta última apresentou efeito da interação decidiu-se proceder também a análise fatorial completa. O fator aleatório “Rato ID” foi aninhado dentro dos fatores CPF, ATR e 2-PAM. A análise de post hoc foi executada segundo ajuste de Bonferroni. Para a análise de resíduos da resposta pressora não foi observada normalidade dos mesmos pelo gráfico de QQ-Plot. Mesmo fazendo a análise por um modelo com distribuição de probabilidade gama ou *tweedie* não foi observada normalidade dos resíduos, por isso o modelo foi executado com a aproximação de Satterhwaite e os testes de efeitos, juntamente dos coeficientes fixos, foram realizados através de estimação robusta (covariância robusta). A matriz de covariância adotada para os fatores aleatórios foi a “simetria composta” a partir dos critérios de informações de Akaike (AIC), sendo escolhida a matriz que apresentasse o menor valor de AIC.

3.8.8. Análise do volume corrente (V_T), volume minuto (V_E) e frequência respiratória basal (fR) no modelo *in vivo*

Para a análise das respostas respiratórias basais foram utilizados modelo misto generalizados para análise de V_T e V_E . Para a fR basal foi utilizado as equações de estimatórias generalizadas (GEE) para análise longitudinal dos dados durante os 20 segundos anteriores à administração de KCN (dose de 10 μg). Os modelos mistos foram desenhados de forma semelhante aos previamente citados, porém com três

fatores fixos: CPF, ATR e 2-PAM dois níveis (sim e não). O sujeito "Rato ID" foi considerado um fator aleatório. Além dos efeitos principais, os fatores fixos foram cruzados através da análise da interação fatorial completa. O fator aleatório "Rato ID" foi aninhado dentro dos fatores CPF, ATR e 2-PAM. A análise de post hoc foi executada segundo ajuste de Bonferroni sequencial. As variáveis dependentes V_T e V_E apresentaram um ajuste melhor ao modelo com distribuição de probabilidade gama e função de ligação log segundo o AIC, por isso se executou um modelo generalizado. A matriz de covariância adotada para os fatores aleatórios foi a "simetria composta" a partir dos critérios de informações de Akaike (AIC). Para a análise de resíduos de V_T não foi observada normalidade dos mesmos pelo gráfico de QQ-Plot. O modelo linear generalizado foi escolhido para frequência respiratória pelo critério do AIC, pois a adição dos sujeitos como fatores aleatórios não acrescentou informação ao modelo, o gasto de cálculo computacional foi menor e o ajuste do modelo foi melhor quando comparado a outros.

O modelo das equações de estimações generalizadas (GEE) foi escolhido para análise longitudinal dos dados de frequência respiratória. O GEE foi desenhado com quatro fatores fixos: CPF, ATR e 2-PAM com dois níveis cada e o tempo com dez níveis. Os cruzamentos entre os níveis dos efeitos foram realizados através da análise de interação, porém apenas as interações que agregam informações foram mantidas no modelo devido ao gasto computacional e a não convergência da análise. A matriz de correlação de trabalho da medida repetida foi a "não estruturada" (*unstructured*) e a distribuição de probabilidade tipo gama com função de ligação *log*, ambos foram baseados no critério de quase verossimilhança sob o modelo de independência (QIC), que mede o ajuste do modelo. Foi utilizado o estimador robusto para matriz de covariância.

3.8.9. Análise da resposta taquipneica do quimiorreflexo

A resposta taquipneica do quimiorreflexo foi avaliada ao longo dos 40 segundos de registro da frequência respiratória através do modelo de estimações generalizadas (GEE). O GEE foi desenhado com cinco fatores fixos: CPF, ATR e 2-PAM com dois níveis cada, KCN como fator ordinal com quatro níveis (10, 20, 40 e 80 μg) e o

tempo com dez níveis. Os cruzamentos entre os níveis dos efeitos foram realizados através da análise de interação, porém apenas as interações que agregam informações foram mantidas no modelo devido ao gasto computacional e a não convergência da análise. A matriz de correlação de trabalho da medida repetida foi a “independente” e a distribuição de probabilidade tipo gama com função de ligação *log*, ambos foram baseados no critério de quase verossimilhança sob o modelo de independência (QIC), que mede o ajuste do modelo. Foi utilizado o estimador robusto para matriz de covariância.

3.8.11. Análise das atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) do modelo *in vivo*

A atividade da BuChE como foi medida antes e depois dos tratamentos, então foi analisada através do modelo de estimações generalizadas (GEE). O GEE foi desenhado com quatro fatores fixos: CPF, ATR e 2-PAM e o tempo com dois níveis (antes e depois). Os cruzamentos entre os níveis dos efeitos foram realizados através da análise de interação fatorial completa. A matriz de correlação de trabalho da medida repetida foi a “não estruturada” (*unstructured*) e a distribuição de probabilidade tipo gama com função de ligação *log*, ambos foram baseados no critério de quase verossimilhança sob o modelo de independência (QIC), que mede o ajuste do modelo. Foi utilizado o estimador robusto para matriz de covariância.

A atividade da AChE não apresentou distribuição normal nem para variável dependente nem para os resíduos do modelo linear. Portanto, para a análise desse parâmetro, foi executado um modelo misto generalizado (GLMM), sendo a distribuição de probabilidade gama e a função de ligação *log* definidos através do valor de AIC. O modelo foi desenhado com três fatores fixos CPF, ATR e 2-PAM com dois níveis cada (sim e não) e o sujeito (Rato ID) como fator aleatório. Além dos efeitos principais, os fatores fixos foram cruzados através da análise da interação fatorial completa. O fator aleatório “Rato ID” foi aninhado dentro dos fatores CPF, ATR e 2-PAM. A análise de post hoc foi executada segundo ajuste de Bonferroni. Para a análise de resíduos da atividade de AChE foi observada normalidade pelo gráfico de QQ-Plot. A matriz de covariância adotada para o fator aleatório foi a

“simetria composta” a partir dos critérios de informações de Akaike (AIC), sendo escolhida a matriz que apresentasse o menor valor de AIC.

3.8.12. Análise das atividades da acetilcolinesterase nos *punchs* de cortes do tronco encefálico contendo núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.

A atividade da AChE não apresentou distribuição normal nem para variável dependente nem para os resíduos do modelo linear. Portanto, para a análise desse parâmetro, foi executado um modelo misto generalizado (GLMM), sendo a distribuição de probabilidade gama e a função de ligação *log* definidos através do valor de AIC. O modelo foi desenhado com três fatores fixos CPF e 2-PAM com dois níveis cada (sim e não), núcleos com três níveis (ambíguo, RVLM/preBötC e NTS). Além disso, o sujeito (Rato ID) foi utilizado como fator aleatório. Além dos efeitos principais, os fatores fixos foram cruzados através da análise da interação fatorial completa e o 2-PAM foi aninhado dentro de CPF. O fator aleatório “Rato ID” foi aninhado dentro dos fatores CPF e 2-PAM. A matriz de covariância adotada para o fator aleatório foi a “simetria composta” a partir dos critérios de informações de Akaike (AIC), sendo escolhida a matriz que apresentasse o menor valor de AIC. Para a análise de resíduos não foi observada normalidade dos mesmos pelo gráfico de QQ-Plot, por isso o modelo foi executado com a aproximação de Satterhwaite e os testes de efeitos, juntamente, dos coeficientes fixos foram realizados através de estimação robusta da matriz de covariância.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. PREPARAÇÃO TRONCO CEREBRAL-CORAÇÃO ISOLADO (WHBP)

4.1.1. Atividade basal do nervo frênico (PNA)

Conforme mencionado nos métodos, os parâmetros oriundos da análise da descarga basal do nervo frênico foram: frequência de disparo (f-PNA), tempo da inspiração (TI), tempo da expiração (TE), tempo do ciclo respiratório total (Ttot), amplitude do pico inspiratório (P-AMP), tempo para o pico inspiratório (T-P), área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e a área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI). Dentre os parâmetros analisados, diferenças estatisticamente significantes entre animais intoxicados com CPF e controle só foram observadas para os parâmetros área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI). Os valores da análise dos testes estatísticos são mostrados na tabela 3 e os dados dos parâmetros são apresentados na figura 30.

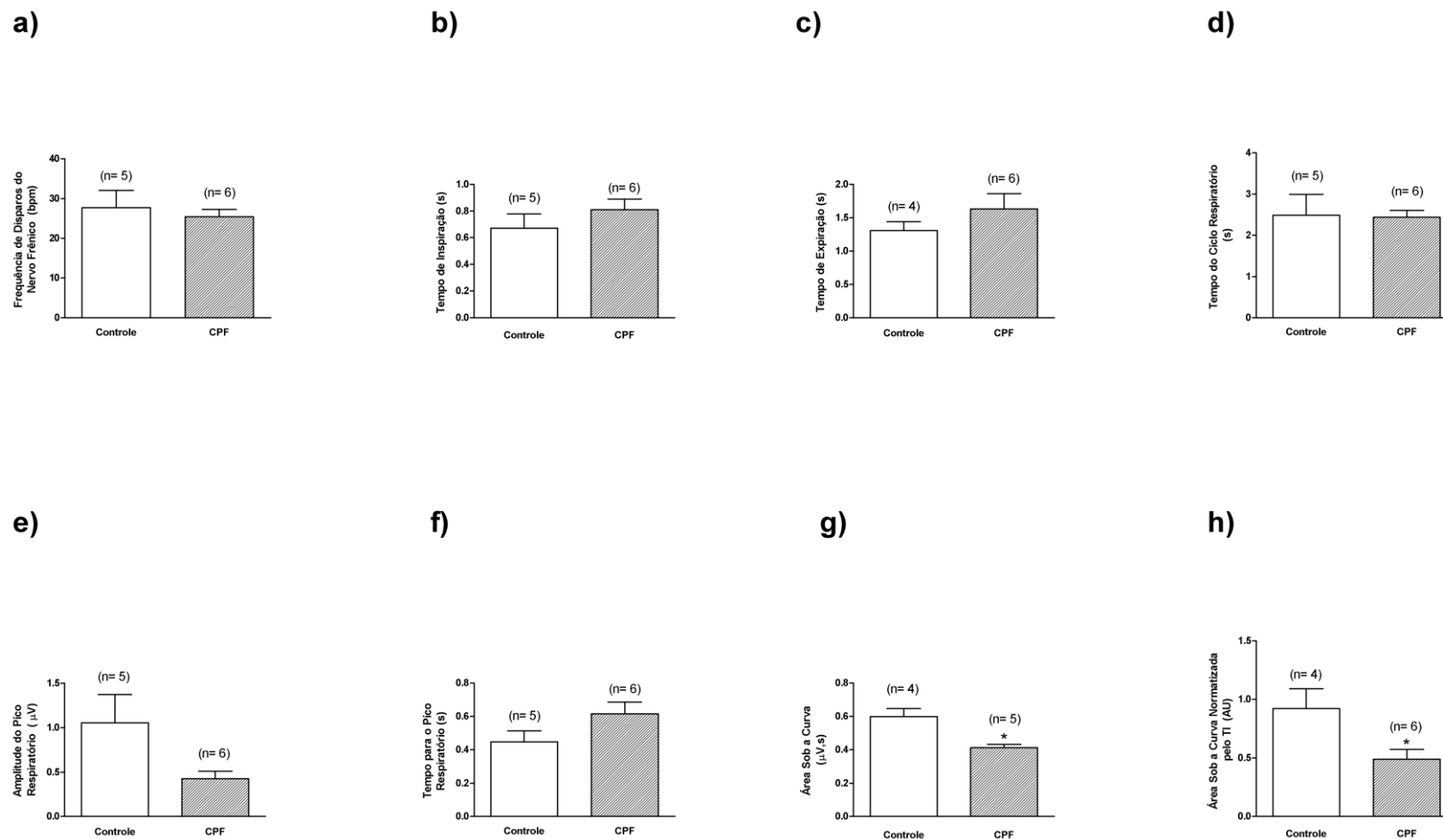


Figura 30: Parâmetros derivados da atividade basal do nervo frênico. a) frequência de disparo (f-PNA), b) tempo de inspiração (TI), c) tempo de expiração (TE), d) tempo do ciclo respiratório total (Ttot), e) amplitude do pico inspiratório (P-AMP), f) tempo para o pico inspiratório (T-P), g) área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e h) área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI). * $P < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle.

Tabela 3: Resultados da análise estatística dos parâmetros derivados da atividade basal do nervo frênico (PNA).

Parâmetros	t	gl	P
f-PNA	0,514	9	0,62
TI	-1,502	9	0,32
TE	-1,034	8	0,33
Ttot	0,088	9	0,93
P-AMP	2,082	9	0,067
T-P	-1,748	9	0,11
P-AUC	3,900	7	0,023 *
AUC:TI	2,546	8	0,034 *

Frequência de disparo (f-PNA), tempo da inspiração (TI), tempo da expiração (TE), tempo do ciclo respiratório total (Ttot), amplitude do pico inspiratório (P-AMP), tempo para o pico inspiratório (T-P), área sob a curva do pico inspiratório (P-AUC) e a área sob a curva normalizada pelo tempo inspiratório (AUC:TI). Teste *t*-Student não pareado. * $P < 0,05$.

4.1.2. Atividade basal do nervo laríngeo recorrente (RLN)

Conforme mencionado nos métodos, os parâmetros derivados da análise da atividade basal do nervo laríngeo recorrente foram: área sob a curva na inspiração (AUC-I), área sob a curva na inspiração normalizada pelo TI (AUC-I:TI), área sob a curva do P-I do RLN (AUC-PI), área sob a curva do P-I normalizada pelo tempo de E1 (AUC-PI:E1), duração do P-I (Dur-PI), relação da duração do P-I pelo TE (Dur-PI:TE) e o pico do P-I. Dentre os parâmetros analisados, a intoxicação com CPF promoveu uma redução da área sob a curva durante o P-I de descarga do RLN (AUC-PI) quando comparado aos animais controle (Figuras 31 e 32). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para os demais parâmetros analisados quando comparados animais controle e intoxicados. Os valores da análise dos testes estatísticos são mostrados na tabela 4.

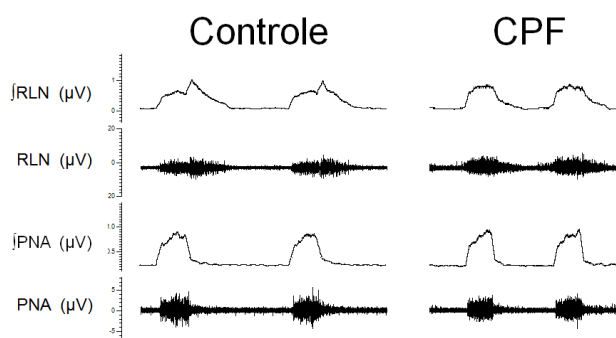


Figura 31: Traçado típico de animais dos grupos controle e intoxicado (CPF) mostrando os disparos dos nervos laríngeo recorrente (RLN) e frênico (PNA). Note o prejuízo observado no post-I do RLN. $\bar{J}$ RLN- Nervos laríngeo recorrentes integrados e $\bar{J}$ PNA – Atividade do nervo frênico integrado.

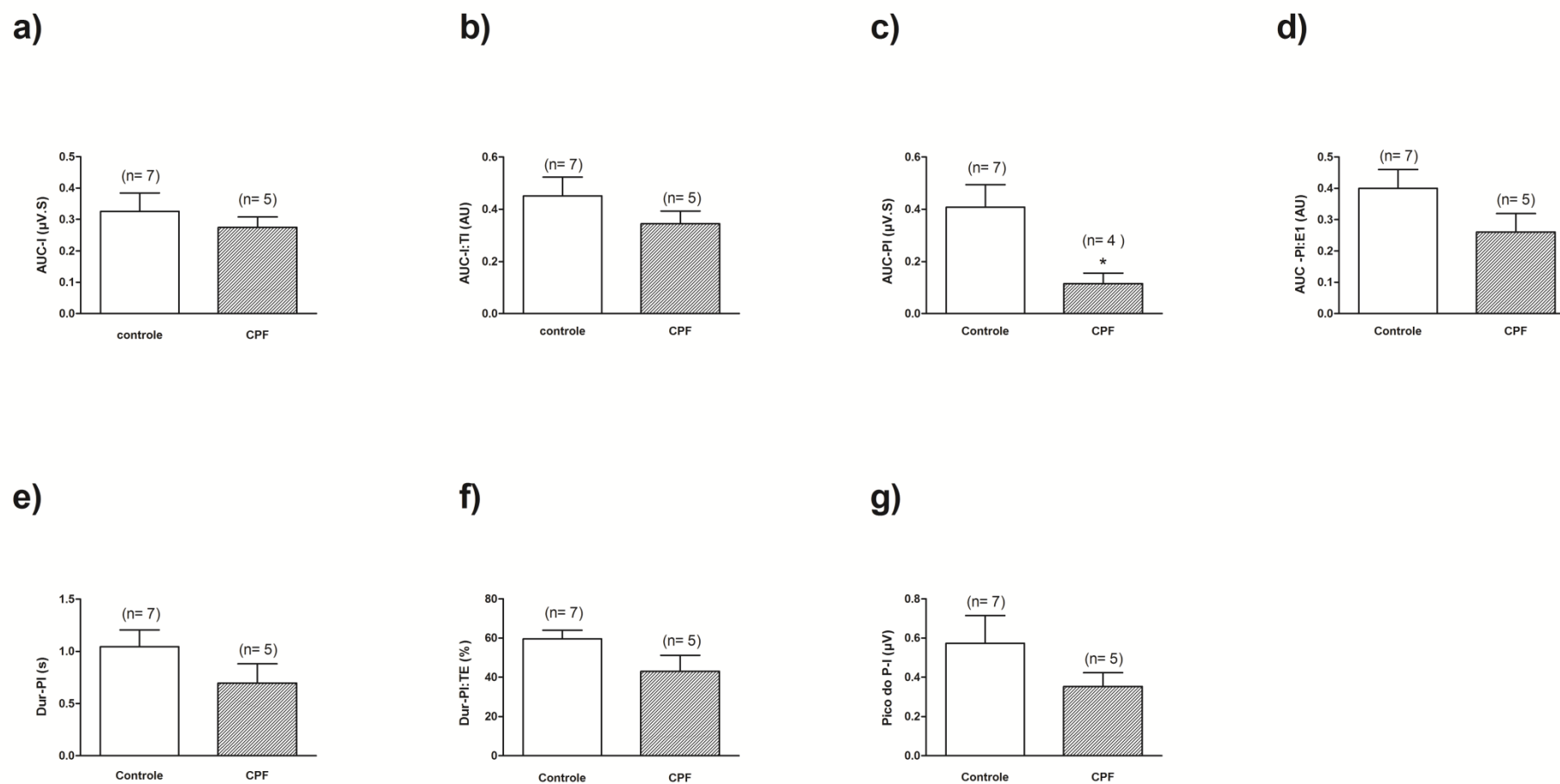


Figura 32: Parâmetros derivados da atividade basal do nervo laríngeo recorrente. a) Área sob a curva na inspiração (AUC-I), b) Área sob a curva na inspiração normalizada pelo TI (AUC-I:TI), c) área sob a curva no P-I do RLN (AUC-PI), d) Área sob a curva no P-I normalizada pelo tempo de E1 (AUC-PI:E1), e) Duração do P-I (Dur-PI), f) Relação da duração do P-I pelo TE (Dur-PI:TE) g) Pico do P-I.

Tabela 4: Resultados da análise estatística para os parâmetros derivados da análise da atividade basal do nervo laríngeo recorrente (RLN).

Parâmetros	t	gl	P
AUC-I	0,689	10	0,506
AUC-I:TI	1,120	10	0,289
AUC-PI	2,457	9	0,036 *
AUC-PI:E1	1,619	10	0,136
Dur-PI	1,423	10	0,185
Dur-PI:TE	1,957	10	0,079
Pico do P-I	1,405	10	0,195

Área sob a curva na inspiração (AUC-I), área sob a curva na inspiração normalizada pelo TI (AUC-I:TI), área sob a curva no P-I do RLN (AUC-PI), área sob a curva no P-I normalizada pelo tempo de E1 (AUC-PI:E1), Duração do P-I (Dur-PI), relação da duração do P-I pelo TE (Dur-PI:TE) e pico do P-I. Teste *t*-Student não pareado. * $P < 0,05$.

4.1.3. Acoplamento simpato-respiratório

Conforme descrito, o acoplamento simpato-respiratório foi derivado da análise conjunta da atividade do nervo frênico e do nervo simpático respiratório por script próprio. A figura 33 ilustra o canal obtido pela análise integrada do acoplamento. Os parâmetros derivados dessa análise foram: pico da atividade simpática na fase inspiratória (Pico-I), pico da atividade simpática na fase E1 (Pico-E1), pico da atividade simpática na fase E2 (Pico-E2), média da atividade simpática na fase inspiratória (I-trough), média da atividade simpática na fase E1 (E1-trough), média da atividade simpática na fase E2 (E2-trough), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória (I-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória normalizada pelo TI (I-AUC:TI), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 (E1-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 normalizada pelo tempo de E1, área sob a curva da atividade simpática na fase E2 (E2-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E2 normalizada pelo tempo de E2 (E2-AUC:E2). A análise estatística não identificou diferença em nenhum dos parâmetros analisados entre animais controle e intoxicados com CPF. Os parâmetros do acoplamento simpato-respiratório junto com os valores dos dados estatísticos são apresentados na tabela 5.

