



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Carla Soares de Lima Prieto

Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: Alterações bioquímicas e comportamentais

Rio de Janeiro

2013

Carla Soares de Lima Prieto

**Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento:
Alterações bioquímicas e comportamentais**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Yael de Abreu Villaça

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

P949 Prieto, Carla Soares de Lima.
Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: alterações bioquímicas e comportamentais / Carla Soares de Lima Prieto. – 2013.
103 f.

Orientadora: Yael de Abreu Vilaça.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Pesticidas - Toxicologia - Teses. 2. Pesticidas - Efeito fisiológico - Teses. 3. Manifestações neurocomportamentais - Teses. 4. Desenvolvimento infantil - Efeito de drogas. 5. Inseticidas organofosforados - Efeitos adversos. I. Yael de Abreu Vilaça. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 632.95.024.391

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carla Soares de Lima Prieto

**Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento:
alterações bioquímicas e comportamentais**

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de maio de 2013

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Yael de Abreu Villaça (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Karin da Costa Calaza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro

2013

AGRADECIMENTOS

A execução deste trabalho não seria possível sem a fundamental participação de uma equipe de colaboradores, que são também amigos e parceiros de todas as horas com os quais eu pude contar ao longo destes quatro anos. Gostaria de agradecer imensamente a contribuição de Ana Carolina Dutra Tavares, que foi colaboradora do projeto desde sua origem, abraçou e se comprometeu com a qualidade dos experimentos e sempre foi um modelo de dedicação. A amiga Fernanda Nunes, que ajudou em todas as etapas do projeto e imprimiu a organização tão necessária aos testes em modelo animal. Ao amigo André Luiz Nunes Freitas pela cega dedicação e compromisso e ao amigo Anderson Ribeiro Carvalho pela abnegação ao trabalho e por tudo que me ensinou desde que eu o conheci.

Gostaria de agradecer a minha família pelo apoio de sempre, o que me deu estrutura e incentivo para a conclusão deste trabalho. Em especial meu pai, Gilson Cândido de Lima; minha mãe, Alice Soares; meu marido, José Ricardo A. M. Prieto.

Agradeço também o apoio, os conselhos, a torcida e as críticas de todos os meus amigos do laboratório e de fora dele, que compõem uma outra família, tão importante quanto a primeira.

À contribuição essencial dos professores Cláudio Carneiro Filgueiras, Alex Christian Manhães e Armando Meyer.

E, finalmente, à orientação da professora Yael de Abreu Villaça que sempre foi pra mim um exemplo de profissional, de eficiência, de trabalho.

RESUMO

PRIETO, Carla Soares de Lima. *Neurotoxicidade de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento: alterações bioquímicas e comportamentais*. 2013. 103 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Pesticidas organofosforados são amplamente usados e seu uso constitui um grave problema de saúde pública. A ação clássica destes compostos é a inibição irreversível da acetilcolinesterase, promovendo acúmulo de acetilcolina nas sinapses e hiperestimulação colinérgica. No entanto, as consequências da exposição a baixas doses podem se estender a outros mecanismos de ação e sistemas neurotransmissores. Considerando que crianças constituem um grupo particularmente vulnerável aos efeitos de pesticidas, neste trabalho investigamos os efeitos da exposição aos organofosforados metamidofós (MET) e clorpirifós (CPF) durante o desenvolvimento sobre os sistemas colinérgico e serotoninérgico e sobre o comportamento de camundongos. Para isso, camundongos suíços foram expostos a injeções subcutâneas de MET, clorpirifós ou veículo do terceiro (PN3) ao nono (PN9) dias de vida pós-natal. As doses de exposição foram previamente escolhidas através da construção de uma curva dose-resposta que identificou como mais adequadas para este estudo as doses de 1mg/kg de MET e 3mg/kg de CPF, as quais promoveram em torno de 20% de inibição da acetilcolinesterase. Em PN10, parte dos animais foi sacrificada e foram avaliados os sistemas colinérgico e serotoninérgico no tronco encefálico e córtex cerebral. De PN60 a PN63, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais. Em seguida, estes animais também foram sacrificados tendo sido avaliados os sistemas colinérgico e serotoninérgico. Em PN10, MET e CPF causaram alterações que sugerem aumento da atividade colinérgica respectivamente no tronco e córtex em fêmeas. No sistema serotoninérgico, apenas CPF promoveu alterações, aumentando a ligação ao receptor 5HT_{1A} e transportador 5HT em fêmeas e diminuindo na ligação ao 5HT₂. Em PN63, a atividade da acetilcolinesterase foi reestabelecida em todos os grupos. Ainda assim, MET diminuiu a atividade da colina acetiltransferase no córtex e a ligação ao transportador colinérgico no tronco. Quanto aos efeitos do CPF, no tronco, houve redução da atividade da colina acetiltransferase em fêmeas e aumento em machos. Sobre o sistema serotoninérgico, MET e CPF promoveram diminuições no 5HT_{1A} respectivamente no tronco e córtex das fêmeas e CPF aumentou a ligação no córtex de machos. A ligação ao 5HT₂ foi aumentada após o tratamento com MET e ao transportador 5HT foi diminuída em fêmeas após o tratamento com clorpirifós. Sobre o comportamento, identificamos comportamento associado à depressão em animais expostos a MET e aumento dos níveis de ansiedade, além de prejuízo de aprendizado/memória após exposição à CPF. Desta forma, nossos resultados indicam que a exposição à metamidofós e clorpirifós durante o desenvolvimento é capaz de alterar, de diferentes formas, a atividade colinérgica e serotoninérgica, mesmo que as doses de exposição sejam toxicologicamente equivalentes. Foram verificados efeitos nas vias neuroquímicas logo após a exposição e após um longo período de interrupção do tratamento, indicando efeitos tardios em sistemas importantes que podem estar associados às alterações comportamentais. Finalmente, o presente estudo reforça a associação epidemiológica entre pesticidas