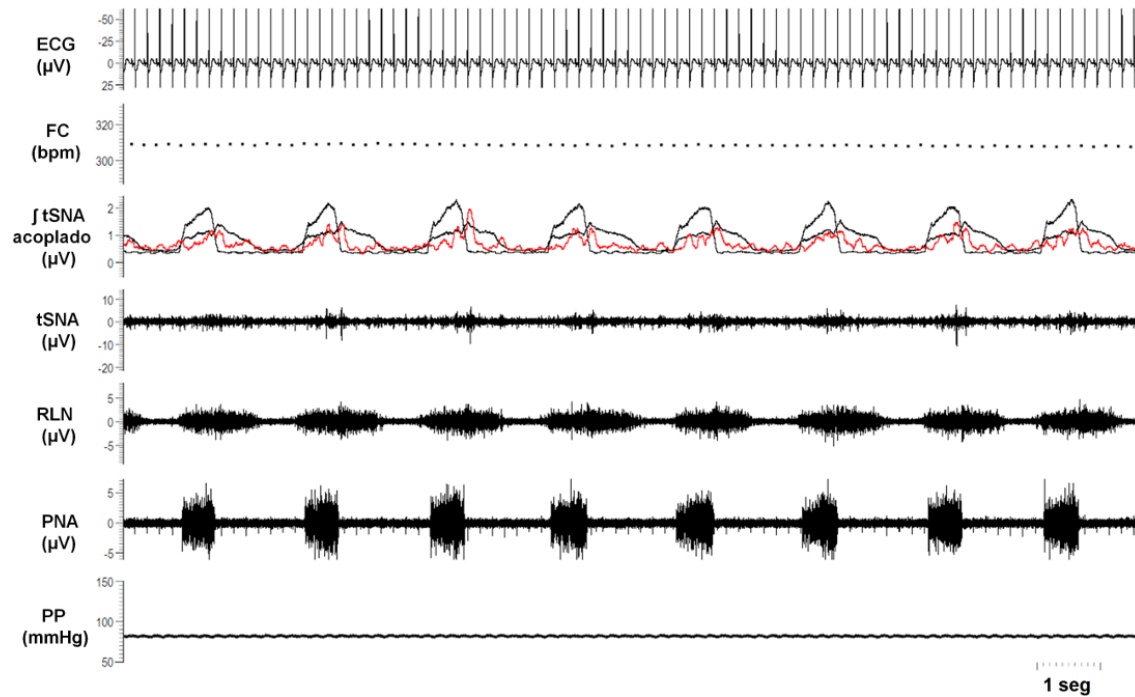


Figura 33: Registro típico de um animal mostrando as atividades basais dos nervos, frênico (PNA), laríngeo recorrente (RLN) e simpático torácico (tSNA), bem como a análise integrada do acoplamento simpato-respiratório no canal “f tSNA acoplado”. Demais canais referem-se ao eletrocardiograma (ECG), frequência cardíaca (FC) derivada do ECG e pressão de perfusão (PP).

Tabela 5: Resultados dos parâmetros basais do acoplamento simpato-respiratório.

	Controle (n=5)	CPF (n=6)	t	gl	P
Pico-I (µV)	1,257 ± 0,55	1,196 ± 0,43	0,147	9	0,887
Pico-E1 (µV)	1,388 ± 0,66	1,183 ± 0,45	0,394	9	0,703
Pico-E2 (µV)	1,034 ± 0,42	0,998 ± 0,43	0,059	9	0,954
I-Trough (µV)	0,321 ± 0,12	0,476 ± 0,26	0,115	9	0,634
E1 -trough (µV)	0,306 ± 0,13	0,471 ± 0,26	-0,531	9	0,608
E2 -Trough (µV)	0,329 ± 0,13	0,473 ± 0,26	-0,462	9	0,655
I-AUC (µV.S)	0,607 ± 0,17	1,021 ± 0,27	-1,231	9	0,250
I-AUC:Ti (AU)	0,955 ± 0,31	1,227 ± 0,35	-0,564	9	0,587
E1-AUC (µV.S)	0,905 ± 0,21	1,211 ± 0,47	-0,281	9	0,785
E1-AUC:E1 (AU)	0,927 ± 0,33	1,207 ± 0,36	-0,562	9	0,588
E2-AUC (µV.S)	0,436 ± 0,09	0,584 ± 0,23	-0,239	9	0,816
E2-AUC:E2 (AU)	0,878 ± 0,26	1,167 ± 0,35	-0,628	9	0,546

Pico da atividade simpática na fase inspiratória (Pico-I), pico da atividade simpática na fase E1 (Pico-E1), pico da atividade simpática na fase E2 (Pico-E2), média da atividade simpática na fase inspiratória (I-trough), média da atividade simpática na fase E1 (E1-trough), média da atividade simpática na fase E2 (E2-trough), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória (I-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase inspiratória normalizada pelo TI (I-AUC:TI), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 (E1-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E1 normalizada pelo tempo de E1, área sob a curva da atividade simpática na fase E2 (E2-AUC), área sob a curva da atividade simpática na fase E2 normalizada pelo tempo de E2 (E2-AUC:E2). Teste *t-Student* não pareado.

4.1.3. Quimiorreflexo na WHBP

Um traçado típico ilustrando a resposta obtida frente à ativação do quimiorreflexo em animais controle e intoxicados na WHBP pode ser visto na figura 34. A intoxicação com CPF promoveu um prejuízo das respostas pressora, bradicárdica e da simpatoexcitação do quimiorreflexo quando comparado com animais controle (Figura 34 e 35; Tabela 6). A análise estatística somente identificou interação entre os fatores dose e tratamento para a simpatoexcitação induzida pelo quimiorreflexo. A análise post hoc de Bonferroni desse parâmetro mostrou diferença estatisticamente significativa somente na dose de 50 μL , sem diferença nas demais doses (KCN 50 μL , $P=0,005$; KCN 75, $P=0,179$ e KCN 100 μL $P=0,06$).

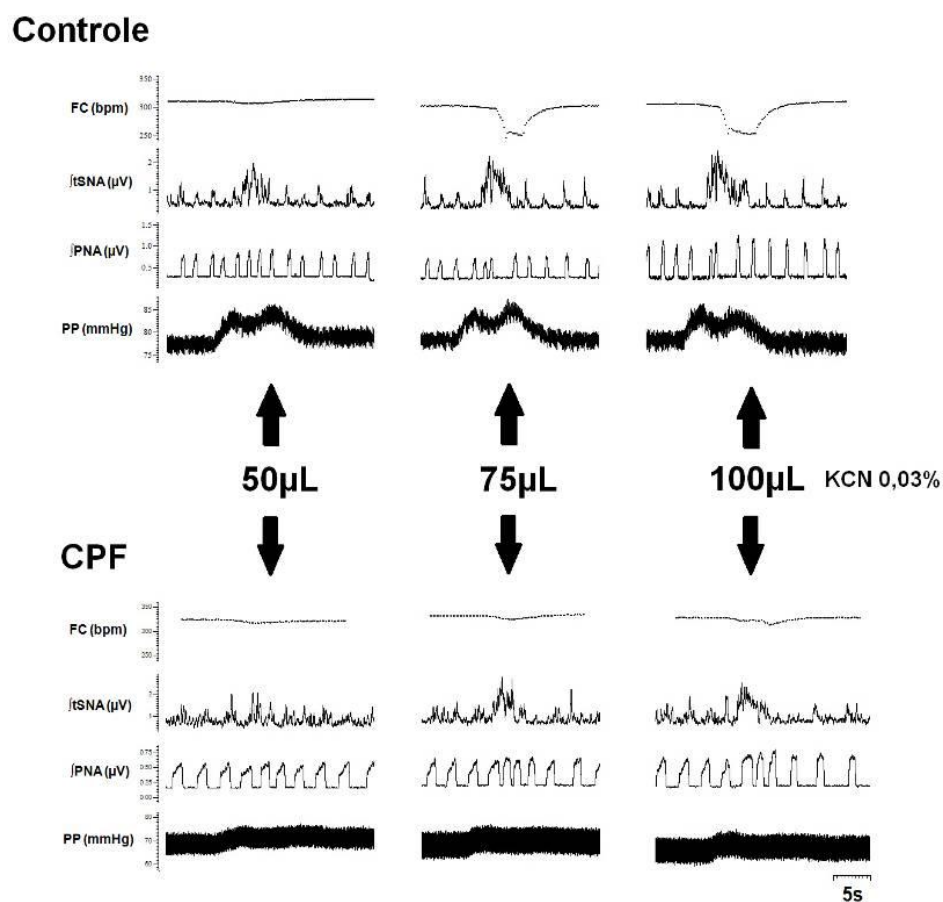


Figura 34: Traçado típico de animais controle e intoxicados (CPF) mostrando as respostas do quimiorreflexo frente a estimulação com cianeto de potássio (KCN – 0,03%; 50, 75 e 100 μL) na preparação tronco cerebral-corção isolado (WHBP). Nervo frênico (pNA), simpático torácico (tSNA), pressão de perfusão (PP) e frequência cardíaca (FC).

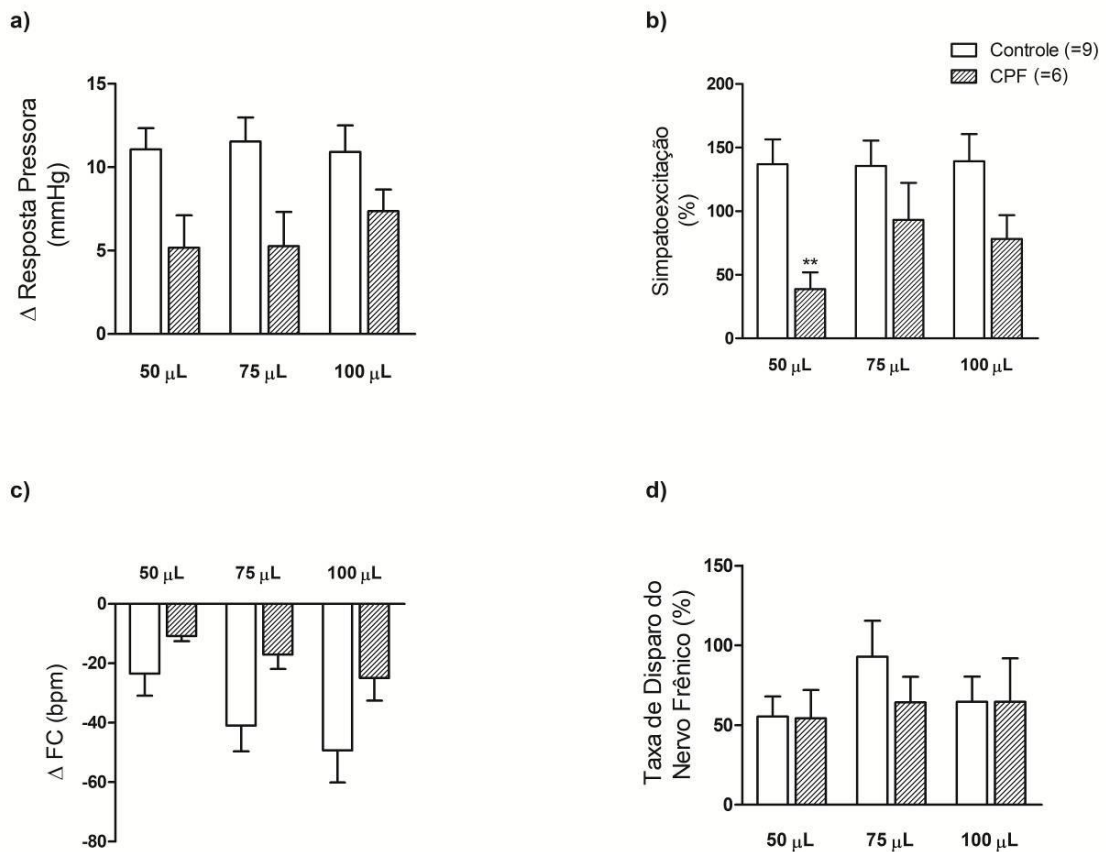


Figura 35: Respostas do quimiorreflexo frente estimulação com KCN (50 µL, 75 µL, 100 µL). a) Variação da pressão de perfusão (Δ Resposta Pressora), b) Atividade simpática expressa em percentual de ativação (Simpatoexcitação %), c) Variação de frequência cardíaca (Δ FC) e d) Frequência respiratória derivada da taxa de disparo do nervo frênico (Taxa de Disparo do Nervo Frênico %). Análise através de modelo linear misto ou modelo generalizado misto (GLMM). ** $P < 0,01$ indica diferença estatisticamente significativa entre CPF e controle, indicado pela análise Post hoc de Bonferroni para interação entre os fatores dose e tratamento.

Tabela 6: Resultados da análise estatística dos efeitos fixos para as variáveis medidas frente ativação do quimiorreflexo.

Variáveis	CPF	KCN	CPF x KCN
Δ Resposta pressora	$Z_{(1, 13)} = 5,863$; $P = 0,031$ *	$Z_{(2, 26)} = 1,288$; $P = 0,293$	$Z_{(2, 26)} = 2,523$; $P = 0,10$
Simpatoexcitação	$Z_{(1, 13)} = 5,732$; $P = 0,032$ *	$Z_{(2, 26)} = 3,939$; $P = 0,032$ *	$Z_{(2, 26)} = 5,863$; $P = 0,029$ *
Resposta bradicárdica	$Z_{(1, 18)} = 4,624$; $P = 0,042$ *	$Z_{(2, 40)} = 10,946$; $P = 0,0001$ **	$Z_{(2, 40)} = 1,185$; $P = 0,316$
% taxa de disparo do PNA	$F_{(1, 38)} = 0,000$; $P = 0,986$	$F_{(2, 38)} = 2,878$; $P = 0,069$	$F_{(2, 38)} = 0,758$; $P = 0,164$

PNA, atividade do nervo frênico; CPF, clorpirifós. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.4. Barorreflexo na WHBP

Os animais intoxicados com CPF apresentaram uma menor inibição da atividade simpática em comparação com os animais controle (Figura 36). Uma tendência a um prejuízo do ganho simpático e da resposta bradicárdica também pode ser observado nos animais intoxicados. Os resultados da análise estatística são mostrados na tabela 7.

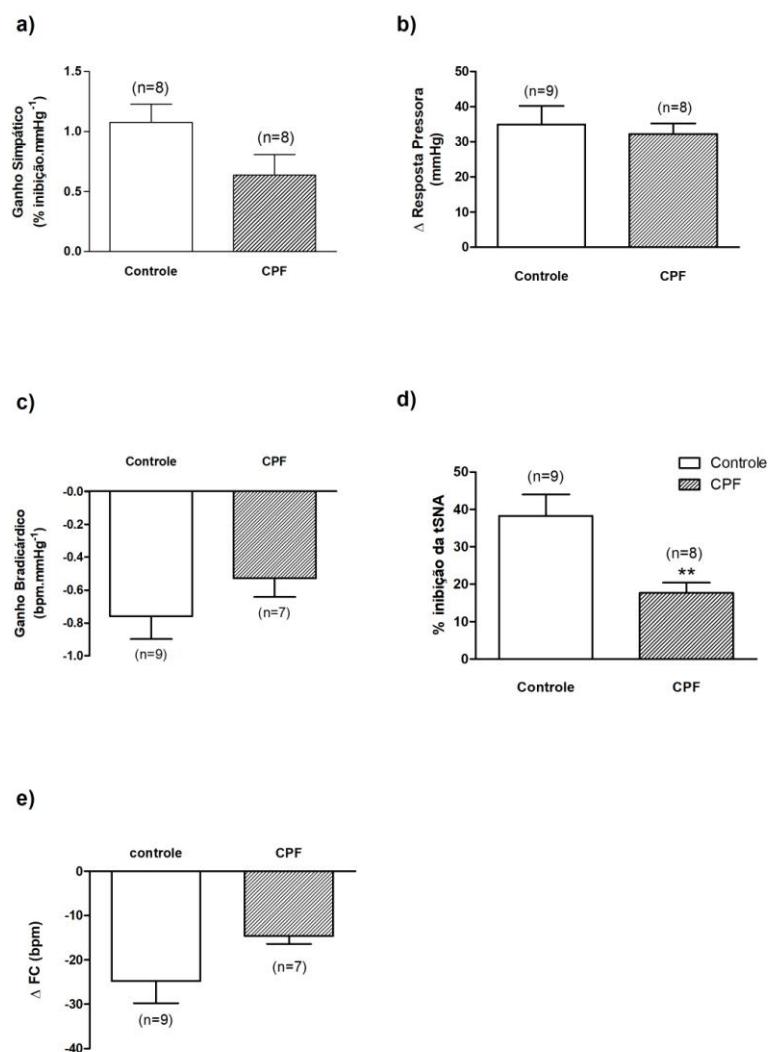


Figura 36: Respostas induzidas pela ativação do barorreflexo com injeções *in bolus* de fenilefrina (30 µg) em animais controle e intoxicados (CPF). a) Ganho simpático (% inibição/mmHg), b) Variação da Pressão de Perfusão (Δ Resposta Pressora, em mmHg), c) Ganho bradicárdico (bpm/mmHg) d) Percentual de inibição da resposta simpática (% inibição tSNA), e e) Variação de Frequência Cardíaca (ΔFC). Análise realizada através de teste *t*-Student não pareado. **P<0,01; CPF VS Controle.

Tabela 7: Resultados da análise estatística para o barorreflexo.

Parâmetros	t	gl	P
Ganho simpático	1,912	14	0,077
Δ Resposta Pressora	0,424	15	0,677
% de inibição da tSNA	3,117	15	0,007 **
Ganho Bradicárdico	-1,244	14	0,234
Δ FC	-1,923	14	0,083

Teste *t*-Student não pareado. ** $P < 0,01$.

4.1.5. Modulação simpática e parassimpática na WHBP

A vagotomia bilateral promoveu um aumento da frequência cardíaca basal de maior magnitude em animais intoxicados quando comparado a animais controle (Figura 37). A análise estatística não identificou diferença significativa no percentual de inibição da atividade simpática e na queda da frequência cardíaca basal induzida pelo bloqueio com atenolol entre animais controle e intoxicados, apesar de uma tendência poder ser observada (Figura 38). O bloqueio com hexametônio promoveu um aumento na pressão de perfusão de animais intoxicados quando comparado a animais controle. Em contrapartida, nenhuma alteração entre as respostas de frequência cardíaca e de inibição da atividade simpática foram observadas entre animais controle e intoxicados após o bloqueio com hexametônio. (Figura 39) Os resultados da análise estatística são mostrados na tabela 8.

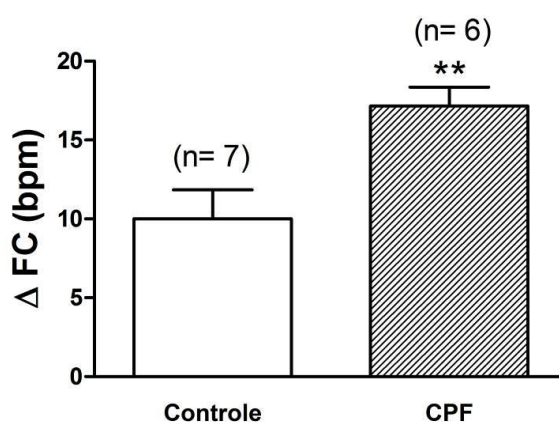


Figura 37: Variação de frequência cardíaca (Δ FC) em animais controle e intoxicados (CPF) após secção bilateral dos nervos vagos. Teste *t*-Student ** $P < 0,01$ indica diferença entre o grupo CPF e controle.

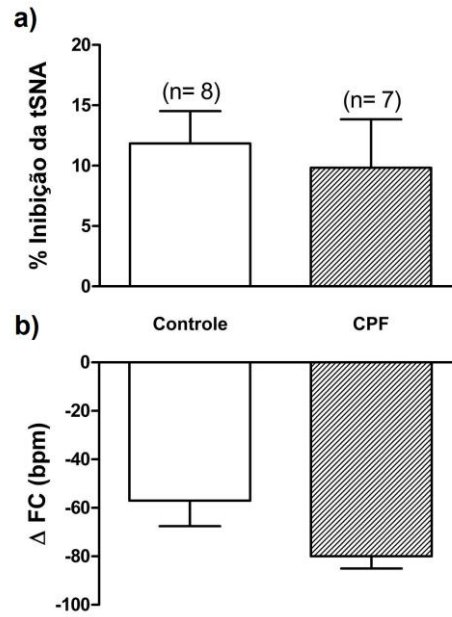


Figura 38: Efeitos do bloqueio com atenolol sobre a atividade simpática (% inibição da tSNA) (Painel A) e sobre a frequência cardíaca (Δ FC) (Painel B) em animais controle e intoxicados (CPF). Teste *t*-Student.