e alterações psiquiátricas e a capacidade da programação de alterações a longo-prazo quando a exposição se dá durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: Organofosforados. Desenvolvimento. Sistema colinérgico. Sistema serotoninérgico. Comportamento.

ABSTRACT

Organophosphate pesticides are widely used and its use consist on a severe public health problem. The classic effect of these compounds involve irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, causing an accumulation of acetylcholine at cholinergic synapses and, consequently, cholinergic hyperstimulation. However, when the doses of exposure are low, other the mechanisms of action may play a role and other neurotransmitter systems may be affected. Considering that children are particularly vulnerable to effects of these compounds, in this study we investigated the effects of methamidophos and chlorpyrifos organophosphate exposure during development on cholinergic and serotonergic systems and behavior. For this purpose, Swiss mice received subcutaneous injections of methamidophos or chlorpyrifos, or vehicle from the third to the ninth postnatal day (PN3 - PN9). Initially, a dose-response study was performed and the doses of 1mg/kg methamidophos and 3mg/kg chlorphrifos, which promoted 20% inhibition of acetylcholinesterase activity in brain were chosen to be used in the next set of experiments. At PN10, one day after exposure, a group of animals was sacrificed and the brainstem and cortex collected and stored to further analysis of cholinergic and serotonergic systems. From PN60 to PN63 the animals were submitted to behavioral tests in order to evaluate: anxiety, locomotor activity, decision making, depressive-like behavior and learning/memory. After the last test, the animals were sacrificed and the brainstem and cortex collected and stored to further analysis of cholinergic and serotonergic systems. At PN10, methamidophos and chlorpyrifos promoted alterations that suggest an increase of cholinergic activity respectively on the brainstem and cortex of females. As for the serotonergic system: only chlorpyrifos elicited alterations: There were increases in 5HT1A receptor and 5HT transporter binding in females and a decrease in 5HT2 receptor binding. At PN63, the activity of acetylcholinesterase had returned to control levels. Despite that, methamidophos elicited a decrease in the activity of choline acetyltransferase in the cortex and in choline transporter binding in the brainstem. As for the serotonergic system, methamidophos and chlorpyrifos promoted decreased 5HT1A receptor binding respectively in the brainstem and cortex of females and chlorpyrifos increased its binding in males. Methamidophos exposure elicited increased 5HT2 binding whereas chlorpyrifos exposure decreased female 5HT transporter binding. Methamidophos elicited behavioral alterations suggestive of increased depressive-like behavior while chlorpyrifos exposure was associated to increased anxiety levels and memory/learning deficits. Our results indicate that metamidophos and chlorpyrifos exposure during development distinctively affect the cholinergic and serotonergic systems even at toxicologically equivalent doses. There were immediate and late-emergent neurochemical effects that may play a role on the behavioral outcomes. Finally, the present study reinforces the epidemiologic association between pesticides exposure and mood disorders and suggest that organophosphate exposure during early development programs for late effects.

Keywords: Organophosphate. Development. Cholinergic system. Serotonergic system. Behavior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Biotransformação do clorpirifós.....	20
Figura 2 –	Primeira etapa: Linha temporal da construção da curva dose-resposta.....	31
Figura 3 –	Segunda etapa: Estudo dos efeitos neuroquímicos e comportamentais de baixas doses de MET e CPF.....	32
Figura 4 –	Teste do labirinto em cruz elevado.....	38
Figura 5 –	Caixa de atividade.....	39
Figura 6 –	Teste do nado forçado.....	41
Figura 7 –	Teste da suspensão pela cauda.....	42
Figura 8 –	Teste da esquiva inibitória.....	43
Figura 9 –	Variação de peso corporal durante a exposição a metamidofós.....	50
Figura 10 –	Variação de peso corporal durante a exposição a clorpirifós....	50
Figura 11 –	Atividade da ChAT no período neonatal.....	52
Figura 12 –	Ligação ao transportador pré-sináptico colinérgico no período neonatal.....	53
Figura 13 –	Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT _{1A} no período neonatal.....	53
Figura 14 –	Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT ₂ no período neonatal.....	54
Figura 15 –	Ligação ao transportador pré-sináptico 5HT no período neonatal.....	54
Figura 16 –	Atividade da ChAT na idade adulta.....	56
Figura 17 –	Ligação ao transportador pré-sináptico colinérgico na idade adulta.....	56
Figura 18 –	Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT _{1A} na idade adulta.....	57
Figura 19 –	Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT ₂ na idade adulta.....	58
Figura 20 –	Ligação ao transportador pré-sináptico 5HT na idade adulta.....	58
Figura 21 –	Efeitos da exposição a metamidofós sobre o tempo de imobilidade.....	59