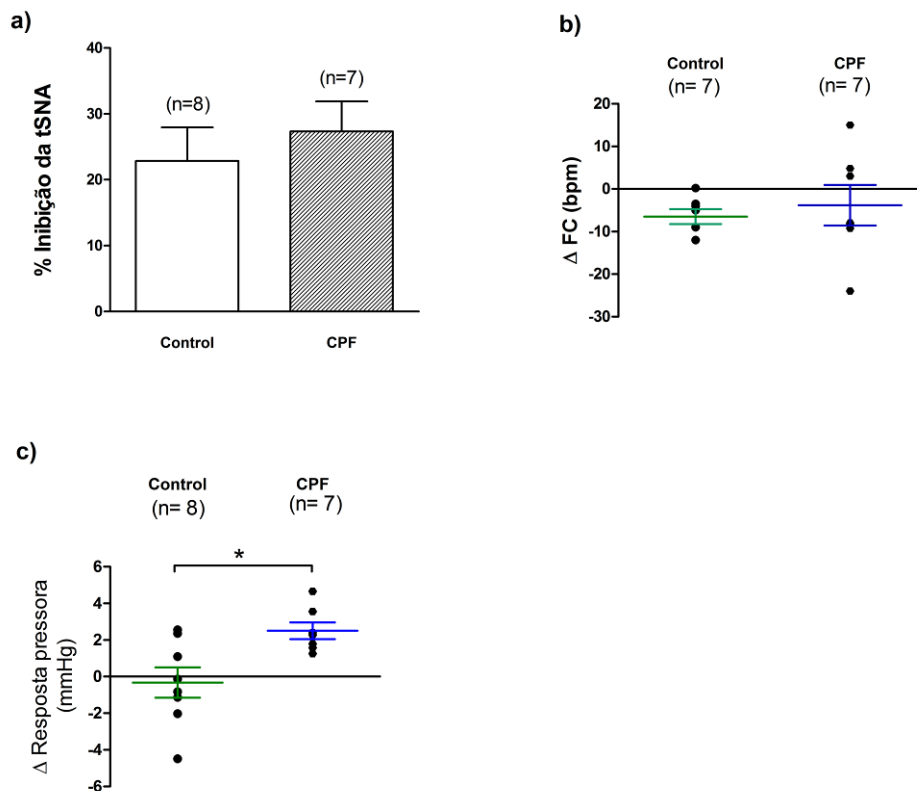


Figura 39: Efeitos do bloqueio com hexametônio sobre a atividade simpática (% inibição tSNA) (Painel A), frequência cardíaca (Δ FC) (Painel B) e pressão de perfusão (PP) (Painel C) em animais controle e intoxicados (CPF). Teste *t*-Student, * $P < 0,05$ CPF vs Controle.

Tabela 8: Resultados da análise estatística para os bloqueios com atenolol e hexametônio e para a vagotomia bilateral.

Parâmetros	t	gl	P
Δ FC - Vagotomia	-3,268	10	0,008 **
Δ FC – Atenolol	1,867	13	0,085
% Inibição da tSNA -Atenolol	0,429	13	0,675
% Inibição da tSNA - Hexametônio	-0,646	13	0,529
Resposta Pressora - Hexametônio	-2,864	13	0,013 *
Δ FC – Hexametônio	-0,522	8	0,616

Teste *t*-Student não pareado CPF vs Controle; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.2. MODELO ANIMAL *IN VIVO*

4.2.1. Avaliação da toxicidade aguda

A figura 40 mostra o curso temporal das manifestações de toxicidade aguda para as diferentes combinações de tratamento com CPF, ATR e 2-PAM. Todos os sinais de intoxicação analisados já estavam presentes 30 minutos após a intoxicação com CPF. Para o parâmetro ataxia, os tratamentos com atropina e pralidoxima somente promoveram atenuação desta manifestação a partir do tempo de 2h (Vide Tabela 9 para análise estatística e Tabela 10 para os parâmetros estimados). Para o parâmetro tremor, os tratamentos já se mostraram efetivos em atenuar/abolir os efeitos a partir do tempo de 1 hora e 40 minutos (Tabela 11 - análise estatística e Tabela 12 - parâmetros estimados). Já para a manifestação sialorreia, o tratamento com atropina se mostrou efetivo em abolir a manifestação já a partir do tempo de 1 hora e 20 minutos, enquanto a pralidoxima só promoveu uma atenuação da resposta ao longo do tempo (Tabela 13 - análise estatística e Tabela 14 - parâmetros estimados).

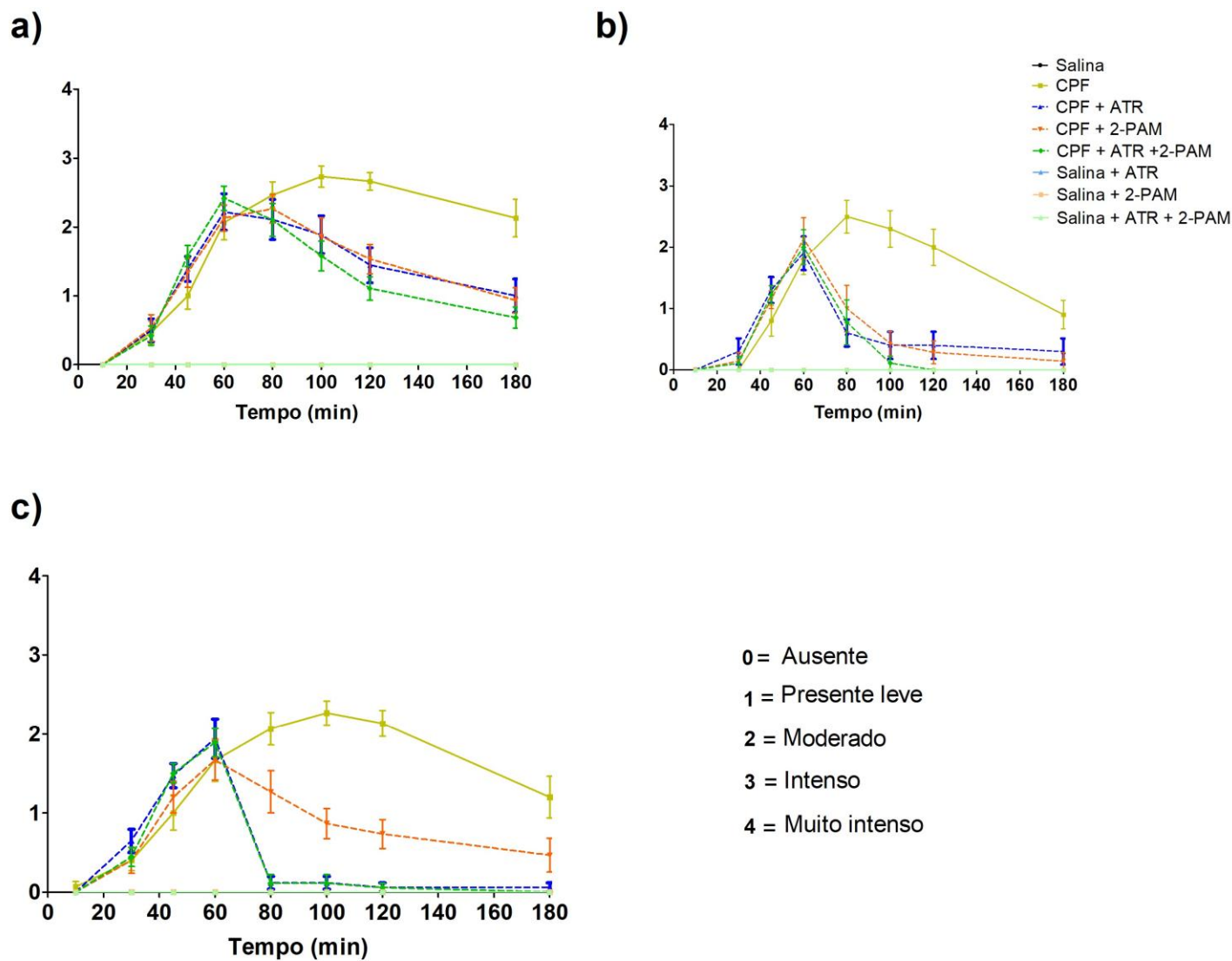


Figura 40: Curso temporal das manifestações de toxicidade aguda para as diferentes combinações de tratamento com clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). a) Ataxia. b) Tremor. c) Sialorreia.

Tabela 9: Resultados da análise estatística para ataxia nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação *logit* acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.

	10'				30'				45'				60'			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	-	-	-	-	15,903	1	129	0,0001**	43,582	1	128	0,0001**	18,017	3	125	0,0001**
CPF	-	-	-	-	15,903	1	129	0,0001**	43,582	1	128	0,0001**	53,654	1	125	0,0001**
ATR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,460	1	125	0,499
2-PAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,035	1	125	0,852

	1h 20'				1h 40'				2h				3h			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	17,300	3	125	0,0001**	16,113	3	125	0,0001**	16,504	3	126	0,0001**	12,214	3	125	0,0001**
CPF	51,867	1	125	0,0001**	48,156	1	125	0,0001**	48,447	1	126	0,0001**	35,765	1	125	0,0001**
ATR	0,214	1	125	0,644	1,878	1	125	0,173	6,249	1	126	0,014 *	3,194	1	125	0,076
2-PAM	0,063	1	125	0,803	1,666	1	125	0,199	5,726	1	126	0,018 *	1,973	1	125	0,163

*P<0,05 e **P<0,01. gl =graus de liberdade; CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.

Tabela 10.a: Parâmetros estimados para manifestação de ataxia pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.

	30'			45"			1h			1h 20'		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-3,237	0,0001**	0,039	-3,034	0,0001**	0,048	-3,164	0,0001**	0,042	-2,879	0,0001**	0,056
Moderado	-0,4731	0,0001**	0,009	-4,548	0,0001**	0,011	-4,039	0,0001**	0,018	-3,619	0,0001**	0,027
Intenso	-	-	-	-6,432	0,0001**	0,002	-5,605	0,0001**	0,004	-5,124	0,0001**	0,006
Muito intenso	-	-	-	-	-	-	-6,991	0,0001**	0,001	-6,471	0,0001**	0,002
CPF	-2,778	0,0001**	0,062	-4,369	0,0001**	0,013	-5,012	0,0001**	0,007	-4,925	0,0001**	0,007
ATR	-	-	-	-	-	-	-0,281	0,499	0,755	0,191	0,644	1,211
2-PAM	-	-	-	-	-	-	-0,077	0,852	0,926	0,103	0,803	1,108

	1h 40'			2h			3h		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-2,533	0,0001**	0,079	-2,219	0,001**	0,109	-2,413	0,0001**	0,09
Moderado	-3,279	0,0001**	0,038	-3,347	0,0001**	0,035	-3,731	0,0001**	0,024
Intenso	-4,609	0,0001**	0,010	-4,811	0,0001**	0,008	-4,693	0,0001**	0,009
Muito intenso	-6,189	0,0001**	0,002	-	-	-	-5,819	0,0001**	0,003
CPF	-4,662	0,0001**	0,009	-4,863	0,0001**	0,008	-3,849	0,0001**	0,021
ATR	0,572	0,173	1,771	1,092	0,014 *	2,981	0,756	0,076	2,129
2-PAM	0,535	0,199	1,708	1,037	0,018 *	2,820	0,588	0,163	1,801

**P<0,01. Categoria de referência: Ausente. OR= *odds ratio*. CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.

Tabela 11: Resultados da análise estatística para o tremor nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação *logit* acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.

	10'				30'				45'				60'			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	-	-	-	-	1,152	1	98	0,286	35,830	1	97	0,0001**	14,246	3	95	0,0001**
CPF	-	-	-	-	1,152	1	98	0,286	35,830	1	97	0,0001**	42,679	1	95	0,0001**
ATR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	1	95	0,989
2-PAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,266	1	95	0,607

	1h 20'				1h 40'				2h				3h			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	9,287	3	94	0,0001**	7,170	3	95	0,0001**	6,328	3	95	0,001**	4,269	3	96	0,007**
CPF	27,126	1	94	0,0001**	18,323	1	95	0,0001**	15,187	1	95	0,0001**	9,689	1	96	0,002**
ATR	3,533	1	94	0,063	5,738	1	95	0,019*	4,771	1	95	0,031 *	2,355	1	96	0,128
2-PAM	0,871	1	94	0,353	3,598	1	95	0,061	4,367	1	95	0,039 *	2,862	1	96	0,094

*P<0,05 e ** P<0,01. gl = graus de liberdade; CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; 2-PAM – Pralidoxima.

Tabela 12: Parâmetros estimados para manifestação de tremor pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.

	30'			45"			1h			1h 20'		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-7,340	0,135	0,001	-3,024	0,0001**	0,049	-3,229	0,0001**	0,040	-2,406	0,0001**	0,090
Moderado	-8,815	0,078	0,000	-5,093	0,0001**	0,006	-4,616	0,0001**	0,010	-3,284	0,0001**	0,037
Intenso	-	-	-	-6,199	0,0001**	0,002	-5,826	0,0001**	0,003	-3,978	0,0001**	0,019
Muito intenso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5,191	0,0001**	0,006
CPF	-5,260	0,286	0,005	-4,226	0,0001**	0,015	-5,086	0,0001**	0,006	-3,656	0,0001**	0,026
ATR	-	-	-	-	-	-	-0,007	0,989	0,993	1,063	0,063	2,896
2-PAM	-	-	-	-	-	-	-0,281	0,607	0,755	0,517	0,353	1,677

	1h 40'			2h			3h		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-2,108	0,0001**	0,121	-2,057	0,0001**	0,128	-2,319	0,001**	0,098
Moderado	-2,716	0,0001**	0,066	-2,602	0,00001**	0,074	-3,368	0,0001**	0,034
Intenso	-3,540	0,0001**	0,029	-3,638	0,0001**	0,026	-	-	-
Muito intenso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPF	-3,105	0,0001**	0,045	-2,807	0,0001**	0,060	-2,318	0,002**	0,098
ATR	1,541	0,019	4,668	1,443	0,031 *	4,235	1,063	0,128	2,894
2-PAM	1,228	0,061	3,414	1,446	0,039 *	4,245	1,260	0,094	3,526

**P<0,01. Categoria de referência: Ausente. OR= *odds ratio*. CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.

Tabela 13: Resultados da análise estatística para sialorreia nos diferentes tempos. Cada tempo foi analisado através de uma regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado com função de ligação *logit* acumulativo e matriz de covariância “simetria composta”.

	10'				30'				45'				60'			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	-	-	-	-	0,000	1	127	0,995	44,828	1	126	0,0001**	16,035	3	123	0,0001**
CPF	-	-	-	-	0,000	1	127	0,995	44,828	1	126	0,0001**	47,809	1	123	0,0001**
ATR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,366	1	123	0,546
2-PAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	1	123	0,982
	1h 20'				1h 40'				2h				3h			
	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P	F	gl 1	gl 2	P
Modelo corrigido	11,541	3	124	0,0001**	12,727	3	124	0,0001**	10,577	3	124	0,0001**	7,759	3	124	0,0001**
CPF	23,527	1	124	0,0001**	24,508	1	124	0,0001**	20,934	1	124	0,0001**	12,852	1	124	0,0001**
ATR	20,857	1	124	0,0001**	26,160	1	124	0,0001**	18,903	1	124	0,0001**	13,000	1	124	0,0001**
2-PAM	1,539	1	124	0,217	7,371	1	124	0,008**	3,391	1	124	0,068	4,058	1	124	0,046*

*P<0,05 e ** P<0,01. gl = graus de liberdade; CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.

Tabela 14: Parâmetros estimados para manifestação de sialorreia pela análise de regressão logística multinomial ordinal através de modelo misto generalizado.

	30'			45"			1h			1h 20'		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-20,248	0,995	0,000	-3,010	0,0001**	0,049	-3,093	0,0001**	0,045	-1,997	0,001**	0,136
Moderado	-23,501	0,994	0,000	-4,773	0,0001**	0,008	-4,313	0,0001**	0,013	-2,734	0,0001**	0,065
Intenso	-	-	-	-6,590	0,0001**	0,001	-5,510	0,0001**	0,004	-3,811	0,0001**	0,022
Muito intenso	-	-	-	-	-	-	-7,029	0,0001**	0,001	-	-	-
CPF	-20,033	0,995	0,000	-4,431	0,0001**	0,012	-4,558	0,0001**	0,010	-3,223	0,0001**	0,04
ATR	-	-	-	-	-	-	-0,251	0,546	0,778	2,637	0,0001**	13,970
2-PAM	-	-	-	-	-	-	0,009	0,982	1,009	0,614	0,217	1,847

	1h 40'			2h			3h		
	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR	β	<i>P</i>	OR
Leve	-2,678	0,003**	0,069	-1,858	0,002	0,156	-2,876	0,002**	0,056
Moderado	-3,772	0,0001**	0,023	-2,631	0,0001**	0,072	-4,262	0,0001**	0,014
Intenso	-5,732	0,0001**	0,003	-3,885	0,0001**	0,021	-5,026	0,0001**	0,007
Muito intenso	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPF	-4,942	0,0001**	0,007	-3,017	0,0001**	0,049	-3,517	0,0001**	0,030
ATR	3,754	0,0001**	42,688	2,595	0,0001**	13,399	2,974	0,0001**	19,576
2-PAM	1,671	0,008	5,320	0,949	0,068	2,583	1,287	0,046 *	3,623

**P<0,01. Categoria de referência: Ausente. OR= *odds ratio*. CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; -2-PAM – Pralidoxima.

4.2.2. Avaliação das pressões arteriais médias e frequências cardíacas basais.

Os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca basal são apresentados na tabela 15. Os resultados da análise de GLM são apresentados na tabela 16. A análise do post hoc da pressão arterial média mostrou diferença entre o grupo salina e os grupos CPF + ATR, CPF + 2-PAM e CPF + ATR + 2-PAM. Para a frequência cardíaca a análise post hoc mostrou diferença apenas entre o grupo CPF + ATR e Salina + ATR. A análise de GLM mostrou efeito na pressão arterial média basal para o tratamento com CPF e ATR, além de mostrar a interação entre os tratamentos com ATR e 2-PAM. Entretanto, o GLM não mostrou diferença para o tratamento com pralidoxima, nem para as demais interações ($P > 0,05$ – ver anexo 5). Para a análise da frequência cardíaca basal o GLM mostrou diferença para o tratamento com CPF e mostrou interação entre os tratamentos com CPF e ATR e CPF e 2-PAM. Entretanto, o GLM não mostrou diferença para os demais tratamentos e interações ($P > 0,05$ – ver anexo 6). Os valores de R^2 ajustados foram 0,272 e 0,161, respectivamente para PAM e FC.

Tabela 15: Valores de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basal para os diferentes grupos de tratamento.

Grupo	(n)	PAM	FC
Salina	9	94 ± 2,86	353 ± 7,61
CPF	9	98 ± 3,14	330 ± 10,02
CPF + ATR	7	107 ± 2,47 *	307 ± 15,42 #
CPF + 2-PAM	10	106 ± 2,63 *	350 ± 10,42
CPF + ATR + 2-PAM	10	106 ± 1,57 *	324 ± 14,36
Salina + ATR	7	106 ± 2,75	372 ± 10,63
Salina + 2-PAM	7	96 ± 1,41	338 ± 13,48
Salina + ATR + 2-PAM	7	99 ± 2,50	353 ± 9,85

Modelo linear geral (GLM) com três fatores fixos CPF - Clorpirifós; ATR - Atropina; 2-PAM – Pralidoxima. Post hoc de Bonferroni, * $P < 0,05$ vs salina e # $P < 0,05$ vs salina + ATR.

Tabela 16: Resultados dos efeitos fixos e interações que apresentaram significância estatística pelas análises dos modelos lineares gerais (GLM) para pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), referente as diferentes combinações de tratamento com clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) no protocolo *in vivo*.

Variável	Efeito fixo e interações		
PAM	CPF ($Z_{(1, 66)} = 9,788$; $P = 0,003$)	ATR ($Z_{(1, 66)} = 10,249$; $P = 0,002$)	ATR * 2-PAM ($Z_{(1, 66)} = 6,486$; $P = 0,014$)
FC	CPF ($Z_{(1, 66)} = 9,716$; $P = 0,003$)	CPF * ATR ($Z_{(1, 66)} = 6,140$; $P = 0,016$)	CPF * 2-PAM ($Z_{(1, 66)} = 4,557$; $P = 0,037$)

4.2.3. Avaliação da resposta cardiovascular do quimiorreflexo

As respostas cardiovasculares frente à estimulação do quimiorreflexo nos diferentes grupos são apresentas na figura 41. O modelo linear misto mostrou que para a resposta pressora do quimiorreflexo houve efeito dos tratamentos com CPF e 2-PAM. O tratamento com CPF levou a um prejuízo da resposta pressora reflexa ($F_{(1, 58)} = 12,520$; $P = 0,001$), enquanto o tratamento com a pralidoxima foi capaz de restaurar esse prejuízo nos animais intoxicados ($F_{(1, 58)} = 4,690$; $P = 0,034$). Também foi observado um padrão de relação dose resposta para as diferentes doses de KCN ($F_{(3, 174)} = 261,826$; $P = 0,0001$), mas não houve interação entre os diferentes fatores fixos ($F_{(25, 162)} = 1,086$; $P = 0,364$).

Para a resposta bradicárdica do quimiorreflexo, o modelo linear misto não mostrou efeito para os tratamentos isolados com CPF ($F_{(1, 58)} = 1,093$; $P = 0,30$), atropina ($F_{(1, 58)} = 0,022$; $P = 0,881$) ou pralidoxima ($F_{(1, 58)} = 0,151$; $P = 0,699$), mas mostrou interação para os tratamentos com CPF e ATR ($F_{(1, 58)} = 7,33$; $P = 0,009$) e KCN, CPF e ATR ($F_{(3, 174)} = 3,473$; $P = 0,017$) (ver anexo 11 para os demais valores da análise estatística). Os animais que foram intoxicados com CPF e receberam tratamento com atropina apresentaram uma média estimada de resposta bradicárdica maior do que os que não receberam atropina. Já entre os animais controle, aqueles que receberam atropina apresentaram uma média bradicárdica menor em relação aos animais que não receberam o tratamento com atropina. Os resultados da análise post hoc da interação entre os tratamentos com CPF e atropina são apresentados

na tabela 17, enquanto que para a interação entre KCN, CPF e ATR são apresentados na tabela 18.

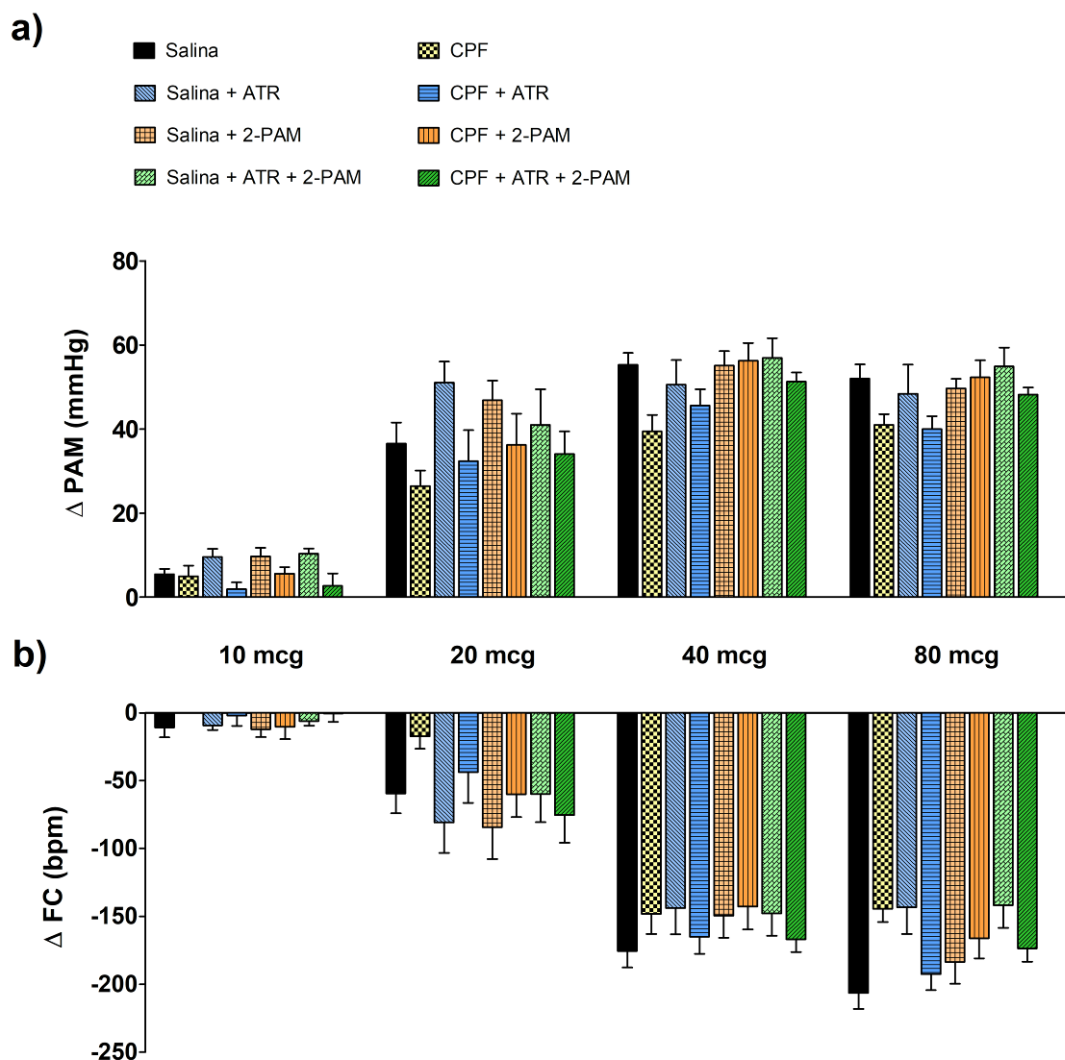


Figura 41: Variações de pressão arterial média (PAM; Painei a) e frequência cardíaca (FC; Painei b) frente à ativação do quimiorreflexo pela administração de KCN nas doses de 10, 20, 40 e 80 μ g. Modelo linear misto seguido pelo teste post hoc de Bonferroni para análise das interações. CPF= Clorpirifós; ATR= Atropina; 2-PAM= Pralidoxima.

Tabela 17: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF) e atropina (ATR).

CPF	Atropina	Média estimada (bpm)	Diferença das médias de atropina (sim e não)	P
Sim	Sim	-102,45	-16,69	0,064
	Não	-85,76		
Não	Sim	-91,60	18,65	0,057
	Não	-110,26		

Ajuste de Bonferroni.

Tabela 18: Análise post hoc da interação entre as doses de KCN, a intoxicação com clorpirifós (CPF) e o tratamento com atropina (ATR).

CPF	Atropina	Média estimada (bpm)	Diferença das médias de atropina (sim e não)	P
Sim	Sim	-183,10	-27,86	0,043 *
	Não	-155,25		
Não	Sim	-142,57	52,48	0,001 **
	Não	-195,04		

Ajuste de Bonferroni para dose de 80 µg de KCN.

4.1.3. Avaliação dos parâmetros respiratórios basais

Os valores de volume corrente e volume minuto são apresentados na tabela 19. Para o volume corrente basal, o modelo generalizado misto não mostrou efeitos para os tratamentos com CPF ($F_{(1, 57)} = 0,095$; $P = 0,759$), atropina ($F_{(1, 57)} = 0,893$; $P = 0,349$) ou pralidoxima ($F_{(1, 57)} = 0,004$; $P = 0,950$), porém apresentou interação para os tratamentos com ATR e pralidoxima ($F_{(1, 57)} = 6,360$; $P = 0,014$) (Tabela 20 e anexo 12 para os demais valores da análise estatística).

Para o volume minuto basal, o modelo generalizado misto não mostrou efeitos para os tratamentos com CPF ($F_{(1, 58)} = 3,800$; $P = 0,056$) e pralidoxima ($F_{(1, 58)} = 0,130$; $P = 0,719$), porém mostrou diferença para o tratamento com atropina ($F_{(1, 58)} = 6,524$; $P = 0,013$) (ver anexo 14 para os demais valores da análise estatística).

Para a frequência respiratória basal (Figura 42), o modelo das equações de estimações generalizadas (GEE) mostrou diferenças para os tratamentos com CPF (Wald- $X^2_{(1)} = 6,782$; $P = 0,009$) e ATR (Wald- $X^2_{(1)} = 4,219$; $P = 0,040$), além de mostrar efeito do tempo (Wald- $X^2_{(9)} = 292,861$; $P = 0,0001$) e interação entre CPF, ATR 2-PAM e o tempo (Wald- $X^2_{(37)} = 191,679$; $P = 0,0001$), porém não mostrou diferença para o tratamento com 2-PAM (Wald- $X^2_{(1)} = 0,768$; $P = 0,381$) nem as demais interações (ver anexo 16).

Tabela 18: Volumes respiratórios corrente (V_T) e minuto (V_E) .

Grupos	V_T (mL.Kg ⁻¹)	V_E (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)
Salina	4,8 ± 0,29	532,9 ± 42,73
CPF	5,1 ± 0,51	554,5 ± 72,37
CPF + ATR	3,78 ± 0,22	334,76 ± 35,99
CPF + 2-PAM	4,33 ± 0,24	455,08 ± 43,18
CPF + ATR + 2-PAM	3,97 ± 0,43	348,79 ± 51,73
Salina + ATR	3,75 ± 0,39	415,51 ± 53,38
Salina + 2-PAM	3,68 ± 0,21	447,90 ± 54,42
Salina + ATR + 2-PAM	5,52 ± 0,65	536,73 ± 56,24

Tabela 20: Análise post hoc da interação entre atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) para o volume corrente.

Pralidoxima	Atropina	Média estimada (bpm)	Diferença das médias de atropina (sim e não)	P
Sim	Sim	4,465	0,520	0,280
	Não	3,945		
Não	Sim	3,681	-1,151	0,037*
	Não	4,833		

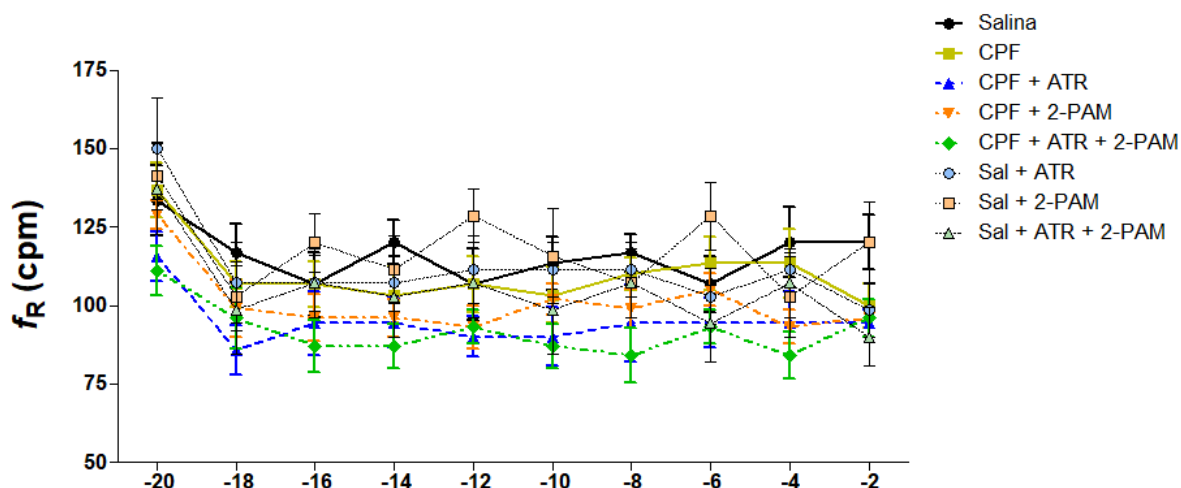


Figura 42: Frequências respiratórias basais (f_R , cpm) para as diferentes combinações de tratamento com clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) quantificada 20 segundos antes da ativação do quimiorreflexo com KCN nas doses de 10 μ g.

4.1.4. Avaliação da resposta taquipneica do quimiorreflexo *in vivo*

As respostas taquipneicas frente à estimulação do quimiorreflexo nos diferentes grupos são apresentadas na figura 43. A análise de GEE mostrou que a intoxicação com CPF levou a um prejuízo da resposta taquipneica ($\text{Wald-}X^2_{(1)} = 23,775$; $P = 0,0001$) e que as respostas observadas apresentam uma relação dose dependente para as diferentes doses de KCN ($\text{Wald-}X^2_{(3)} = 37,785$; $P = 0,0001$). Adicionalmente, a análise demonstrou que a frequência respiratória apresenta uma variação ao longo do tempo ($\text{Wald-}X^2_{(19)} = 2.464,201$; $P = 0,0001$). Observa-se um prejuízo da resposta taquipneica ao longo do tempo através da diferença identificada para a interação entre intoxicação com CPF e tempo ($\text{Wald-}X^2_{(19)} = 30,657$; $P = 0,044$). A análise também mostrou que a interação entre os tratamentos com CPF, ATR e 2-PAM ($\text{Wald-}X^2_{(2)} = 7,961$; $P = 0,019$) também foi significativa. O tratamento conjunto com ATR e 2-PAM foi efetivo em restaurar o prejuízo induzido pela intoxicação com CPF. A média estimada da resposta taquipneica para os animais que foram apenas intoxicados com CPF foi de 123 cpm enquanto que para os animais que não receberam nenhum tratamento (salina) foi de 139 cpm. Como podemos observar nas tabelas 21, 22 e 23, os tratamentos individualizados apenas com ATR ou 2-PAM não foram capazes de restaurar o prejuízo da intoxicação com CPF. Os animais não intoxicados que receberam o tratamento com ATR ou 2-PAM apresentaram uma

tendência a maiores respostas taquipneicas em comparação aos animais que não receberam nenhum tratamento (ATR= 146 cpm e 2-PAM= 153 cpm; Tabela 23. Todavia, nos animais controle que receberam tratamento conjunto com as duas drogas, essa tendência não foi observada (Tabelas 22 e 23). Os tratamentos com ATR e/ou 2-PAM foram capazes de restaurar o pico da resposta taquipneica de animais intoxicados como mostrado pela análise de interação entre CPF, ATR, 2-PAM e tempo ($\text{Wald-}X^2_{(114)} = 368,392$; $P = 0,0001$). Demais tratamentos e interações não foram significativos (ver anexo 14 para os demais valores da análise estatística). A análise post hoc da interação dos tratamentos CPF, ATR e 2-PAM são apresentados nas tabelas 21, 22 e 23.

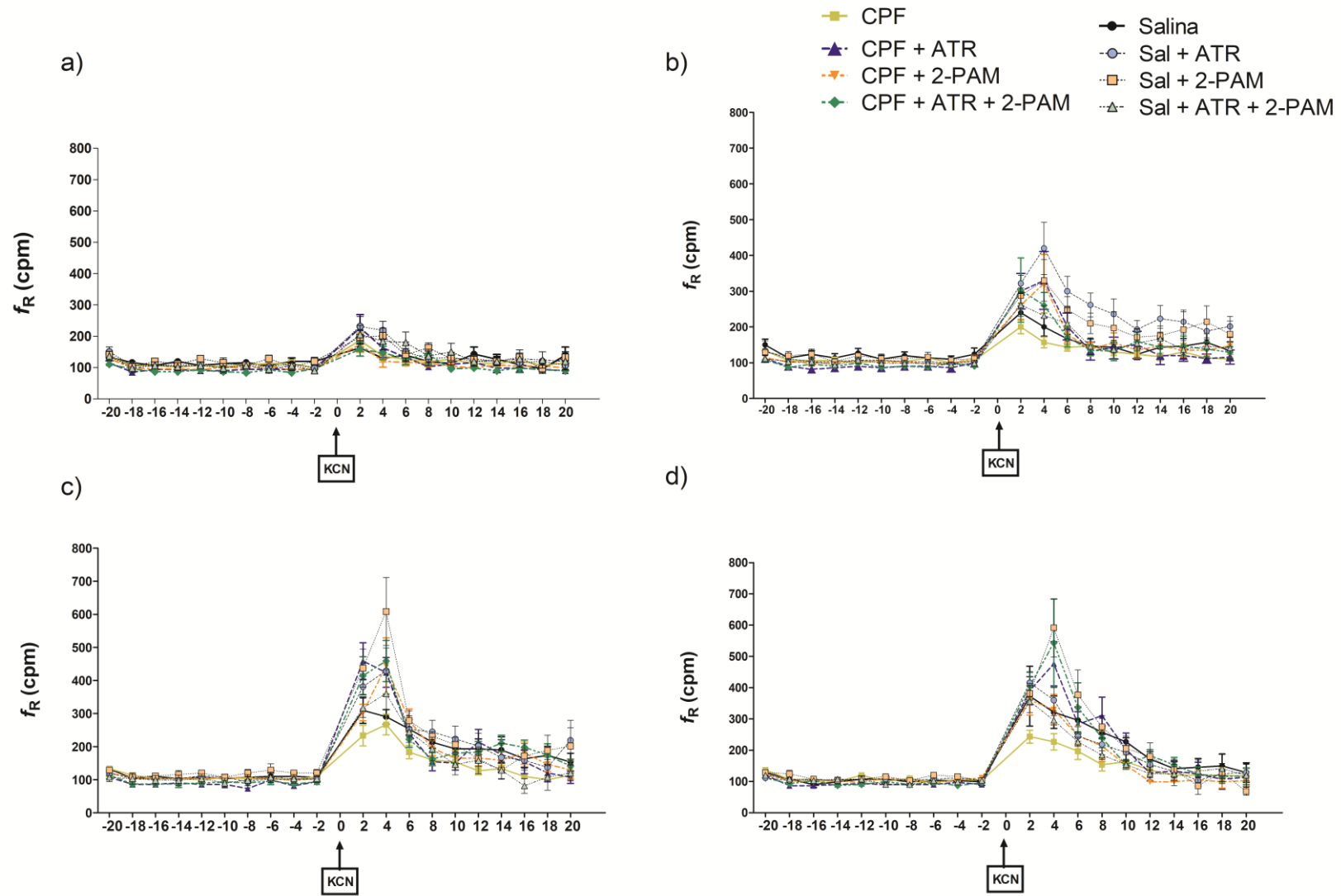


Figura 43: Frequências respiratórias (f_R , cpm) antes e durante a estimulação do quimiorreflexo com KCN para as diferentes combinações de tratamento com salina, clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). Doses de KCN: a) 10 μ g. b) 20 μ g. c) 40 μ g. d) 80 μ g.

Tabela 21: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando animais intoxicados com animais não intoxicados com CPF para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.

Atropina	Pralidoxima	CPF	Média estimada (cpm)	Diferença das médias de CPF (sim e não)	P
Sim	Sim	Sim	127,1289	-3,2628	0,631
		Não	130,3917		
	Não	Sim	124,9984	-21,4026	0,001 **
		Não	146,4010		
Não	Sim	Sim	128,5982	-24,5292	0,001 **
		Não	153,1274		
	Não	Sim	123,8593	-15,3531	0,011 *
		Não	139,2124		

Post hoc de Bonferroni *P<0,05 e **P<0,01

Tabela 22: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando animais que receberam ATR com animais que não receberam ATR para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.

CPF	Pralidoxima	Atropina	Média estimada (cpm)	Diferença das médias de atropina (sim e não)	P
Sim	Sim	Sim	127,1289	-1,4693	0,769
		Não	128,5982		
	Não	Sim	124,9984	1,1392	0,848
		Não	123,8593		
Não	Sim	Sim	130,3917	-22,7357	0,007 **
		Não	153,1274		
	Não	Sim	146,4010	7,1886	0,268
		Não	139,2124		

Post hoc de Bonferroni **P<0,01

Tabela 23: Análise post hoc da interação entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM) comparando os animais que receberam 2-PAM com animais que não receberam 2-PAM para as respostas taquipneicas do quimiorreflexo.

CPF	Atropina	Pralidoxima	Média estimada (cpm)	Diferença das médias de Pralidoxima (sim e não)	P
Sim	Sim	Sim	127,1289	2,1305	0,715
		Não	124,9984		
	Não	Sim	128,5982	4,7389	0,357
		Não	123,8593		
Não	Sim	Sim	130,3917	-16,0094	0,029 *
		Não	146,4010		
	Não	Sim	153,1274	13,9150	0,072
		Não	139,2124		

Post hoc de Bonferroni **P<0,01

4.3. DOSAGENS ENZIMÁTICAS

4.3.1. Atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) na preparação tronco cerebral-coração isolado (WHBP)

A figura 44 apresenta os dados das dosagens das atividades da butirilcolinesterase e acetilcolinesterase na WHBP. As atividades das colinesterases de animais intoxicados com CPF foram marcadamente reduzidas quando comparadas ao de animais do grupo controle: BuChe (U= 0,000; P= 0,001) e AChE ($t_{(8)}= 7,481$; P= 0,0001).

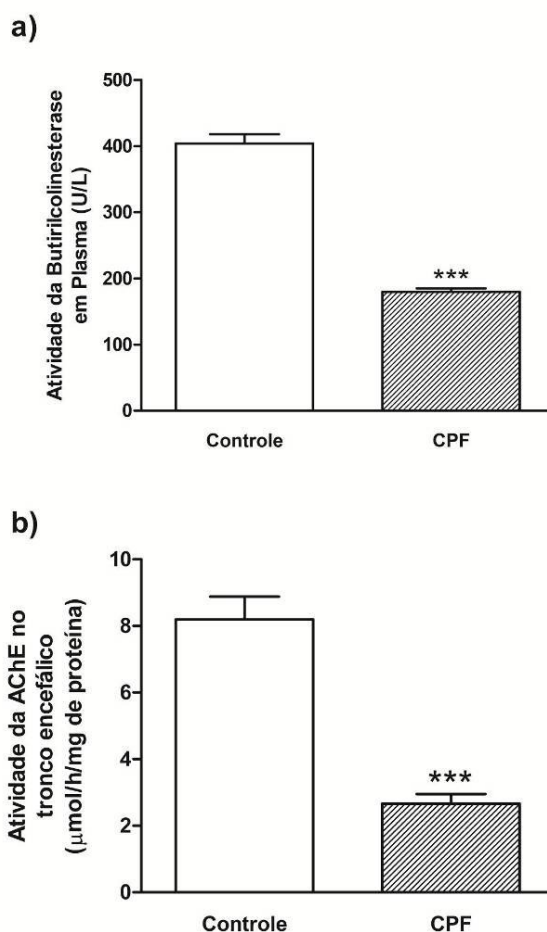


Figura 44: Painel a) Atividade da butirilcolinesterase (BuChE, em plasma) entre os grupos controle (n= 6) e CPF (Clorpirifós, 30 mg/Kg, n= 7). *** P<0,001 vs controle. teste U de Mann Whitney. Painel b) Atividade da AChE no tronco encefálico de ratos controle (n= 5) e CPF (Clorpirifós, 30 mg/Kg, n= 5) *** P<0,001 vs controle. Teste *t*-Student não pareado.

4.3.2. Atividades da butirilcolinesterase (BuChE) plasmática e acetilcolinesterase do tronco encefálico (AChE) do modelo *in vivo*

As atividades da BuChE nos diferentes grupos são apresentadas na figura 45. O GEE mostrou efeito para os tratamentos com CPF (Wald- $X^2_{(1)} = 26,008$; $P = 0,0001$) e pralidoxima (Wald- $X^2_{(1)} = 3,979$; $P = 0,046$), efeito do tempo (Wald- $X^2_{(1)} = 56,706$; $P = 0,0001$) e interação entre CPF e tempo (Wald- $X^2_{(1)} = 42,356$; $P = 0,0001$). A intoxicação com CPF levou a uma marcante inibição da atividade da BuChE, a qual não foi restaurada pelos diferentes combinações de tratamento empregados (ver anexo 18 para os demais valores da análise estatística). A análise do post hoc da interação do tratamento com CPF e tempo é apresentada na tabela 24.