Figura 22 – Efeitos da exposição a clorpirifós sobre o tempo de imobilidade.....	60
Figura 23 – Efeitos da exposição a metamidofós sobre o comportamento associado à ansiedade.....	61
Figura 24 – Efeitos da exposição a clorpirifós sobre o comportamento associado à ansiedade.....	61
Figura 25 – Efeitos da exposição a metamidofós sobre a atividade locomotora.....	62
Figura 26 – Efeitos da exposição a clorpirifós sobre a atividade locomotora.....	62
Figura 27 – Efeitos da exposição a metamidofós ou a clorpirifós sobre o tempo no centro do Labirinto em Cruz Elevado.....	63
Figura 28 – Efeitos da exposição a metamidofós ou a clorpirifós sobre aprendizado no Teste da Esquiva Passiva.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Atividade da AChE 24h após o término do tratamento.....	47
Tabela 2 –	Valores brutos dos biomarcadores colinérgicos, biomarcadores serotoninérgicos e medidas comportamentais para o grupo CT MET.....	48
Tabela 3 –	Valores brutos dos biomarcadores colinérgicos, biomarcadores serotoninérgicos e medidas comportamentais para o grupo CT CPF.....	49
Tabela 4 –	Atividade da AChE na idade adulta.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACHÉ	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ANOVA _r	Análise de variância com medidas repetidas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Braço Aberto
BCA	Ácido Bicinconínico
BF	Braço Fechado
CA	Campo Aberto
ChAT	Colina Acetiltransferase
CPF	Clorpirifós
CONT M	Grupo Controle para as ninhadas tratadas com Metamidofós
CONT C	Grupo Controle para as ninhadas tratadas com Clorpirifós
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
EPM	Erro Padrão da Média
FPLSD	<i>Fisher Protected Least Significant Difference</i>
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MET	Metamidofós
OF	Organofosforados
P	Valor de prova
PN	Dia de vida pós-natal

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVOS	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	Animais	29
2.2	Desenho experimental	29
2.3	Avaliação da atividade colinesterásica	32
2.4	Medidas bioquímicas de avaliação da função colinérgica e serotoninérgica	33
2.5	Medidas comportamentais	36
2.6	Análise estatística	43
3	RESULTADOS	45
3.1	Primeira etapa: curva dose-resposta de inibição da AChE após exposição neonatal a metamidofós e clorpirifós	45
3.1.1	<u>Metamidofós</u>	45
3.1.2	<u>Clorpirifós</u>	46
3.2	Segunda etapa: estudo dos efeitos neuroquímicos e comportamentais de baixas doses de MET e CPF	50
3.2.1	<u>Efeitos sobre o peso corporal dos animais</u>	50
3.2.2	<u>Análises globais dos biomarcadores colinérgicos e serotoninérgicos</u>	51
3.2.3	<u>Efeitos durante o desenvolvimento sobre o sistema colinérgico</u>	52
3.2.4	<u>Efeitos durante o desenvolvimento sobre o sistema serotoninérgico</u>	53
3.2.5	<u>Efeitos na idade adulta sobre o sistema colinérgico</u>	55
3.2.6	<u>Efeitos na idade adulta sobre o sistema serotoninérgico</u>	57
3.2.7	<u>Efeitos comportamentais</u>	59
4	DISCUSSÃO	65
4.1	Escolha das doses de exposição	65
4.2	Efeitos da exposição a metamidofós e a clorpirifós durante o desenvolvimento sobre o sistema colinérgico	66
4.3	Efeitos da exposição à metamidofós e a clorpirifós durante o desenvolvimento do sistema serotoninérgico	68

4.4	Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e clorpirifós sobre o sistema colinérgico avaliados na idade adulta.....	70
4.5	Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós sobre o sistema serotoninérgico avaliados na idade adulta.....	72
4.6	Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós sobre o comportamento dos animais.....	73
5	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	APÊNDICE - Artigo científico aceito para publicação no periódico de circulação internacional <i>Toxicological Sciences</i>.....	89

INTRODUÇÃO

Pesticidas organofosforados

A utilização de pesticidas ou agrotóxicos (termo mais recomendado atualmente para designar o caráter tóxico destas substâncias (Araújo *et al.*, 2007), representa um verdadeiro problema de saúde pública, especialmente para os países com economia baseada no agronegócio, como o Brasil (Araújo *et al.*, 2007). Apesar de serem reconhecidamente tóxicos para os seres humanos, a eficiência no combate e controle de pragas agrícolas e o conseqüente lucro gerado, torna os pesticidas compostos amplamente produzidos e comercializados, muitas vezes de maneira exagerada. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, mais de 18 mil tipos de pesticidas estão licenciados para uso neste país e a cada ano são aplicados em torno de 1 bilhão de litros de pesticidas na agricultura, parques, florestas, residências e escolas (U.S. EPA, 2002). Atualmente os pesticidas da classe dos organofosforados estão entre os mais comumente utilizados. Antes de seu emprego como pesticidas ou praguicidas esses compostos foram utilizados como armas químicas na Alemanha nazista (Domingos *et al.*, 2003). Após o período de guerra, estes agentes sofreram modificações estruturais no sentido de diminuir sua toxicidade para o homem e serem usados como pesticidas (Domingos *et al.*, 2003).

A classe de pesticida que antecedeu os organofosforados no combate a pragas agrícolas foi a dos organoclorados, dentre os quais o mais conhecido e utilizado foi o DDT (diclorodifeniltricloroetano), descoberto em 1939 pelo entomologista suíço Paul Müller, que recebeu por isso o Prêmio Nobel de Medicina (D'Amato *et al.*, 2002). Este composto foi amplamente produzido e comercializado com propósitos agrícolas por cerca de 30 anos até que graves problemas ambientais decorrentes de sua utilização fossem denunciados em 1962. A partir de então a produção deste pesticida vem sendo fortemente restringida em países em desenvolvimento (Resolução RDC nº 216 / 2004; Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, ANVISA, 2004) ou mesmo proibida em países desenvolvidos (U.S. EPA 2002).

As restrições impostas ao uso dos organoclorados contribuíram para o aumento do emprego de compostos organofosforados. Assim, a partir da década de 70 os organofosforados passaram a ser os agrotóxicos mais utilizados no mundo. No caso do Brasil em particular, nesta mesma década, os pesticidas foram incluídos compulsoriamente nos financiamentos agrícolas, junto com adubos e fertilizantes químicos, o que culminou na utilização em larga escala destes produtos (Araújo *et al.*, 2001).

A ação clássica dos compostos organofosforados é a inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (promovendo a fosforilação de um resíduo de serina no centro ativo da enzima). A acetilcolinesterase (AChE), presente no sistema nervoso, plasma e fígado, é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas. A inibição desta enzima acarreta um acúmulo de acetilcolina nas fendas e uma consequente hiperestimulação colinérgica. Nos casos em que ocorre uma intoxicação por altas doses de organofosforados e a inibição promovida resultante atinge níveis em torno de 60% da atividade enzimática, surgem os sintomas característicos da intoxicação aguda por organofosforados: a síndrome colinérgica (Abou-donia, 1992; Clegg e van Gemert, 1999).

Os sintomas da síndrome colinérgica aguda podem ser divididos em três grupos: muscarínicos, nicotínicos e centrais. Os sintomas muscarínicos são salivação e transpiração excessivas, lacrimejamento, aumento de secreções nasais e brônquicas, miose (diminuição do diâmetro pupilar), diarreia e bradicardia. Os efeitos nicotínicos incluem palidez, taquicardia, hipertensão, fraqueza e fasciculações. Os sintomas relacionados ao sistema nervoso central incluem ansiedade, insônia, dor de cabeça, tremores, confusão, falta de concentração, convulsões e depressão respiratória. A morte geralmente é devida à paralisia respiratória que pode ter origem central ou periférica (Kandel *et al.*, 1991).

Os organofosforados podem ser usados como inseticidas, rodenticidas e fungicidas e são quimicamente classificados como fosforados orgânicos ou ésteres fosfóricos. Apresentam baixa estabilidade química e são mais tóxicos para os vertebrados quando comparados aos clorados.

Hoje, as inúmeras agressões à saúde humana decorrentes da utilização de pesticidas vão muito além da intoxicação aguda. Exposições a baixas doses de pesticidas durante períodos prolongados podem silenciosamente causar uma série

de alterações que vão desde desordens neurocomportamentais (Rothlein *et al.*, 2006) e imunotoxicidade (Thomas, 1995) a efeitos teratogênicos (Arbuckle *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2004) e câncer (Blair and Zahm, 1995). Esta variedade de efeitos sugere que os mecanismos de ação através dos quais estas substâncias atuam podem ir além, ou ainda, serem independentes da inibição da AChE, pois esta inibição torna-se insuficiente para explicar os variados efeitos.