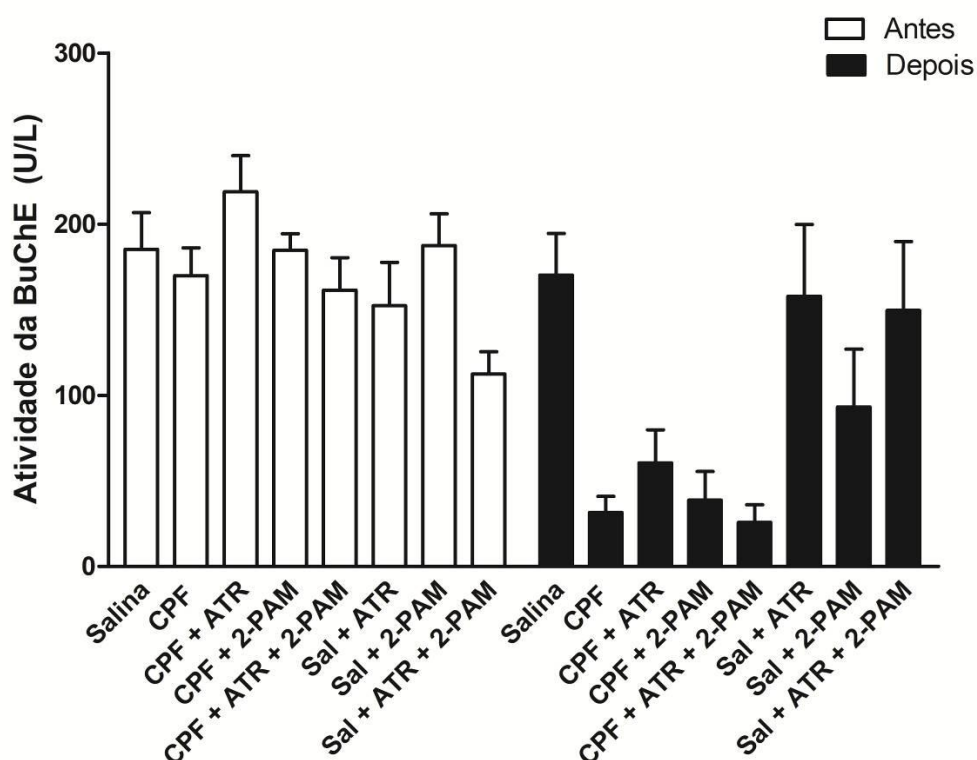


Figura 45: Atividade da butirilcolinesterase (BuChE, em plasma) antes e após os tratamentos com as diferentes combinações entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 10), CPF (n= 13), CPF + ATR (n= 10), CPF + 2-PAM (n= 11), CPF + ATR + 2-PAM (n= 12), Salina + ATR (n= 8), Salina + 2-PAM (n= 7), Salina + ATR + 2-PAM (n= 7).

Tabela 24: Análise post hoc da interação entre CPF e tempo para a análise da atividade da butirilcolinesterase.

CPF	Tempo	Média estimada (U/L)	Diferença das atividades (antes e depois)	P
Sim	Antes	182,53	144,89	0,0001 **
	Depois	37,63		
Não	Antes	156,23	16,97	0,401
	Depois	139,26		

Post Hoc de Bonferroni ** P<0,01

As atividades da AChE nos diferentes grupos de tratamento são apresentas na figura 46. O modelo misto generalizado mostrou efeito para a intoxicação com CPF ($F_{(1, 69)} = 99,427$; $P = 0,0001$) e a interação entre pralidoxima e atropina ($F_{(1, 69)} = 6,108$; $P = 0,016$) (Tabela 25 e anexo 19 para os demais valores da análise estatística).

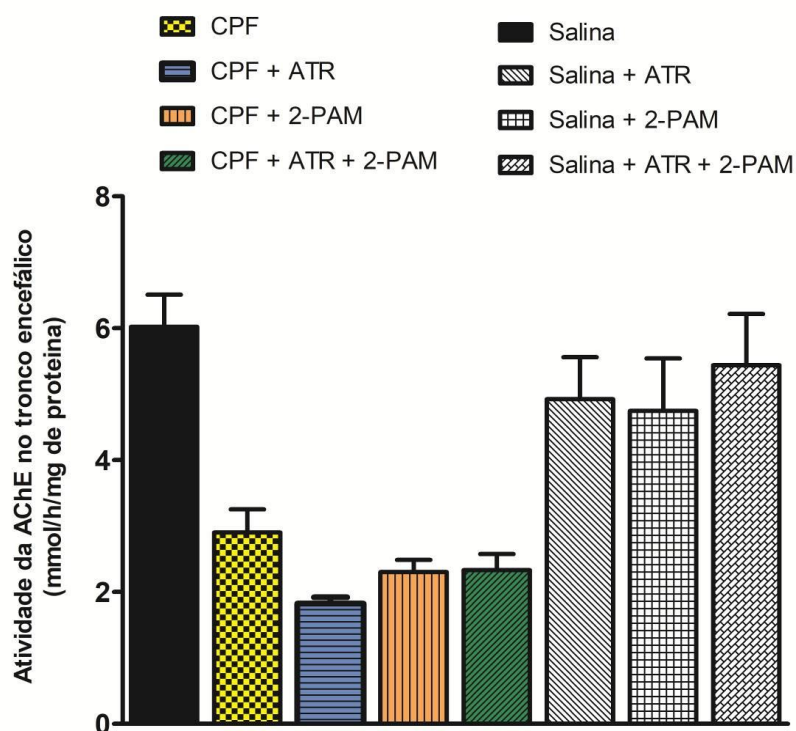


Figura 46: Atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE, em tronco encefálico) após os tratamentos com as diferentes combinações entre clorpirifós (CPF), atropina (ATR) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 9), CPF (n= 11), CPF + ATR (n= 10), CPF + 2-PAM (n= 10), CPF + ATR + 2-PAM (n= 10), Salina + ATR (n= 9), Salina + 2-PAM (n= 9), Salina + ATR + 2-PAM (n= 9).

Tabela 25: Análise post hoc da interação entre atropina e pralidoxima para a atividade da acetilcolinesterase.

Pralidoxima	Atropina	Média estimada (mmol/h/mg de proteína)	Diferença das atividades (antes e depois)	P
Sim	Sim	3,421	0,261	0,501
	Não	3,159		
Não	Sim	2,920	-1,099	0,038 *
	Não	4,019		

Post Hoc de Bonferroni *P<0,05

4.3.3. Atividade da acetilcolinesterase nos *punchs* de cortes do tronco encefálico contendo núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC.

A atividade da AChE nos principais núcleos responsáveis pela função cardiorespiratória são apresentas na figura 47. O modelo misto generalizado mostrou efeito para o tratamento com CPF ($F_{(1, 17)} = 103,763$; $P = 0,0001$) e a

interação entre CPF e os núcleos ($F_{(2, 34)} = 3,360$; $P = 0,047$) (Figura 47. b), (ver anexo 21 para os demais valores da análise estatística).

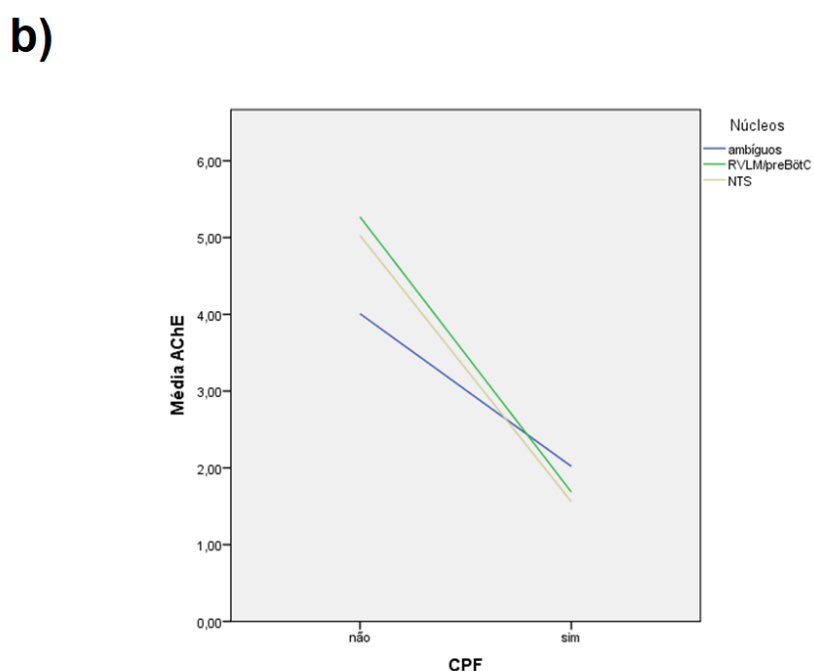
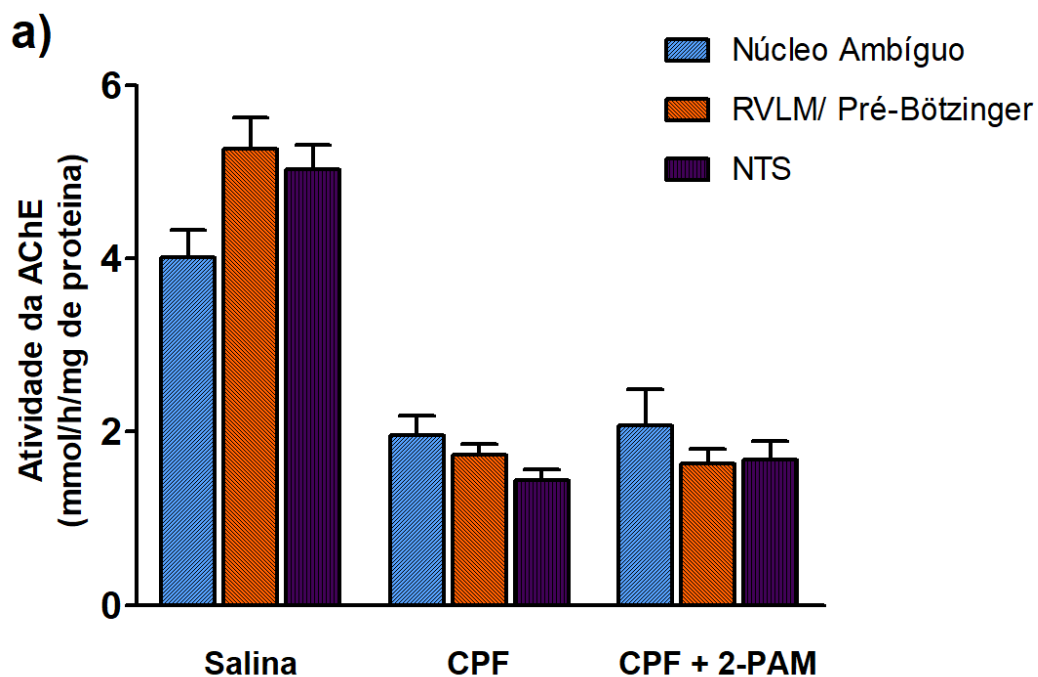


Figura 47: Painel a) Atividade da acetilcolinesterase cerebral (AChE) nos *punchs* contendo os principais núcleos cardiorespiratórios após os tratamentos combinados entre clorpirifós (CPF) e pralidoxima (2-PAM). Salina (n= 6), CPF (n= 7), CPF + 2-PAM(n= 10), CPF + 2-PAM (n= 7). Painel b) Representação gráfica mostrando a interação entre o fator tratamento com CPF e os *punchs* contendo os núcleos responsáveis pelas respostas cardiorespiratórias.

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós mostramos que a exposição aguda ao CPF em grau comercial (Lorsban 480 BR[®]) levou a um prejuízo da resposta do quimiorreflexo tanto no modelo *in vitro*, quanto no modelo *in vivo*. Ainda no modelo *in vitro*, o barorreflexo mostrou alteração no percentual de inibição da atividade simpática frente a ativação com fenilefrina e tendência a uma menor resposta reflexa. Os achados dos parâmetros respiratórios basais e após ativação do quimiorreflexo foram controversos entre os modelos *in vitro* e *in vivo*. Todos os resultados foram associados com uma marcante inibição das enzimas butirilcolinesterase plasmática e acetilcolinesterase cerebral em ambos os modelos. Essas inibições vieram acompanhadas, ainda, das manifestações dos principais sinais de intoxicação aguda.

Em nosso estudo, os animais receberam uma dose subletal alta do clorpirifós (30 mg/Kg). O objetivo dessa dose foi o de simular as condições reais de uma intoxicação aguda maciça por organofosforados, que normalmente ocorre através de tentativas de suicídio por agricultores, e que por muitas vezes acabam por sobreviver à crise colinérgica aguda (BOCHNER, 2007; JEYARATNAM, 1990; LONDON et al., 2005).

Hung e colaboradores (2015) mostraram em seu estudo a relação entre os inseticidas organofosforados e doenças cardiovasculares (CVD). Eles relataram que a presença de comorbidades como diabetes, hipertensão e hiperlipidemia foram mais comuns em pacientes intoxicados por organofosforados. Eles também relataram que estes pacientes tiveram maiores incidências nas taxas de arritmias e doenças coronarianas. Os autores discutiram que essas alterações poderiam ser causadas pela diminuição da paraoxonase (PON1) que favoreceria o início da aterogênese. Os nossos resultados juntamente com os resultados de Cunha (2014) e Maretto e colaboradores (2012) trazem uma nova abordagem acerca dos mecanismos sobre os quais os organofosforados podem levar os pacientes a apresentar maiores incidências de pelo menos uma dessas comorbidades, a hipertensão. Os prejuízos nas respostas reflexas, tanto do barorreflexo quanto do quimiorreflexo são conhecidos como importantes fatores que podem levar a

hipertensão e esta, por sua vez, é relacionada com a presença de doenças cardíacas mais graves, como doenças coronárias, insuficiência cardíaca congestiva, derrame e doenças renais (FERNANDEZ et al., 2015; GUYENET, 2006; HERMANSEN, 2000; KARA; NARKIEWICZ; SOMERS, 2003; NARKIEWICZ et al., 1999; PERSSON, 2005; ROSENTHAL; ALTER, 2012).

Embora nossos resultados no modelo *in vitro* para o barorreflexo não tenham reproduzidos igualmente os achados de Cunha (2014) quanto aos ganhos bradicárdico e simpático, observa-se uma clara tendência em apresentar respostas reflexas menores tanto para a bradicardia máxima quanto para a inibição da atividade simpática. A diferença encontrada entre os estudos *in vivo* de Cunha e os nossos, tanto para o ganho simpático quanto para o ganho bradicárdico, pode ser devido as diferentes formas de estimativa do ganho empregada nos dois estudos. Em nosso cálculo, a razão entre o percentual de inibição da atividade simpática ou a bradicardia máxima são expressos em função da resposta pressora, extraída da alteração na pressão de perfusão, o que não retrata exatamente o que é observado em função da pressão arterial no modelo *in vivo*.

Ainda sobre os resultados *in vitro*, estes não apontam para uma possível contribuição do acoplamento simpato-respiratório no desenvolvimento de hipertensão neurogênica pós intoxicação por organofosforados. Entretanto, em nosso protocolo o nervo simpático abdominal não foi registrado, impossibilitando a avaliação do padrão de disparo simpático na fase E2 do ciclo respiratório (SOUZA et al., 2016; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009). Quando comparados os modelos *in vitro* e *in vivo* quanto aos parâmetros basais, resultados controversos foram achados. No protocolo da WHBP, alterações nos parâmetros da amplitude de disparo do nervo frênico foram evidenciados; estes, por sua vez, indicam um prejuízo na capacidade inspiratória (GOLDER et al., 2011). Esses achados não corroboraram com os do modelo *in vivo*, onde o CPF não levou a prejuízos no volume corrente e no volume minuto dos ratos intoxicados. Além disso, enquanto no modelo *in vivo* foi observada uma menor frequência respiratória para os ratos que foram intoxicados com CPF, o mesmo não foi observado em relação a frequência de disparo do nervo frênico. Esses resultados controversos se repetem ainda para a resposta taquipneica após ativação do quimiorreflexo, no qual um prejuízo da

resposta reflexa foi observado para frequência respiratória e o mesmo não foi observado para a WHBP. Apesar disso, nossos resultados *in vitro* apontam para a mesma direção do trabalho de Klein-Rodewald e colaboradores (2011). Neste estudo os autores observaram que após administração do crotylsarin na WHBP houve aumento dos tempos de inspiração, expiração e do tempo total, além de diminuição da amplitude do nervo frênico, que seriam restaurados após o período de 1h. Apesar dos nossos resultados não apresentarem diferenças significativas para os demais parâmetros que não a amplitude, ainda assim é possível observar uma tendência de alteração dos demais parâmetros avaliados seguindo o mesmo sentido. Isso indicaria que no curso da intoxicação aguda, os animais tiveram esses mesmos parâmetros alterados, mas após 24h eles já teriam se recuperados. Esses achados parecem estar de acordo com o relato de Adams et al. (1976) em que cobaias expostos ao sarin e soman, que apresentaram insuficiência respiratória, após um período de tempo tiveram suas funções respiratórias restauradas, e assim como no nosso trabalho, essa restauração foi independente de uma restauração da atividade da AChE no tronco encefálico.

Várias possibilidades podem ser levantadas para justificar essa discrepância nos resultados dos dois modelos. Precisamos lembrar que na WHBP os animais estão descerebrados, além das aferências periféricas estarem comprometidas. Portanto, duas das três aferências para o centro de controle do padrão respiratório estão inviabilizadas nesse modelo. Podemos observar esse efeito sobre o padrão respiratório quando comparamos que em um animal acordado não anestesiado, a frequência respiratória se apresenta em uma faixa de 100-120 ciclos por minuto (cpm), enquanto que a frequência de disparo do nervo frênico na WHBP é em torno de 17-20 disparos por minuto (*Bursts per minute* - bpm) e essa diferença intrínseca entre os dois modelos poderia ser suficiente para mascarar possíveis alterações sobre parâmetros respiratórios, assim como, no caso da resposta taquipneica do quimiorreflexo.

Diversos estudos tem mostrado que o sistema colinérgico é capaz de modular diretamente os centros responsáveis pela geração do ritmo respiratório, principalmente o complexo pré-Bötzinger (preBötC), que é considerado o

responsável pela geração da fase de inspiração do ciclo respiratório (RICHTER; SPYER, 2001; SHAO; FELDMAN, 2005). Estudos tem mostrado a presença tanto de receptores muscarínicos quanto nicotínicos no preBötC; particularmente os receptores muscarínicos do subtipo M₃ e nicotínicos do subtipo $\alpha 4\beta 2$ nAChRs parecem ser importantes para a geração de um efeito estimulatório sobre os neurônios ritmogênicos, os quais levam a um aumento da frequência respiratória (LAI et al., 2001; SHAO et al., 2008; SHAO; FELDMAN, 2000, 2002). Apesar de ambos os receptores serem capazes de exercer funções sobre os centros respiratórios, os receptores muscarínicos parecem ter maior importância clínica para a ocorrência da insuficiência respiratória em pacientes intoxicados agudamente por OF's (JAYAWARDANE et al., 2012).

O papel do aumento da quantidade de acetilcolina no tronco encefálico sobre a geração do ritmo respiratório tem se mostrado muito mais complexo. Caso esse aumento ocorra dentro de uma faixa fisiológica normal, a acetilcolina parece ter um efeito estimulador dos parâmetros respiratórios (SHAO; FELDMAN, 2005), ao passo que em grandes quantidades, como no caso das intoxicações por OFs, isso levaria a um prejuízo da função desse sistema (CAREY; DUNN; GASPARI, 2013; GASPARI; PAYDARFAR, 2007, 2011). Esse efeito *dual* poderia explicar o fato do tratamento com atropina ter apresentado efeito sobre esses parâmetros respiratórios no sentido de reduzir esses valores. Por outro lado, os registros respiratórios com pletismografia de corpo inteiro apresentam grande variabilidade inter-indivíduos, o que pode constituir uma limitação do modelo e levar a uma interpretação dúbia dos resultados.

A análise dos valores basais de PAM e FC dos diferentes grupos de estudo identificou efeito estatisticamente significativo para os tratamentos com as drogas, assim como interações. Entretanto, para todos os grupos, os valores médios se apresentavam dentro da faixa de normalidade para a espécie e os GLMs apresentaram valores de R² ajustados abaixo de 0,3. Isso seria um indício de que talvez o modelo não explique muito bem a variabilidade dos dados. Contudo, todos esses resultados basais levam a indícios que 24h após o tratamento com os

antídotos no modelo *in vivo*, a atropina ainda se encontraria de forma residual no sangue dos animais.

Na avaliação das respostas do quimiorreflexo, observamos que a intoxicação aguda com o CPF levou a um prejuízo das respostas quando comparado com os grupos controles em ambos os modelos. Esses dados estão de acordo com o estudo de Cunha (2014) e Maretto et al (2012), em que prejuízos das respostas reflexas foram observados frente a intoxicação aguda com clorpirifós e o metamidofós. Vários autores tentaram estabelecer preditores de mortalidade para intoxicação aguda por organofosforados. É consenso de que apesar de pacientes receberem cuidados intensivos, como suporte ventilatório, lavagem gástrica e até a terapia padrão com os antídotos atropina e pralidoxima, a mortalidade ainda é alta para esses grupos de indivíduos. A taxa de mortalidade em unidade de tratamento intensivo gira em torno de 10 – 50% mesmo com ventilação mecânica (BANDAY et al., 2015; MUNIDASA et al., 2004; TANG et al., 2016). Munidasa e colaboradores (2004) relataram que a taxa de mortalidade entre os pacientes estudados foi de 50%, mesmo com ventilação mecânica e suplementação com oxigênio. Os autores sugeriram que o principal contribuinte para mortalidade de pacientes, quando a insuficiência respiratória está controlada por ventilação mecânica, seria um prejuízo global da função do miocárdio juntamente com efeitos cardíacos diretos dos OFs. Nossos dados corroboram com esses relatos, já que os reflexos neurais da função cardiovascular são importantes para o funcionamento adequado do coração e para manter a pressão arterial.