Depressão e pesticidas

Os mecanismos capazes de explicar as causas da depressão, embora não estejam completamente elucidados, envolvem fatores genéticos, neurobiológicos e ambientais (Nestler *et al.*, 2002; Heim *et al.*, 2004). Após a descoberta dos mecanismos de ação dos antidepressivos, as pesquisas e explicações neuroquímicas sobre a fisiopatologia da depressão ganharam maior destaque. As principais teorias relacionadas às bases biológicas da depressão envolvem os sistemas neurotransmissores monoaminérgicos e a dessensibilização de receptores.

A hipótese das monoaminas baseia-se na deficiência das aminas biogênicas, particularmente noradrenalina, serotonina e dopamina, como causa da depressão. A primeira hipótese aminérgica de Schildkraut (1965) e Bunney e Davis (1965) foi denominada hipótese catecolaminérgica, pois propunha que a depressão se associava a um déficit das catecolaminas, principalmente noradrenalina. Posteriormente surgiram a hipótese serotoninérgica, de Van Praag e Korf (1971), que teve grande impulso com o desenvolvimento da classe de antidepressivos chamados Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (ISRS), e a hipótese dopaminérgica de Wilner (1990), devido à implicação da dopamina nos fenômenos de recompensa cerebral, estando envolvida na fisiopatologia da anedonia (Gorwood, 2008; Stein, 2008) e de estudos demonstrando que o uso continuado de antidepressivos aumenta os níveis de dopamina no núcleo *acumbens* (Dremencov *et al.*, 2005).

Apesar da relevância da hipótese das monoaminas na investigação da depressão, existe uma certa resistência para sua aceitação, especialmente devido ao fato de que todos os medicamentos antidepressivos aumentam, de imediato, as monoaminas nas fendas sinápticas, porém seu efeito clínico só ocorre algumas

semanas após sua administração (Oswald *et al.*, 1972). Outras substâncias, como por exemplo a cocaína, também elevam os níveis das monoaminas mas não apresentam efeito antidepressivo (Stahl, 1998). Como consequência, o foco das hipóteses neuroquímicas da depressão deslocou-se para os receptores dos neurotransmissores.

O conhecimento dos receptores cerebrais evolui constantemente, já tendo sido identificados 4 subtipos de receptores noradrenérgicos, 7 subtipos de receptores serotoninérgicos e 5 subtipos de receptores dopaminérgicos. Alguns desses subtipos são ainda subclassificados em diferentes isoformas de acordo com as características farmacológicas e moleculares (Stahl, 1998). Mudanças na função dos neurotransmissores podem ocorrer através da mudança na sensibilidade de receptores pré e pós-sinápticos, sem alteração da quantidade do próprio neurotransmissor (Lafer e Vallada, 1999). Esta observação permitiu que a hipótese de deficiência de neurotransmissores fosse modificada e, em segundo lugar, fosse proposta a hipótese de dessensibilização de receptores (Lafer e Vallada, 1999). Tal hipótese propõe que o atraso no aparecimento dos efeitos terapêuticos de antidepressivos está relacionado a alterações no número e sensibilidade dos receptores monoaminérgicos, que pode demorar dias ou semanas para ocorrer.

O interesse a respeito da importância dos receptores na etiologia da depressão derivou dos seguintes achados: a depleção de monoaminas provoca um aumento compensatório do número de receptores pós-sinápticos (suprarregulação) (Graeff e Brandão, 1993); estudos *post mortem*, em cérebros de pacientes suicidas encontraram um aumento no número de receptores 5HT₂ no córtex frontal (Graeff e Brandão, 1993); a ativação de alguns subtipos do mesmo receptor provoca efeitos diversos e até mesmo opostos, como no caso dos receptores 5HT_{1A} e 5HT₂ (Graeff e Brandão, 1993). Este último achado levou Deakin e colaboradores (1991) a postular a hipótese da depressão com base no desequilíbrio de receptores serotoninérgicos, sugerindo um déficit na neurotransmissão dos receptores 5HT_{1A} e um excesso na neurotransmissão dos receptores 5HT₂. Sabe-se que a distribuição desses receptores no cérebro se dá de forma diversa, havendo predomínio dos receptores 5HT₂ na amígdala e dos receptores 5HT_{1A} no hipocampo, ambas estruturas do sistema límbico (Graeff e Brandão, 1993).

Pressupondo anormalidades funcionais em alguns receptores, esta hipótese obteve um suporte significativo vindo das pesquisas com ligantes marcados radioativamente, evidenciando que, após o uso de antidepressivos por algumas semanas, ocorrem no cérebro de pacientes deprimidos alterações nos receptores noradrenérgicos, principalmente uma redução de receptores beta-adrenérgicos pós-sinápticos (infraregulação) (Graeff e Brandão, 1993; Leonard, 1997).

A área de pesquisa sobre a implicação dos receptores deverá se aprofundar, identificando mais detalhadamente as características de cada subtipo de receptor e abrindo dois outros caminhos na elucidação dos fenômenos biológicos da depressão: o conhecimento do que ocorre no interior do neurônio pós-sináptico depois da estimulação do receptor e a investigação, através de técnicas moleculares, de possíveis anormalidades na expressão genética de enzimas e receptores cerebrais.

Em humanos, a exposição contínua a baixos níveis de organofosforados tem como consequências uma variedade de sequelas psiquiátricas: apatia, irritabilidade, esquizofrenia e depressão. Os quadros de depressão, segundo a Organização Mundial da Saúde estão entre os efeitos comportamentais prevalentes (Rosenstock *et al.*, 1990).

Estudos epidemiológicos indicam um aumento no risco de depressão e suicídio em trabalhadores rurais expostos a pesticidas (van Wijngaarden, 2003; London *et al.*, 2005; Jaga and Dharmani, 2007). Esta associação vem sendo fortalecida através de estudos em modelos animais, os quais identificaram comportamento associado à depressão em roedores após exposição a organofosforados (Aldridge *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2009).

Ansiedade e pesticidas

Ansiedade pode ser definida como um sentimento vago e desagradável de medo, apreensão, caracterizado por tensão ou desconforto derivado de antecipação de perigo, de algo desconhecido ou estranho (Swedo *et al.*, 1994). O que difere a ansiedade normal da ansiedade patológica é basicamente avaliar se a reação ansiosa é de curta duração, auto-limitada e relacionada ao estímulo do momento ou não (Castillo *et al.*, 2000). Os transtornos ansiosos são quadros clínicos em que

estes sintomas são primários, ou seja, não são derivados de outras condições psiquiátricas como depressão, psicoses, transtornos do desenvolvimento, etc. (Castillo *et al.*, 2000). Sintomas ansiosos são freqüentes em outros transtornos psiquiátricos e por isso muitas vezes o transtorno ansioso típico é confuso e difícil de diagnosticar. Em adição, podem ocorrer casos em que vários transtornos estão presentes (comorbidades) tornando impossível estabelecer qual sintoma é primário e qual não é (Castillo *et al.*, 2000).

O fenômeno comportamental conhecido como ansiedade está associado a uma inter-relação entre o sistema límbico e estruturas corticais (Bergink *et al.*, 2004). Entre estas regiões, as projeções eferentes que partem da amígdala especificamente desempenham um papel de extrema importância na ansiedade e estão envolvidas na aquisição, consolidação e expressão do medo condicionado (Walker e Davis, 2002).

Entre os neurotransmissores já descritos como envolvidos no transtorno ansioso estão a noradrenalina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a serotonina, o glutamato (Castillo *et al.*, 2000) e a acetilcolina (para revisão: Zarate e Manji, 2008).

Vários estudos reportam uma associação entre transtornos da ansiedade e exposição ocupacional a organofosforados (Jamal *et al.*, 2002; Salvi *et al.*, 2003), assim como aumento dos níveis de ansiedade em modelos animais de exposição (Sanchez-Amate *et al.*, 2001; Brocardo *et al.*, 2007).

Cognição e pesticidas

Aprendizado é definido como o processo pelo qual adquirimos conhecimento sobre o mundo, assim como habilidades necessárias à sobrevivência (Kandel, 2000). Entre estas habilidades podemos citar as motoras, que possibilitam o desenvolvimento psicomotor e social e as linguagens, imprescindíveis à transmissão de conhecimento ao longo das gerações. Entende-se por memória o processo pelo qual o conhecimento e as habilidades são codificados, consolidados, registrados e, posteriormente, recuperados, ou seja, aprendidos (Kandel, 2000). Os tipos de memória podem ser classificados de acordo com o modo como a informação é armazenada e reutilizada. Assim, ela pode ser implícita (não-declarativa) ou explícita (declarativa), cada uma apresentando subdivisões. De acordo com o tempo que tais

informações ficam disponíveis para reutilização, ela pode ser de curto-prazo/recente ou de longo prazo (Kandel, 2000).

Existem fortes evidências da associação entre agrotóxicos e déficits cognitivos. Há indícios, por exemplo, de que a exposição a pesticidas está associada à demência e à doença de Alzheimer (Santibanez *et al.*, 2007). Estudos prévios em modelos animais demonstram que a exposição perinatal a pesticidas causa prejuízos na memória e piora no desempenho dos animais em testes comportamentais de avaliação cognitiva que podem persistir até a idade adulta (Timofeeva *et al.*, 2008a). Já foram descritos, particularmente, prejuízos cognitivos após a exposição aos pesticidas organofosforados clorpirifós, diazinon e paration (Levin *et al.*, 2001; Timofeeva *et al.*, 2008b; Levin *et al.*, 2010). Estes prejuízos parecem estar fortemente co-relacionados a alterações na função sináptica colinérgica (Levin *et al.*, 2001; Slotkin, 2005).

Clorpirifós

O pesticida clorpirifós [O,O-dietil-O-(3,5,6-tricloro-peridil)-fósforo-tioato], pertence ao grupo dos inseticidas organofosforados altamente tóxicos (Classe II). É utilizado no controle de diversas pragas em muitas culturas, entre as quais milho, soja, trigo, feijão, café, algodão, maçã, banana, cenoura, tomate, couve e fumo (Pena *et al.*, 2003).