O prejuízo da resposta do quimiorreflexo parece exercer um papel importante no prognóstico do paciente na crise colinérgica aguda. Bird e colaboradores (2003) mostraram em seu trabalho que a apneia induzida por organofosforados é centralmente mediada. Já Gaspari e Paydarfar (2007, 2012) relataram que não foram capazes de prevenir a mortalidade de ratos que receberam um dose letal de diclorvós com ventilação mecânica. Segundo os autores, a ventilação com suplementação mecânica normóxica foi ineficiente em manter a saturação de oxigênio no sangue levando os animais a serem hipóxicos. Ainda de acordo com os autores, a maioria dos animais ventilados exibiram sinais de prejuízo da troca gasosa devido o aumento da secreções fluidas nos pulmões e traqueia. Entretanto, conforme estes animais continuavam a piorar suas funções respiratórias, nenhum

parâmetro cardiovascular (pressão arterial e frequência cardíaca) mudou em relação ao seu plano basal, nem mesmo no momento da apneia. Esses dados são um forte sugestivo de que as respostas do quimiorreflexo estão provavelmente prejudicadas nesses animais, o que corrobora com os nossos achados. Os autores também discutiram que “o ritmo respiratório pode ser recuperado durante o suporte ventilatório após apneia central induzida por organofosforados, porém apenas em animais que não estavam hipóxicos no momento da apneia”. Eles associaram essa falta de recuperação pós-apneia com uma depressão respiratória induzida pela hipóxia. Nessa linha, é discutido que “a hipóxia profunda é capaz de causar uma profunda depressão respiratória em animais sem uma sinalização aferente intacta do corpúsculo carotídeo” apud Watt (1943). Nossos resultados suportam essa hipótese, já que no modelo *in vivo* o tratamento com pralidoxima foi capaz de restaurar, ou no mínimo atenuar, os prejuízos das respostas pressoras e taquipneicas do quimiorreflexo. Entretanto, as enzimas AChE cerebral do tronco encefálico e dos *punchs*, em especial, dos núcleos RVLM/preBötC permaneciam inibidas. Deste modo, o efeito exercido pelo tratamento com pralidoxima não parece ser devido a reativação das AChEs cerebrais.

Com uma inibição enzimática semelhante para todos os grupos de tratamento e juntando ao fato da pralidoxima ter passagem limitada sobre a barreira hematoencefálica, nossa hipótese é de que o prejuízo das respostas pressoras e taquipneicas são totalmente, ou pelo menos em parte, causados pelo CPF através de alterações na aferência quimorreceptiva nos corpúsculos carotídeos. Como a atropina foi incapaz de reverter o prejuízo da resposta pressora, é possível que a exacerbação colinérgica esteja levando a uma dessensibilização dos receptores nicotínicos presentes no corpúsculo carotídeo. Todavia, não é possível descartar que os efeitos sejam centrais e que outros núcleos, que não RVLM e pré-Böttinger, sejam os responsáveis pelos prejuízos das respostas pressoras e taquipneicas. De fato, Gaspari e Paydarfar (2011) mostraram em seu estudo que o complexo pré-Böttinger parece não ser o sítio tóxico no bulbo ventral responsável pela apneia central induzida por diclorvós.

O prejuízo da resposta do quimiorreflexo provavelmente exerce um papel importante na mortalidade causada por organofosforados, tanto na crise colinérgica aguda

quanto na síndrome intermediária. Na crise colinérgica aguda, as secreções pulmonares iriam levar a um prejuízo nas trocas gasosas nos pulmões, juntamente da apneia central, levando para uma situação de hipóxia, na qual o quimiorreflexo não é capaz de responder de forma apropriada, tanto agudamente quanto tardiamente. Adicionado a tudo isso, temos ainda os resultados envolvendo o padrão de disparo do nervo laríngeo recorrente. Nele foi observado uma diminuição na amplitude do post-I do RLN, que controla a contração dos músculos adutores da glote durante o período pós-inspiratório. Sem o fechamento adequado das vias aéreas superiores para retenção do ar inalado, este sai muito rapidamente dos pulmões prejudicando as trocas gasosas e ainda podendo favorecer o colapso alveolar (PATON; DUTSCHMANN, 2002; PATON; NOLAN, 2000). Esse achado pode ser de importância clínica quando pensamos na síndrome intermediária, em que ocorre uma insuficiência respiratória progressiva e quando não estão presentes os sintomas, como acúmulo de secreções.

A efetividade dos tratamentos com atropina e pralidoxima foram alcançados quando se observa os resultados da toxicidade aguda. Para as três manifestações, ataxia, tremor e sialorreia, foram observados efeitos para os tratamentos com ATR e 2-PAM atenuando os efeitos da intoxicação por CPF. Para alguns sinais os tratamentos foram mais efetivos que para outros ou até mais rápidos. É o caso da ataxia, que apesar de atenuar os efeitos dos tratamentos com atropina, pralidoxima ou ambos, não foram tão efetivos quando comparados, por exemplo, com a sialorreia. Como a categoria de referência para análise de regressão logística ordinal foi a intensidade ausente, a interpretação dos dados através do valor de β ou da OR se encontra invertida para o que normalmente se observa para esse tipo de análise. Portanto, aqueles tratamentos que obtiveram valores de β negativos, estes indicavam que o tratamento com aquela droga é mais provável de possuir probabilidades acumulativas de apresentar intensidades maiores, como é o caso do tratamento com CPF. Enquanto que aqueles que apresentavam valores de β positivos, eram mais prováveis de possuir probabilidades acumulativas de intensidades menores, como os tratamentos com ATR e 2-PAM.

Como comentado previamente, os valores basais dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios levam a crer que 24h após o tratamento com ATR este ainda se

encontra em certa quantidade no sangue dos animais. Isso é sustentado pelas respostas taquipneicas aumentadas e bradicárdicas atenuados no quimiorreflexo, dos animais que receberam salina e atropina ou salina atropina e pralidoxima. O tempo de meia vida da atropina é de 2-4h em humanos (STEINRITZ et al., 2011). Entretanto, Leusch e colaboradores (2001) mostram que tiotropium e ipratropium apresentam um tempo de meia vida muito maior em ratos, mesmo apresentando estruturas relacionadas com a atropina. Apesar da atropina apresentar uma rápida eliminação para as primeiras horas, esta pode apresentar uma prolongação de sua excreção que só alcançaria um total de 95% de eliminação após 60 horas em camundongos (EMEA, 1998). Vale lembrar que a dose empregada em nosso estudo foi muito maior que dose normalmente administrada, o que poderia acarretar em um certo efeito residual da atropina. Em estudos experimentais avaliando a contribuição do componente parassimpático sobre respostas autonômicas, a dose de atropina empregada para bloqueio vagal é de 1 mg/kg (KARLEN-AMARANTE et al., 2012). A dose de atropina utilizada em nosso estudo foi uma dose mais elevada (10 mg/kg), seguindo o estudo de KOSE e colaboradores (2009). Na clínica, o tratamento padrão emprega o uso de altas doses até que se obtenha uma melhora dos sintomas. No âmbito experimental seria difícil adotar um protocolo exatamente igual ao adotado na clínica baseado nos sinais. Sendo assim, adotamos como Kose, uma maior dose, de forma a manter os efeitos deste fármaco por mais tempo.

Outra possibilidade que não pode ser descartada se refere aos efeitos da intoxicação sobre os sistemas colinérgicos não-neuroniais (SCNN), principalmente o cardíaco. O SCNN presente nos cardiomiócitos, dentre várias funções fisiológicas, parece atuar como uma forma de amplificação do sinal gerado através da ativação parassimpática (KAKINUMA et al., 2012; ROCHA-RESENDE et al., 2012; WESSLER; KIRKPATRICK, 2008). É relatado na literatura que a ação agonista da ACh liberada pelas fibras parassimpáticas são capazes de induzir a liberação vesicular da ACh armazenada nos cardiomiócitos, além da síntese e expressão de proteínas e enzimas necessárias para uma maior produção dessa molécula. No caso de intoxicação por compostos OF's em que se apresenta um grande aumento da quantidade de ACh, essa poderia através de mecanismos de *feedback* negativo, dessensibilização ou até mesmo de internalização membranar de receptores colinérgicos, levar a uma resposta bradicárdica menor. Pensando que em níveis

fisiológicos existe esse equilíbrio da estimulação *quantal* de ACh pelo SNP sobre a síntese e liberação de ACh pelo o SCNN por parte dos cardiomiócitos, é possível que a atropina em grande quantidades, como é no nosso protocolo, seja capaz de bloquear esse estímulo levando a uma depleção das quantidades de ACh vesicular desse sistema não-neuronal (LEWARTOWSKI; MACKIEWICZ, 2015). Frente a estimulação do quimiorreflexo pela administração de KCN, os animais Salina + ATR ou Salina + ATR + 2-PAM apresentariam uma resposta bradicárdica também menor devido a essa diminuição das quantidade de ACh vesicular. Entretanto, sem sermos capazes de quantificar os conteúdos intracelulares de ACh qualquer afirmação é meramente especulativa.

Quando avaliamos os efeitos exercidos pelos antídotos ATR e 2-PAM sobre as respostas de ativação do quimiorreflexo, podemos observar um efeito diferenciado sobre cada componente. Enquanto o tratamento com a 2-PAM exerce um efeito mais restaurador do prejuízo observado sobre a resposta pressora do quimiorreflexo, em animais intoxicados com CPF o tratamento com atropina parece exercer um efeito mais proeminente de restauração do prejuízo da resposta bradicárdica. Ambos tratamentos parecem exercer um efeito protetor sobre a resposta taquipneica. Como previamente comentado, existe muita controvérsia quanto ao uso da pralidoxima e sua efetividade no tratamento, pelo fato de alguns ensaios indicarem que esses compostos podem não beneficiar alguns pacientes (BUCKLEY et al., 2011; PETER; MORAN; GRAHAM, 2006; RAHIMI; NIKFAR; ABDOLLAHI, 2006). No que tange ao tratamento com 2-PAM e as respostas cardiorrespiratórias do quimiorreflexo, nossos resultados sugerem que a pralidoxima seria recomendada para os casos de intoxicação com CPF, ainda que a devida precaução em relação a essa afirmativa deva ser considerada uma vez que a translacionalidade dos resultados de um modelo animal para a clínica nem sempre se mostram exatas.

Em nosso trabalho, nós não buscamos estudar os mecanismos pelos quais o CPF leva às alterações observadas sobre o sistema cardiorespiratório nem como os antídotos de fato levam aos seus efeitos benéficos. Entretanto, em nosso estudo, pistas podem apontar para algumas direções. Os resultados dos bloqueios simpático

e parassimpático na WHBP mostram que no tempo de 24h após a intoxicação por CPF, apenas o sistema parassimpático ainda se apresentava exacerbado através do resultado das secções dos nervos vagos. Apesar de não ter apresentado diferença estatística, o bloqueio do simpático cardíaco através da administração do atenolol mostrou uma tendência a estar aumentado nos animais intoxicados. Um resultado controverso foi observado para administração do hexametônio. O resultado sobre a resposta pressora após administração do hexametônio mostrou um aumento em relação aos animais controle. Entretanto, não conseguimos encontrar uma explicação fisiológica para esse evento, já que os bloqueios com atenolol e hexametônio deveriam levar direta ou indiretamente a uma queda da pressão. Em nosso protocolo, o bloqueio com hexametônio era sempre precedido do bloqueio com atenolol. O efeito do atenolol em receptores B1 levou a uma queda da frequência cardíaca, com queda secundária da pressão de perfusão, aliado a uma inibição da atividade simpática. Em contrapartida, o bloqueio com hexametônio também promove uma inibição da atividade simpática pelo bloqueio ganglionar, o que deveria promover uma queda da pressão de perfusão, pela redução da resistência vascular periférica. Esse efeito sobre a pressão de perfusão não foi observado em animais controle e em animais intoxicados, apenas um discreto aumento foi observado. É possível assim que a ordem dos bloqueios estabelecidos tenha influenciado nos resultados encontrados. Adicionalmente, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos ainda se faz necessário a execução do protocolo de tratamento *in vivo* com os antídotos atropina e pralidoxima na WHBP, o que poderia auxiliar na interpretação dos resultados.

Nossa hipótese inicial de que os resultados do quimiorreflexo e do barorreflexo seriam reproduzidos na WHBP foi comprovada por nossos experimentos. Já a nossa hipótese de que os tratamentos com ATR e 2-PAM não seriam capazes de reverter os efeitos do CPF sobre esses reflexos foi refutada. Entretanto, nossos resultados não refutam a hipótese de que o quimiorreflexo pode ser um fator de maior importância para mortalidade clínica. Como previamente discutido, a pralidoxima tem sido caso de debate na comunidade científica quanto a eficácia de seu uso. O fato é que existe uma grande variabilidade de resposta clínica, quanto a toxicidade e eficácia da pralidoxima para os diferentes tipos de organofosforados. Todavia, o

CPF parece apresentar uma melhor resposta clínica ao tratamento com 2-PAM (EDDLESTON et al., 2005). Autores têm ligado essas diferenças de toxicidade e respostas a 2-PAM aos tempos de envelhecimento enzimático dos diferentes compostos OFs. Porém, nem sempre essa relação entre atividade enzimática e quadro clínico se mostra verdadeira (EDDLESTON et al., 2005). O nosso trabalho vem no sentido de complementar essas informações, mostrando que mesmo em uma dose ineficaz para restaurar as atividades enzimáticas, haja visto que 24h após os tratamentos tanto a BuChE plasmática quanto as AChEs cerebrais se encontravam inibidas, o tratamento com pralidoxima foi capaz de restaurar ou atenuar os efeitos sobre as respostas do quimiorreflexo, que se encontravam prejudicadas pela intoxicação com CPF. Com isso, é possível que essas respostas clínicas variadas ao uso de 2-PAM, possam também perspassar pela sua capacidade de restaurar ou não as respostas quimiorreflexas para os diferentes compostos OFs. Para se comprovar essa nova hipótese é necessário submeter ao mesmo protocolo *in vivo* um composto OF que sabidamente apresente uma resposta clínica inferior à pralidoxima, como é o caso do dimetoato.

Com isso nós concluimos que apesar de toda controvérsia acerca do uso clínico da pralidoxima, esta é indicada para os protocolos de tratamento nos casos de intoxicação por clorpirifós, adicionando-se as devidas ressalvas pelo fato de se tratar de um estudo experimental.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

As alterações provocadas pela exposição ao composto organofosforado clorpirifós sobre a atividade dos reflexos neurais: barorreflexo e quimiorreflexo, podem exercer um papel importante na maior incidência de doenças cardiovasculares de pacientes intoxicados. Os prejuízos da resposta reflexa do quimiorreflexo provavelmente exerce papel importante na mortalidade associada à hipóxia de pacientes intoxicados por organofosforados, tanto na crise colinérgica aguda quanto na síndrome intermediária. Além disso, as alterações sobre o padrão de disparo da fase pós-inspiratória do nervo laríngeo recorrente podem também contribuir para a geração do estado de hipóxia em paciente na fase intermediária.

Contradizendo nossa hipótese inicial, os tratamentos com 2-PAM e ATR foram capazes de atenuar ou reverter os prejuízos induzidos pela intoxicação com CPF. Como a pralidoxima foi capaz de reverter os prejuízos das respostas pressora e taquipneica do quimiorreflexo, porém não foi capaz de reativar a atividade das enzimas AChE no tronco encefálico nem nos principais núcleos do controle da função cardiorespiratória, nós acreditamos que os efeitos do CPF sobre a atividade do quimiorreflexo sejam preferencialmente periféricos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABIFINA. **Defensivos Agrícolas.** Disponível em: <<http://www.abifina.org.br/noticiaSecao.asp?secao=1¬icia=76>>. Acesso em: 7 maio. 2014.
- ADAMS, G. K.; YAMAMURA, H. I.; O'LEARY, J. F. Recovery of central respiratory function following anticholinesterase intoxication. **European journal of pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 101–12, jul. 1976.
- AGHABIKLOOEI, A. et al. Does organophosphate poisoning cause cardiac injury? **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 26, n. 6, p. 1247–50, nov. 2013.
- ANAND, S. et al. Cardiac abnormalities in acute organophosphate poisoning. **Clinical toxicology**, v. 47, n. 3, p. 230–5, mar. 2009.
- ANTHON, A. A. Chlorpyrifos induces hypertension in rats. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, v. 3, n. 12, p. 304–308, 2 nov. 2011.
- ANVISA. **C20 – Clorpirifós.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b822400047458d519692d63fbc4c6735/C20++Clorpirifós.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 9 maio. 2014.
- ARAÚJO, A. J. DE et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115–130, mar. 2007.
- ARMSTRONG, R. A. Review article What causes alzheimer's disease? **Folia Neuropathologica**, v. 3, n. 3, p. 169–188, 2013.
- BAINTON, C. R. et al. Respiratory modulation of sympathetic activity. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 12, n. 1, p. 77–90, 1985.
- BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. **Advances in clinical chemistry**, v. 38, p. 151–216, jan. 2004.
- BANDAY, T. H. et al. Predictors of Morbidity and Mortality in Organophosphorus

Poisoning: A Case Study in Rural Hospital in Karnataka, India. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 259–265, 2015.

BARROS, R. C. H. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 97, n. 2, p. 110–115, 2002.

BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration Physiology**, v. 10, n. 3, p. 384–395, 1970.

BBC. Syria “chemical attack”: Turkey says tests confirm Sarin was used. **BBC Middle East**, 2017.

BEDOR, C. N. G. et al. Vulnerabilidades e situações de riscos relacionados ao uso de agrotóxicos na fruticultura irrigada. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 12, n. 1, p. 39–49, mar. 2009.

BIRD, S. B.; GASPARI, R. J.; DICKSON, E. W. Early death due to severe organophosphate poisoning is a centrally mediated process. **Academic Emergency Medicine**, v. 10, n. 4, p. 295–298, 2003.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 73–89, mar. 2007.

BOMSER, J. A; CASIDA, J. E. Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. **Toxicology letters**, v. 119, n. 1, p. 21–6, 3 fev. 2001.

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

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre agrotóxicos, seus componentes e afins. **Diário oficial da união**, p. 11459–11460, 12 jul. 1989.

BRAUN, S. R. 43 - Respiratory Rate and Pattern. In: **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. [s.l.] Butterworths, 1990. p. 226–230.

BUCKLEY, N. A. et al. Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 2, p. CD005085, jan. 2011.

CAO, C. et al. Bortezomib-Contained Chemotherapy and Thalidomide Combined

With CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone) Play Promising Roles in Plasmablastic Lymphoma: A Case Report and Literature Review. **Clinical lymphoma, myeloma & leukemia**, v. 14, n. 5, p. e145-50, out. 2014.

CAREY, J. L.; DUNN, C.; GASPARI, R. J. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 189, n. 2, p. 403–410, 2013.

CASTRO, B. M. DE. **Funções motoras em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina (vacht)**. 2006. 57 f.: Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Departamento de Farmacologia, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

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

CENTRO TOXICOLÓGICO DO ESPÍRITO SANTO - TOXCEN. **Dados epidemiológicos 2012**. Disponível em: <http://www.saude.es.gov.br/download/sinitox_2012.pdf>. Acesso em: 5 out. 2014.

CHAN, J. Y. H. et al. Phasic cardiovascular responses to mevinphos are mediated through differential activation of cGMP/PKG cascade and peroxynitrite via nitric oxide generated in the rat rostral ventrolateral medulla by NOS I and II isoforms. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 1, p. 161–72, jan. 2005.

CICCHETTI, F. et al. Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. **Brain research. Brain research reviews**, v. 34, n. 1–2, p. 80–101, nov. 2000.

CRANE, A. L. et al. Effect of CYP2B6*6 and CYP2C19*2 genotype on chlorpyrifos metabolism. **Toxicology**, v. 293, n. 1–3, p. 115–22, 11 mar. 2012.

CRESTANI, C. C. et al. Role of the bed nucleus of the stria terminalis in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 12, n. 3, p. 268–78, maio 2009.

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

DE BLEECKER, J. L. The intermediate syndrome in organophosphate poisoning: an overview of experimental and clinical observations. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 33, n. 6, p. 683–6, 1995.

DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 180–186, fev. 2004.

DICK, T. E. et al. Cardio-respiratory coupling depends on the pons. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 168, n. 1–2, p. 76–85, ago. 2009.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of applied toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15–23, 2001.

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid)procedure. **Clinical chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1309–13, nov. 1973.

DOW AGROSCIENCES, . **Lorsban*: Saiba mais ...** Disponível em: <<http://www.dowagro.com/br/lorsban/feature.htm>>. Acesso em: 9 maio. 2014.

DRORBAUGH, J. E.; FENN, W. O. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 81–7, jul. 1955.

DUTSCHMANN, M.; PATON, J. F. R. Inhibitory synaptic mechanisms regulating upper airway patency. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 131, n. 1–2, p. 57–63, 2002.

EDDLESTON, M. et al. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. **QJM**, v. 95, n. 5, p. 275–83, maio 2002.

EDDLESTON, M. et al. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. **Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1452–9, 22 jan. 2005.

EDDLESTON, M. et al. Respiratory failure in acute organophosphorus pesticide self-poisoning. **Qjm**, v. 99, n. 8, p. 513–522, 2006.