Seu uso vem sofrendo várias restrições e, no Brasil, é proibido para uso doméstico desde 2005 (Resolução RDC nº 226;2004). Nos Estados Unidos, está sendo severamente restrito devido principalmente à sua neurotoxicidade durante o desenvolvimento (U.S. EPA, 2002). Devido à sua elevada lipossolubilidade, clorpirifós pode ser absorvido pelo organismo humano por várias vias como a pele, membranas mucosas e via respiratória (Pena *et al.*, 2003). Assim como os demais compostos organofosforados inibe as serino-hidrolases.

A meia-vida plasmática do clorpirifós é curta, da ordem de 1 hora ou menos (para revisão: Eaton *et al.*, 2008). O processo de biotransformação que se passa nos organismos animais é ilustrado na figura 1. A etapa de dessulfuração a clorpirifós-oxon é particularmente importante, pois clorpirifós em sua forma original é incapaz de inibir significativamente a AChE (Chambers, 1992). O clorpirifós-oxon é

enzimaticamente ou espontaneamente hidrolizado até a forma dietilfosfato e 3,4,6-tricloro-2-piridinol (TCPy). Além da transformação em clorpirifós-oxon, clorpirifós é oxidado por citocromos da família P-450 a um metabólito instável que sofre hidrólise espontânea e forma dietilfosfato e TCPy. Estes metabólitos são excretados na urina ou formam conjugados sulfatados e glucuronídeos que também são excretados (para revisão: Eaton *et al*, 2008).

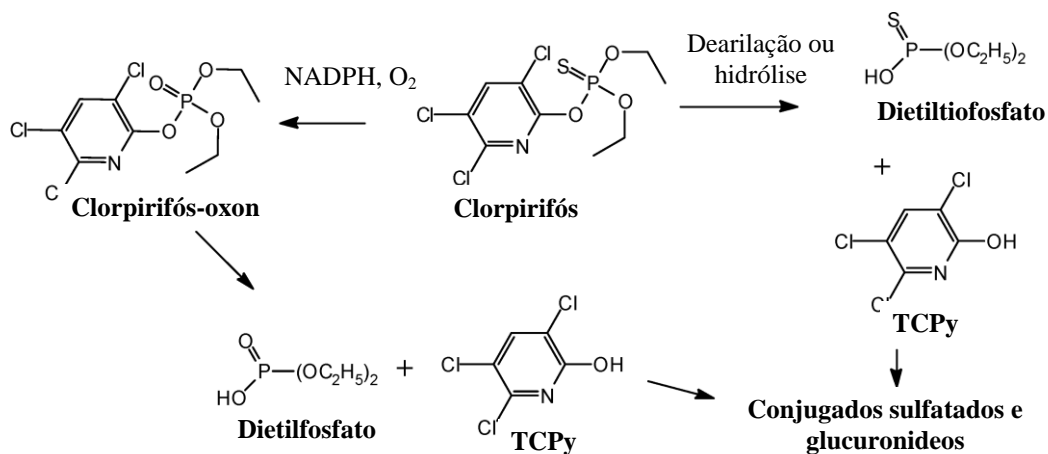


Figura 1. Biotransformação do clorpirifós. Modificado de Eaton *et al* 2008.

Estudos experimentais em modelo animal demonstram que, devido a sua característica lipofílica, as maiores concentrações de clorpirifós são encontradas no tecido adiposo, além de se ligar a proteínas plasmáticas como a albumina. Isso diminui a concentração de clorpirifós livre no sangue. O metabólito inibidor da AChE, clorpirifós-oxon, tem a característica de ser menos lipofílico e, portanto, se acumula relativamente menos nos adipócitos e se distribui melhor para órgãos como cérebro, fígado e rim.

Clorpirifós é o pesticida organofosforado mais estudado e cujos efeitos são melhor conhecidos. Mesmo em exposições que não promovem inibições significativas da AChE, clorpirifós é capaz de alterar diversos padrões do funcionamento cerebral (Barone *et al.*, 2000; Gupta, 2004). Uma indicação disso é a observação de que embriões de rato em cultura, quando expostos a clorpirifós,

apresentam anomalias mitóticas e apoptose durante o estágio de fechamento do tubo neural (Roy *et al.*, 1998), sendo que a enzima responsável pela síntese de acetilcolina só estará presente no cérebro mais tardiamente durante o desenvolvimento (Lauder e Schambra, 1999). Adicionalmente, clorpirifós causa inibição do crescimento de neuritos em células de feocromocitoma de ratos (PC12), apesar destas células não apresentarem as enzimas necessárias para a produção de clorpirifós-oxon, o metabólito ativo do clorpirifós que inibe a AChE (Li e Casida, 1998). A constatação de que há componentes da neurotoxicidade de clorpirifós que não estão diretamente associados à AChE, chama a atenção para a importância de se estudar outros mecanismos e sistemas de neurotransmissores que possam ser alvos deste e de outros pesticidas desta classe.