EDDLESTON, M. et al. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 597–607, 16 fev. 2008.

EDDLESTON, M. et al. Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning - A randomised controlled trial. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 6, p. e1000104, 2009.

ELLMAN, GEORGE L, COURTNEY, K. D.; FRANCISCO, S. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC OF ACETYLCHOLINESTERASE DETERMINATION. **Biochemical pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

EMA. **ATROPINE SUMMARY REPORT**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em: 30 jun. 2017.

EYER, P. et al. Are we using the right dose? - a tale of mole and gram. **British journal of clinical pharmacology**, v. 66, n. 4, p. 451–2, out. 2008.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25–38, mar. 2007.

FERNANDEZ, G. et al. The Baroreflex in Hypertension. **Current hypertension reports**, v. 17, n. 3, p. 19, mar. 2015.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 42, n. 1, p. 63–9, jan. 1993.

GASPARI, R. J.; PAYDARFAR, D. Pathophysiology of respiratory failure following acute dichlorvos poisoning in a rodent model. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 3, p. 664–71, 2007.

GASPARI, R. J.; PAYDARFAR, D. Dichlorvos-induced central apnea: Effects of selective brainstem exposure in the rat. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 2, p. 206–214, 2011.

GASPARI, R. J.; PAYDARFAR, D. Respiratory recovery following organophosphate poisoning in a rat model is suppressed by isolated hypoxia at the point of apnea. **Toxicology**, v. 302, n. 2–3, p. 242–247, 16 dez. 2012.

GOLD, P. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 194–210, nov. 2003a.

GOLD, P. Acetylcholine: Cognitive and brain functions. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 177, nov. 2003b.

GOLDER, F. J. et al. Breathing patterns after mid-cervical spinal contusion in rats. **Experimental neurology**, v. 231, n. 1, p. 97–103, set. 2011.

GONÇALVES, A. D. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos**. 2009. 168 f.: Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GUPTA, R. C. (ED.). **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**. 1st. ed. United States of America: Academic Press, 2006.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.

HERMANSEN, K. Diet, blood pressure and hypertension. **The British journal of nutrition**, v. 83 Suppl 1, p. S113-9, 2000.

HOAGLIN, D. C.; IGLEWICZ, B. Fine-Tuning Some Resistant Rules for Outlier Labeling. **Journal of the American Statistical Association**, v. 82, n. 400, p. 1147, dez. 1987.

HULSE, E. J. et al. Respiratory complications of organophosphorus nerve agent and insecticide poisoning. Implications for respiratory and critical care. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 190, n. 12, p. 1342–54, 15 dez. 2014.

HUNG, D. Z. et al. The long-term effects of organophosphates poisoning as a risk factor of CVDs: A nationwide population-based cohort study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.

IDAF. **Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo - Produtos agrotóxicos cadastrados no Idaf, conforme Lei 5.760 e Decreto 024-R**. Disponível em: <http://www.idaf.es.gov.br/ddsiv/sifv/formularios/wfDSIV_Relatorio_ProdutosSimplificadoNet.pdf>. Acesso em: 9 maio. 2014.

IKEDA, K. et al. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 67, n. 1, p. 45–62, jan. 2017.

ITURRIAGA, R.; OYARCE, M. P.; DIAS, A. C. R. Role of Carotid Body in Intermittent Hypoxia-Related Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 5, p. 38,

2017.

JAYAWARDANE, P. et al. The Spectrum of Intermediate Syndrome Following Acute Organophosphate Poisoning: A Prospective Cohort Study from Sri Lanka. 2008.

JAYAWARDANE, P. et al. Electrophysiological correlates of respiratory failure in acute organophosphate poisoning: evidence for differential roles of muscarinic and nicotinic stimulation. **Clinical toxicology**, v. 50, n. 4, p. 250–3, abr. 2012.

JEYARATNAM, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales**, v. 43, n. 3, p. 139–44, jan. 1990.

JOHN, M.; OOMMEN, A.; ZACHARIAH, A. Muscle injury in organophosphorous poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 43–53, jan. 2003.

JOHNSON, M. K. et al. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. **Emergency Medicine Australasia**, v. 12, n. 1, p. 22–37, 6 mar. 2000.

KAKINUMA, Y. et al. A Non-Neuronal Cardiac Cholinergic System Plays a Protective Role in Myocardium Salvage during Ischemic Insults. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–13, 2012.

KALÁSZ, H. et al. Analysis of pralidoxime in serum, brain and CSF of rats. **Medicinal chemistry**, v. 5, p. 237–241, 2009.

KARA, T. et al. Chemoreflexes – physiology and clinical implications. p. 377–384, 2003.

KARA, T.; NARKIEWICZ, K.; SOMERS, V. K. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 3, p. 377–84, mar. 2003.

KARALLIEDDE, L.; BAKER, D.; MARRS, T. C. **Organophosphate-induced intermediate syndrome: Aetiology and relationships with myopathy** *Toxicological Reviews*, 2006.

KARKI, P. et al. Cardiac and electrocardiographical manifestations of acute organophosphate poisoning. **Singapore medical journal**, v. 45, n. 8, p. 385–9, ago. 2004.

KARLEN-AMARANTE, M. et al. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism: Clinical and**

Experimental, v. 61, n. 10, p. 1435–1442, 2012.

KHOKHAR, J. Y.; TYNDALE, R. F. Rat brain CYP2B-enzymatic activation of chlorpyrifos to the oxon mediates cholinergic neurotoxicity. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 126, n. 2, p. 325–35, abr. 2012.

KLEIN-RODEWALD, T. et al. Central respiratory effects on motor nerve activities after organophosphate exposure in a working heart brainstem preparation of the rat. **Toxicology letters**, v. 206, n. 1, p. 94–9, 25 set. 2011.

KLEIN, H. et al. Q-T Prolongation and Polymorphous Insecticide Poisoning Ventricular Arrhythmias Associated With Organophosphorus. **The American Journal of Cardiology**, v. 49, n. May, p. 1654–1658, 1982.

KLING, J. M.; CLARKE, B. L.; SANDHU, N. P. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. **Journal of women's health**, v. 23, n. 7, p. 563–72, 10 jul. 2014.

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

KOSE, A.; GUNAY, N.; YILDIRIM, C. Cardiac damage in acute organophosphate poisoning in rats: Effects of atropine and pralidoxime ☆. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 27, n. 2, p. 169–175, 2009.

LAI, J. et al. RT-PCR reveals muscarinic acetylcholine receptor mRNA in the pre-Bötzing complex. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 281, n. 6, p. L1420-4, dez. 2001.

LARINI, L. Inseticidas Organossintéticos: Organofosforados. In: **Toxicologia dos Praguicidas**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 47–72.

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

LAVADO, R.; SCHLENK, D. Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 101, n. 1, p. 57–63, 17 jan. 2011.

LEUSCH, A. et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of the anticholinergics

tiotropium and ipratropium in the rat and dog. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 22, n. 5, p. 199–212, jul. 2001.

LEWARTOWSKI, B.; MACKIEWICZ, U. The non-neuronal heart's acetylcholine in health and disease. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 6, p. 773–778, 2015.

LONDON, L. et al. **Suicide and exposure to organophosphate insecticides: Cause or effect?** **American Journal of Industrial Medicine**, 2005.

LORKE, D. E. et al. Entry of oximes into the brain: a review. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 8, p. 743–753, 2008.

LUDOMIRSKY, A. et al. Q-T prolongation and polymorphous (“torsade de pointes”) ventricular arrhythmias associated with organophosphorus insecticide poisoning. **The American journal of cardiology**, v. 49, n. 7, p. 1654–8, maio 1982.

LUTFI, M. F. The physiological basis and clinical significance of lung volume measurements. **Multidisciplinary respiratory medicine**, v. 12, p. 3, 2017.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 940, p. 179–96, jun. 2001.

MARABLE, B. R. et al. Differential sensitivity of blood, peripheral, and central cholinesterases in beagle dogs following dietary exposure to chlorpyrifos. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 240–8, abr. 2007.

MARETTO, G. X. et al. Acute exposure to the insecticide O,S-dimethyl phosphoramidothioate (methamidophos) leads to impairment of cardiovascular reflexes in rats. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 80, p. 203–7, jun. 2012.

MARTY, M. S. et al. Cholinesterase inhibition and toxicokinetics in immature and adult rats after acute or repeated exposures to chlorpyrifos or chlorpyrifos-oxon. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 209–24, jul. 2012.

MEYRELLES, S. S. et al. Cardiac baroreflex properties in myocardial infarcted rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 60, n. 3, p. 163–8, 12 set. 1996.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Agentes Tóxicos contaminantes indiretos de alimentos: Praguicidas. In: **Toxicologia de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2000. p. 189–219.

MISU, Y. et al. **Neurobiology of L-DOPAergic systems** *Progress in Neurobiology*, 1996.

MOLKOV, Y. I. et al. Physiological and pathophysiological interactions between the respiratory central pattern generator and the sympathetic nervous system. **Progress in Brain Research**, v. 212, n. C, p. 1–23, 2014.

MORAGAS, W.; SCHNEIDER, M. DE O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 3, n. 10, p. 26–40, 2003.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 2, p. 299–311, 2002.

MORTOLA, J. P.; FRAPPELL, P. B. On the barometric method for measurements of ventilation, and its use in small animals. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 76, n. 10–11, p. 937–944, 1998.

MUNIDASA, U. A. D. D. et al. Survival pattern in patients with acute organophosphate poisoning receiving intensive care. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 42, n. 4, p. 343–7, 2004.

MUNRO, N. Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB, and VX: implications for public protection. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. 1, p. 18–38, jan. 1994.

NARKIEWICZ, K. et al. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. **Circulation**, v. 99, n. 9, p. 1183–1189, 1999.

NURSE, C. A. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. **Experimental physiology**, v. 95, n. 6, p. 657–67, jun. 2010.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. **The Journal of physiology**, v. 592, n. Pt 16, p. 3419–26, 15 ago. 2014.

NURSE, C. A; PISKURIC, N. A. Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 24, n. 1, p. 22–30, jan. 2013.

OLSON, K. R. Inseticidas de carbamato e organofosforados. In: OLSON, K. R. (Ed.). **Manual de Toxicologia Clínica**. 6. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. p. 285–292.

PATON, J. F. A working heart-brainstem preparation of the mouse. **Journal of neuroscience methods**, v. 65, n. 1, p. 63–8, mar. 1996.

PATON, J. F. R.; DUTSCHMANN, M. Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. **Journal of Anatomy**, v. 201, n. 4, p. 319–323, 2002.

PATON, J. F. R.; NOLAN, P. J. Similarities in reflex control of laryngeal and cardiac vagal motor neurones. **Respiration Physiology**, v. 119, n. 2–3, p. 101–111, 2000.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Compact 6t ed. [s.l.] Academic Press, 2009.

PELAEZ, V. **2º Seminário Mercado de Agrotóxicos e Regulação**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/men+u+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrotoxicos+em+2012>>. Acesso em: 9 jun. 2014.

PERSSON, P. B. Baroreflexes in hypertension: a mystery revisited. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1095–6, nov. 2005.

PETER, J. V; MORAN, J. L.; GRAHAM, P. Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. **Critical care medicine**, v. 34, n. 2, p. 502–10, fev. 2006.

POWER, A. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 80, n. 3, p. 178–193, nov. 2003.

PRABHAKAR, N. R. Carotid body chemoreflex: a driver of autonomic abnormalities in sleep apnoea. **Experimental physiology**, v. 101, n. 8, p. 975–85, 1 ago. 2016.

PRABHAKAR, N. R.; PENG, Y.-J. Peripheral chemoreceptors in health and disease. **Journal of applied physiology**, v. 96, n. 1, p. 359–66, jan. 2004.

QUIN, L. D. **A Guide to Organophosphorus Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2000.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Increased morbidity and mortality in acute human organophosphate-poisoned patients treated by oximes: a meta-analysis of clinical trials. **Human & experimental toxicology**, v. 25, n. 3, p. 157–62, mar. 2006.

RAISMAN, G.; COWAN, W. M.; POWELL, T. P. An experimental analysis of the

efferent projection of the hippocampus. **Brain : a journal of neurology**, v. 89, n. 1, p. 83–108, mar. 1966.

REISS, R. et al. Acetylcholinesterase inhibition dose-response modeling for chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 124–31, jun. 2012.

RICHTER, D. W.; SPYER, K. M. Cardiorespiratory Control. In: LOEWY, A. D.; SPYER, K. M. (Eds.). . **Central Regulation of Autonomic Functions**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1990. p. 189–203.

RICHTER, D. W.; SPYER, K. M. Studying rhythmogenesis of breathing: Comparison of in vivo and in vitro models. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 8, p. 464–472, 2001.

ROCHA-RESENDE, C. et al. Non-neuronal cholinergic machinery present in cardiomyocytes offsets hypertrophic signals. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 53, n. 2, p. 206–216, 2012.

ROSENTHAL, T.; ALTER, A. Occupational stress and hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 6, n. 1, p. 2–22, 2012.

ROTH, A. et al. Organophosphates and the heart. **Chest**, v. 103, n. 2, p. 576–82, fev. 1993.

SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, n. May 2008, 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.

SALMAN, I. M. **Major Autonomic Neuroregulatory Pathways Underlying Short- and Long-Term Control of Cardiovascular Function** **Current Hypertension Reports**, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838031>>. Acesso em: 16 jun. 2016

SANTOS, V. M. R. DOS et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159–170, fev. 2007.

SAPRU, H. N. Experimental Biology 2001 Symposium Neurotransmitters and Cardiovascular Regulation GLUTAMATE CIRCUITS IN SELECTED MEDULLO-SPINAL AREAS REGULATING CARDIOVASCULAR FUNCTION. n. January, p. 491–496, 2002.

SARTER, M.; PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 1, p. 48–56, jan. 2005.

SCARR, E. et al. Cholinergic connectivity: it's implications for psychiatric disorders. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, p. 55, 2 jan. 2013.

SCHULTZ, H. D.; LI, Y. L. Carotid body function in heart failure. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 157, n. 1, p. 171–85, 1 jul. 2007.

SEAG. **SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, ABASTECIMENTO, AQUICULTURA E PESCA**. Disponível em: <<http://www.seag.es.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 10 maio. 2014.

SHAH, S. D. et al. Case series of organophosphorus-induced polyneuropathy. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 19, n. 4, p. 530–531, 2016.

SHAO, X. M. et al. Alpha4* nicotinic receptors in preBotzinger complex mediate cholinergic/nicotinic modulation of respiratory rhythm. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 2, p. 519–28, 9 jan. 2008.

SHAO, X. M.; FELDMAN, J. L. Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in preBöttinger complex inspiratory neurons. **Journal of neurophysiology**, v. 83, n. 3, p. 1243–52, mar. 2000.

SHAO, X. M.; FELDMAN, J. L. Pharmacology of nicotinic receptors in preBöttinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. **Journal of neurophysiology**, v. 88, n. 4, p. 1851–8, out. 2002.

SHAO, X. M.; FELDMAN, J. L. Cholinergic neurotransmission in the preBöttinger Complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm. **Neuroscience**, v. 130, n. 4, p. 1069–81, 2005.

SIECK, G. C. et al. Mechanical properties of respiratory muscles. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 4, p. 1533–1567, out. 2013.

SILVA, G. R. et al. Defesa química: histórico, classificação dos agentes de guerra e ação dos neurotóxicos. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2083–2091, 2012.

SMITH, E. C.; PADNOS, B.; CORDON, C. J. Peripheral versus central muscarinic effects on blood pressure, cardiac contractility, heart rate, and body temperature in the rat monitored by radiotelemetry. **Pharmacology & toxicology**, v. 89, n. 1, p. 35–42, jul. 2001.

SOUZA, G. M. P. R. et al. Inspiratory modulation of sympathetic activity is increased in female rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 11, p. 1345–1358, 1 nov. 2016.

SPYER, K. M. The Central Nervous Organization of Reflex Circulatory Control. In: LOEWY, ARTHUR D.; SPYER, K. M. (Ed.). . **Central regulation of autonomic functions**. 1st. ed. New York: Oxford University Press, 1990. p. 168–188.

SPYER, K. M.; GOURINE, A. V. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 364, n. 1529, p. 2603–10, 12 set. 2009.

STEINRITZ, D. et al. Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. **Toxicology Letters**, v. 206, n. 1, p. 77–83, 2011.

TANG, W. et al. Independent Prognostic Factors for Acute Organophosphorus Pesticide Poisoning. **Respiratory Care**, v. 61, n. 7, p. 965–970, 2016.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Advances in physiology education**, v. 35, n. 1, p. 28–32, 2011.

TOLEDO-IBARRA, G. A.; ROJAS-MAYORQUÍN, A. E.; GIRÓN-PÉREZ, M. I. Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: potential model in biomedical research. **Clinical & developmental immunology**, v. 2013, p. 536534, jan. 2013.

TOY, A. D. F. **Phosphorus chemistry in everyday living**. 1 st ed. Michigan: American Chemical Society, 1976.

VASQUEZ, E. C. et al. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: Interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 521–532, 1997.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145–152, mar. 2007.

WATT, J. G.; DUMKE, P. R.; COMROE, J. H. EFFECTS OF INHALATION OF 100 PER CENT AND 14 PER CENT OXYGEN UPON RESPIRATION OF UNANESTHETIZED DOGS BEFORE AND AFTER CHEMORECEPTOR DENERVATION. **American Journal of Physiology**, v. 138, n. 4, 1943.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British journal of pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1558–71, 2008.

WOLK, R.; SHAMSUZZAMAN, A. S. M.; SOMERS, V. K. Obesity, Sleep Apnea, and Hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1067–1074, 1 dez. 2003.

WOREK, F. et al. **Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat***Archives of Toxicology*Springer Berlin Heidelberg, , 27 set. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00204-016-1772-1>>. Acesso em: 21 nov. 2016

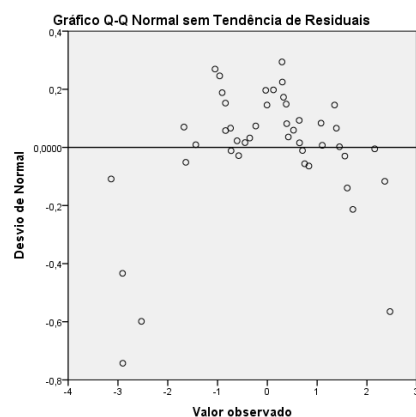
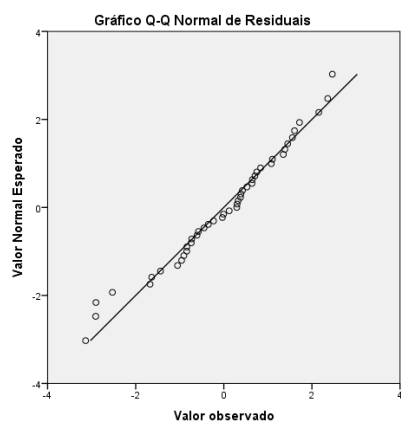
YANG, C.-C.; DENG, J.-F. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. **Journal of the Chinese Medical Association : JCMA**, v. 70, n. 11, p. 467–72, nov. 2007.

ZOCCAL, D. B. et al. The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 238, 2014.

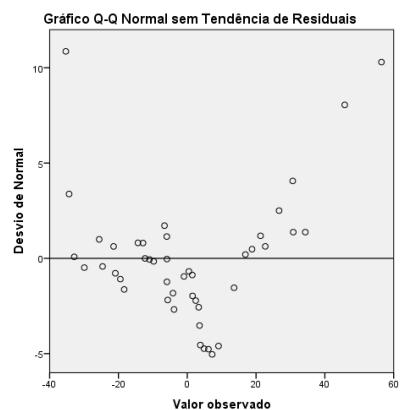
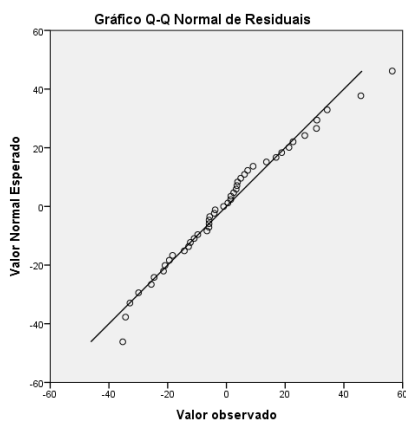
ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Coupling Between Respiratory and Sympathetic Activities as a Novel Mechanism Underpinning Neurogenic Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 13, n. 3, p. 229–236, 30 jun. 2011.

ZOCCAL, D. B.; PATON, J. F.; MACHADO, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 12, p. 1188–1196, dez. 2009.

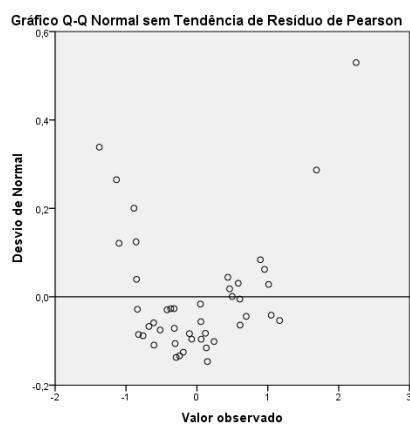
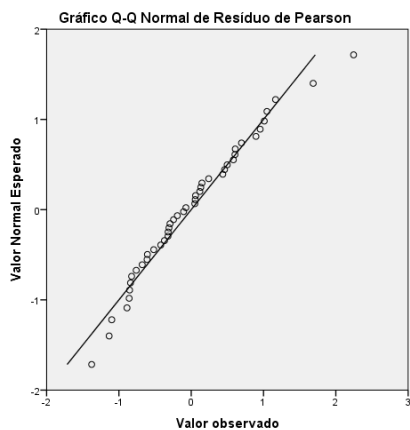
Anexo



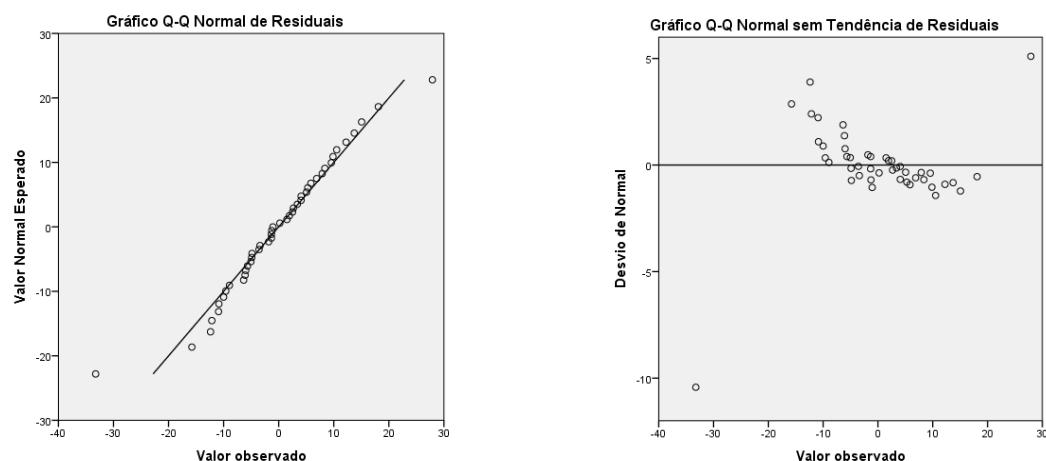
Anexo 1: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear misto para resposta pressora frente ativação do quimiorreflexo na WHBP.



Anexo 2: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear misto para % de simpatoexcitação frente ativação do quimiorreflexo na WHBP.



Anexo 3: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo misto generalizado para a taxa de disparo do nervo frênico frente ativação do quimiorreflexo na WHBP.



Anexo 4: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear misto para a resposta bradicárdica frente a ativação do quimiorreflexo na WHBP.

Testes de efeitos entre assuntos

Variável dependente: PAM BASAL, R Quadrado = 0,351 (R Quadrado Ajustado = 0,272).

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Modelo corrigido	1655,059 ^a	7	236,437	4,475	0,000
Interceptação	669646,700	1	669646,700	12673,191	0,000
CPF	517,206	1	517,206	9,788	0,003
ATR	541,531	1	541,531	10,249	0,002
Pralidoxima	6,346	1	6,346	0,120	0,730
CPF * ATR	24,148	1	24,148	0,457	0,502
CPF * Pralidoxima	162,361	1	162,361	3,073	0,085
ATR * Pralidoxima	342,725	1	342,725	6,486	0,014
CPF * ATR * Pralidoxima	0,418	1	0,418	0,008	0,929
Erro	3064,698	58	52,840		
Total	692200,000	66			
Total corrigido	4719,758	65			

Anexo 5: Tabela de efeitos gerado pelo modelo linear geral (GLM) para pressões arteriais médias basais no experimento *in vivo*.

Testes de efeitos entre assuntos

Variável dependente: FC BASAL, R Quadrado = 0,251 (R Quadrado Ajustado = 0,161).

Origem	Tipo III Soma dos Quadrados	gl	Quadrado Médio	Z	Sig.
Modelo corrigido	22076,677 ^a	7	3153,811	2,777	0,015
Interceptação	7509726,944	1	7509726,944	6612,902	0,000
CPF	11033,473	1	11033,473	9,716	0,003
ATR	245,464	1	245,464	0,216	0,644
Pralidoxima	11,129	1	11,129	0,010	0,921
CPF * ATR	6972,587	1	6972,587	6,140	0,016
CPF * Pralidoxima	5174,655	1	5174,655	4,557	0,037
ATR * Pralidoxima	71,199	1	71,199	0,063	0,803
CPF * ATR * Pralidoxima	4,292	1	4,292	0,004	0,951
Erro	65865,808	58	1135,617		
Total	7769310,000	66			
Total corrigido	87942,485	65			

Anexo 6: Tabela de efeitos gerado pelo modelo linear geral (GLM) para frequências cardíacas basais no experimento *in vivo*.

Gráfico Q-Q Normal de Resíduo Padronizado para PAM_BASAL

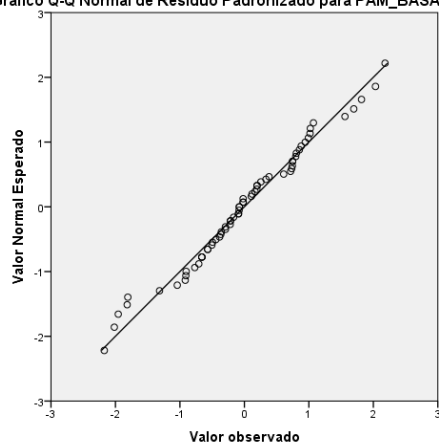
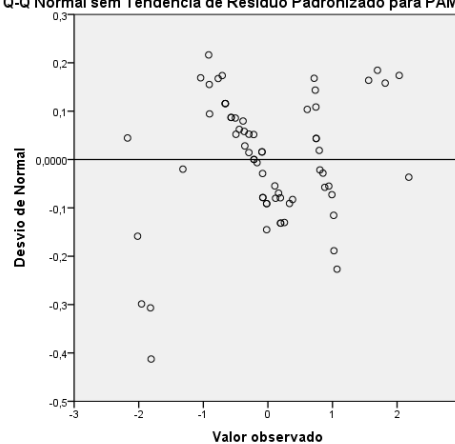


Gráfico Q-Q Normal sem Tendência de Resíduo Padronizado para PAM_BASAL



Anexo 7: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear geral (GLM) das pressões arteriais médias basais no experimento *in vivo*.

Gráfico Q-Q Normal de Resíduo Padronizado para FC_BASAL

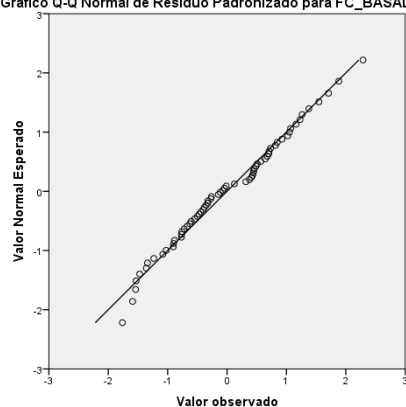
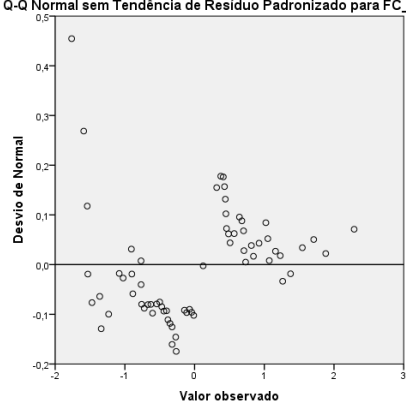
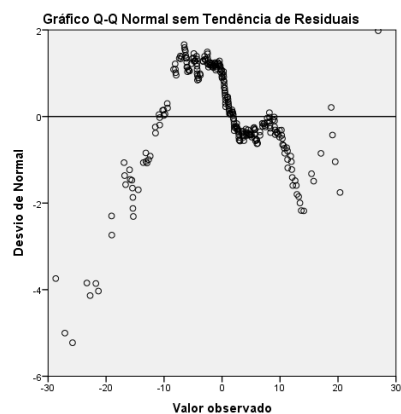
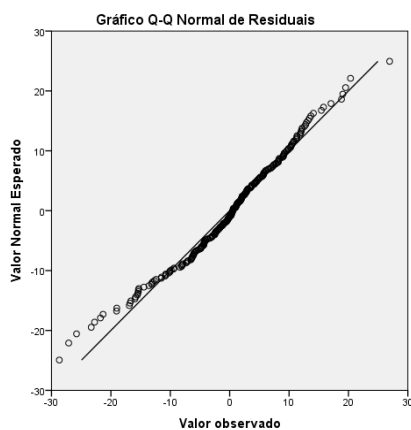


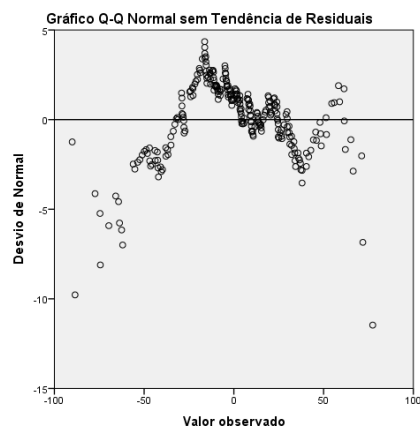
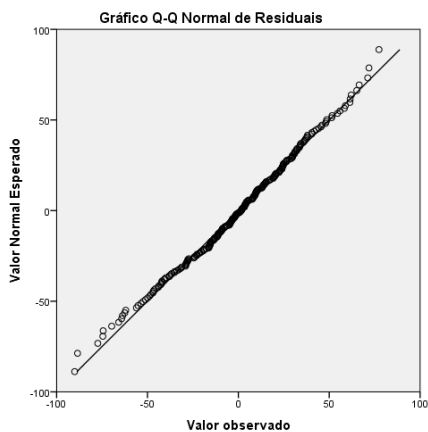
Gráfico Q-Q Normal sem Tendência de Resíduo Padronizado para FC_BASAL



Anexo 8: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear geral (GLM) das frequências cardíacas basais no experimento *in vivo*.



Anexo 9: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear misto da resposta pressora do quimiorreflexo no experimento *in vivo*. A análise mostra a não normalidade dos resíduos.



Anexo 10: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo linear misto da resposta bradicárdica do quimiorreflexo no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: ΔFC Testes tipo III de efeitos fixos^a

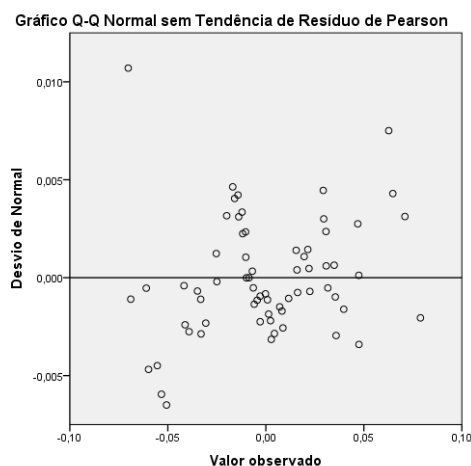
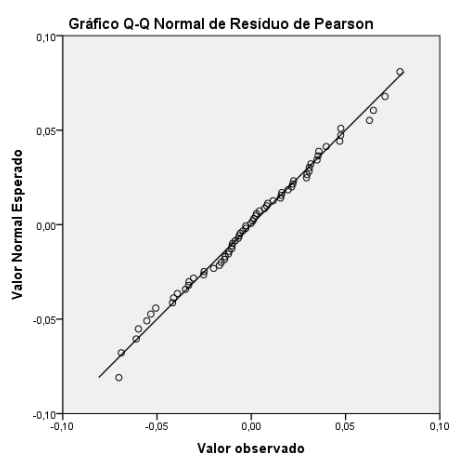
Origem	Numerador gl	Denominador gl	Z	Sig.
Interceptação	1	0,000	1727,588	1,000
KCN	3	174	302,118	0,0001
CPF	1	58	1,093	0,300
Atropina	1	58	0,022	0,881
Pralidoxima	1	58	0,151	0,699
KCN * CPF	3	174	1,467	0,225
KCN * Atropina	3	174	1,054	0,370
KCN * Pralidoxima	3	174	1,785	0,152
CPF * Atropina	1	58,000	7,330	0,009
CPF * Pralidoxima	1	58,000	1,535	0,220
Atropina * Pralidoxima	1	58	0,313	0,578
KCN * CPF * Atropina	3	174	3,473	0,017
KCN * CPF * Pralidoxima	3	174	0,532	0,661
KCN * Atropina *	3	174	1,171	0,322
Pralidoxima				
CPF * Atropina *	1	58,000	0,331	0,568
Pralidoxima				
KCN * CPF * Atropina *	3	174	1,239	0,297
Pralidoxima				

Anexo 11: Tabela de efeitos fixos gerado pelo modelo linear misto para a resposta bradicárdica frequências do quimiorreflexo no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: V_T Testes tipo III de efeitos fixos^a

Origem	F	gl	gl	Sig.
Modelo corrigido	1,798	7	57	0,105
CPF	0,095	1	57	0,759
ATR	0,893	1	57	0,349
Pralidoxima	0,004	1	57	0,950
CPF * ATR	2,749	1	57	0,103
CPF * Pralidoxima	0,682	1	57	0,412
ATR * Pralidoxima	6,360	1	57	0,014
CPF * ATR * Pralidoxima	2,356	1	57	0,130

Anexo 12: Tabela de efeitos fixos gerado pelo modelo misto generalizado para o volume corrente basal no experimento *in vivo*.

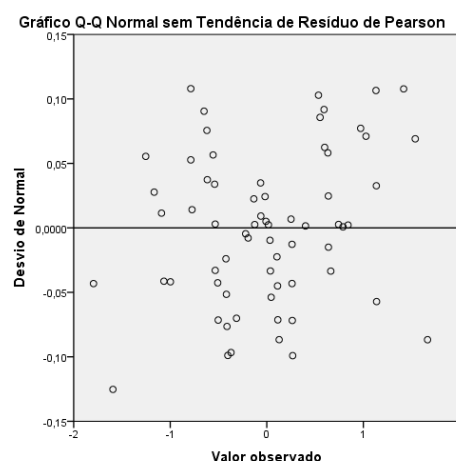
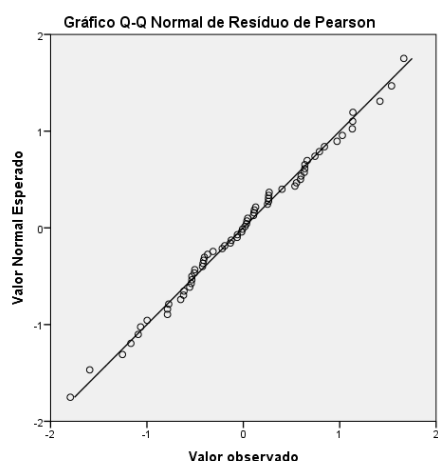


Anexo 13: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo misto generalizado do volume corrente no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: V_E Testes tipo III de efeitos fixos^a

Origem	F	<i>gl</i>	<i>gl</i>	Sig.
Modelo corrigido	2,813	7	58	0,014
CPF	3,800	1	58	0,056
ATR	6,524	1	58	0,013
Pralidoxima	0,130	1	58	0,719
CPF * ATR	3,519	1	58	0,066
CPF * Pralidoxima	0,395	1	58	0,532
ATR * Pralidoxima	3,621	1	58	0,062
CPF * ATR * Pralidoxima	0,811	1	58	0,372

Anexo 14: Tabela de efeitos fixos gerado pelo modelo misto generalizado para o volume minuto basal no experimento *in vivo*.



Anexo 15: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo misto generalizado do volume minuto no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: fR **Testes de efeitos de modelo**

Origem	Tipo III		
	Wald- χ^2	gl	P
(Intercept)	36901,265	1	0,0001
CPF	6,782	1	0,009
ATR	4,219	1	0,040
PAM	0,768	1	0,381
Tempo	292,861	9	0,0001
CPF * ATR	0,190	1	0,663
CPF * PAM	0,130	1	0,719
CPF * Tempo	8,554	9	0,479
ATR * PAM	0,011	1	0,918
ATR * Tempo	8,452	9	0,489
PAM * Tempo	13,563	9	0,139
CPF * ATR * PAM * Tempo	191,679	37	0,0001

Anexo 16: Tabela de efeitos gerado pelo modelo linear generalizado para a frequência respiratória basal no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: fR **Tests of Model Effects**

Origem	Tipo III		
	Wald- χ^2	gl	P
(Intercept)	161822,760	1	0,0001
CPF	23,775	1	0,0001
ATR	1,340	1	0,247
PAM	0,121	1	0,728
KCN	37,785	3	0,0001
Tempo	2464,201	19	0,0001
CPF * ATR	1,231	1	0,267
CPF * PAM	0,593	1	0,441
CPF * Tempo	30,657	19	0,044
CPF * ATR * PAM	7,961	2	0,019
CPF * ATR * PAM * KCN	17,106	21	0,705
CPF * ATR * PAM * Tempo	368,392	114	0,0001

Anexo 17: Tabela de efeitos gerado pelo modelo das equações de estimações generalizadas para a resposta taquipneica do quimiorreflexo no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: BuChE **Testes de efeitos de modelo**

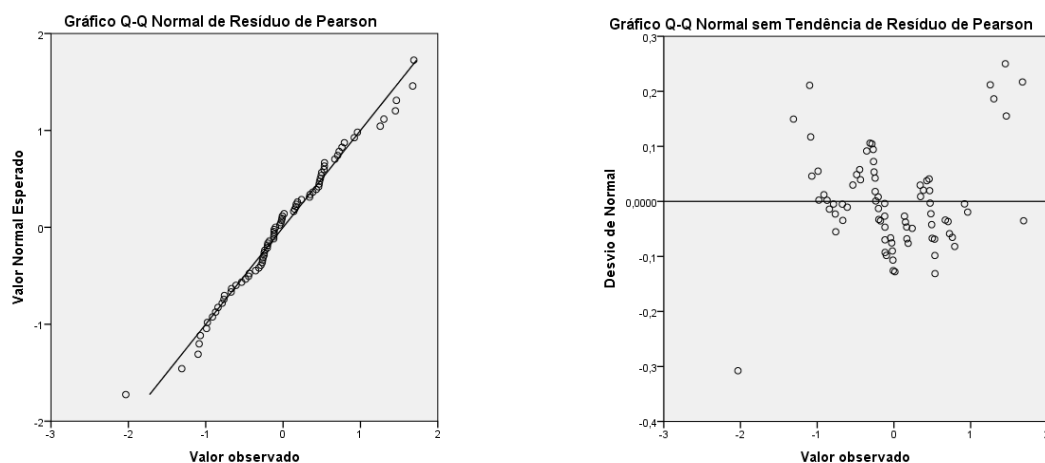
Origem	Tipo III		
	Wald- X^2	gl	P
(Interceptação)	6932,815	1	0,0001
CPF	26,008	1	0,0001
ATR	0,004	1	0,951
PAM	3,979	1	0,046
tempo	56,706	1	0,0001
CPF * ATR	0,550	1	0,458
CPF * PAM	0,010	1	0,920
CPF * tempo	42,356	1	0,0001
ATR * PAM	1,795	1	0,180
ATR * tempo	1,876	1	0,171
PAM * tempo	0,751	1	0,386
CPF * ATR * PAM	3,428	1	0,064
CPF * ATR * tempo	1,188	1	0,276
CPF * PAM * tempo	0,003	1	0,954
ATR * PAM * tempo	0,047	1	0,828
CPF * ATR * PAM * tempo	2,892	1	0,089

Anexo 18: Tabela de efeitos gerado pelo modelo das equações de estimações generalizadas para a atividade da butirilcolinesterase no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: AChE **Testes tipo III de efeitos fixos^a**

Origem	F	gl	gl	Sig.
Modelo corrigido	15,560	7	69	0,0001
CPF	99,427	1	69	0,0001
ATR	2,210	1	69	0,142
Pralidoxima	0,262	1	69	0,611
CPF * ATR	1,115	1	69	0,295
CPF * Pralidoxima	0,523	1	69	0,472
ATR * Pralidoxima	6,108	1	69	0,016
CPF * ATR * Pralidoxima	0,009	1	69	0,925

Anexo 19: Tabela de efeitos gerado pelo modelo misto generalizado para a atividade da acetilcolinesterase do tronco encefálico no experimento *in vivo*.



Anexo 20: QQ-Plot para análise de resíduos do modelo misto generalizado para a atividade da acetilcolinesterase do tronco encefálico no experimento *in vivo*.

Variável Dependente: AChE **Testes tipo III de efeitos fixos^a**

Origem	F	gl	gl	Sig.
Modelo corrigido	17,723	8	31	0,0001
CPF	103,763	1	17	0,0001
Pralidoxima	0,124	1	17	0,729
Núcleos	0,216	2	34	0,807
CPF * Pralidoxima	-	0	-	-
CPF * Núcleos	3,360	2	34	0,047
PAM* Núcleos	0,523	2	34	0,597
CPF * Pralidoxima * Núcleos	-	0	-	-
PAM (CPF)	-	0	-	-

Anexo 21: Tabela de efeitos gerado pelo modelo misto generalizado para a atividade da acetilcolinesterase nos *punchs* de cortes do tronco encefálico contendo os núcleo ambíguo, NTS e RVLM/preBötC .

Anexo 22:



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



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **057/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação dos efeitos tóxicos do pesticida clorpirifós sobre a regulação autonômica cardiovascular na preparação tronco cerebral-coração isolados de ratos."** que tem como responsável o (a) docente **Karla Nívea Sampaio**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 12/12/14.

Vitória (ES), 12 de dezembro de 2014.


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

Anexo 23:

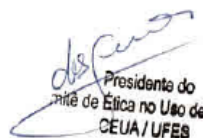


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **058/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação da eficácia do tratamento empregado na intoxicação por pesticidas organofosforados na prevenção de possíveis danos cardiovasculares agudos."** que tem como responsável o (a) docente **Karla Nívea Sampaio**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/11/14.

Vitória (ES), 07 de novembro de 2014.


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