Metamidofós

O Metamidofós (O,S-dimetilfosforamidato; C₂H₈NO₂PS), conhecido comercialmente como Monitor, Tam, Nitofol, Swipe, Nuratron, Vetaron, Filitox, Patrole, Tamanox, SRA 5172 ou Tamaron, é um pesticida (inseticida e acaricida) organofosforado de amplo espectro de ação, que apresenta vários riscos à saúde humana e aos animais devido à sua elevada toxicidade. É obtido como subproduto do Acefato (Gray *et al.*, 1982; Rhodes *et al.*, 2004).

Apesar de estar sofrendo restrições em alguns países (Rotterdam Convention: Database of Notifications of Final Regulatory Action, 2012), o pesticida metamidofós é, ainda, extensivamente usado. Em um estudo anterior dos efeitos da exposição sub-crônica a metamidofós em camundongos já adultos, nosso grupo de pesquisa detectou comportamento associado à depressão em camundongos (Lima *et al.*, 2009) e alterações sobre marcadores neuroquímicos da função serotoninérgica (Lima *et al.*, 2011) mesmo com níveis baixos de inibição da AChE (15%) ou após a completa recuperação da sua atividade. Entretanto, ainda não conhecemos as consequências de uma exposição sub-crônica no período de maior vulnerabilidade do sistema nervoso, os primeiros dias de vida pós-natal dos roedores.

Na agricultura brasileira, a partir do início da década de 90, verificou-se crescente aumento no uso do Metamidofós. Amplamente empregado em todo o país para proteção de diferentes culturas, já foram registrados casos de uso abusivo e

indiscriminado em Minas Gerais e casos de contaminação em culturas de hortaliças em São Luís (MA) (Araújo *et al.*, 2001).

Exposição a pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento

Além dos sintomas causados pela intoxicação aguda a organofosforados, uma série de outras silenciosas alterações fisiológicas podem ser observadas após exposições a níveis abaixo dos necessários para causar toxicidade sistêmica. E quando se trata de uma exposição perinatal ou durante a infância, o problema se torna particularmente grave, pois é sabido que este período do desenvolvimento cerebral é mais vulnerável aos danos promovidos por pesticidas (Moser, 1999). Um dos maiores problemas causados por organofosforados para a saúde humana é a capacidade destes agentes de promover neurotoxicidade durante o período de desenvolvimento, mesmo quando se trata de exposições abaixo do limiar para causar sinais de toxicidade sistêmica (Pope, 1999; Landringan, 2001). O período de surto de crescimento cerebral (*brain growth spurt*), que em roedores compreende os dez primeiros dias de vida pós-natal (Quinn, 2005; Clancy *et al.*, 2007), é o período crítico para neurogênese no hipocampo e cerebelo e para a sinaptogênese (Dobbing and Sands, 1979; Bandeira *et al.*, 2009). Este é também o período de entrada das fibras colinérgicas no córtex e o período no qual a expressão dos principais componentes do sistema colinérgico atingem o seu máximo em várias regiões cerebrais (para revisão: Dwyer *et al.*, 2008; Abreu-Villaça *et al.*, 2011). De fato, durante este período, o cérebro é altamente vulnerável aos efeitos de vários agentes neurotóxicos (Dribben *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Nunes-Freitas *et al.*, 2011; Pohl-Guimaraes *et al.*, 2011) incluindo organofosforados (Aldridge *et al.*, 2003; 2005b, Slotkin and Seidler, 2007; 2008; Levin *et al.*, 2010). Além disso, o fato de crianças pequenas não apresentarem muitos dos sinais de toxicidade sistêmica, contribui para dificultar os registros rápidos dos casos de contaminação e para agravar o problema (Litovitz *et al.*, 1997).

Estudos com clorpirifós, um dos organofosforados mais amplamente estudados, indicam que este pesticida afeta processos básicos do desenvolvimento cerebral através de mecanismos que não estão necessariamente associados à inibição da AChE ou mecanismos colinérgicos, tais como a interrupção da replicação

e diferenciação das células nervosas, os processos de sinaptogênese e axogênese e função sináptica (Barone *et al.*, 2000; Casida e Quistad, 2004; Gupta, 2004). Vários estudos indicam que um mecanismo molecular de ação de clorpirifós pode ser a interferência sobre a atividade da adenilato-ciclase, enzima que controla a síntese de AMP cíclico (cAMP) (Meyer *et al.*, 2003). Finalmente, um potente efeito apontado como não-colinérgico, é a capacidade de afetar a fosforilação e a função de fatores de transcrição nucleares que controlam o processo de diferenciação celular e que são dependentes de cAMP (Schuh *et al.*, 2002, Meyer *et al.*, 2003 Aldridge *et al.*, 2003), sendo que estes efeitos muitas vezes contribuem para o surgimento de efeitos neurocomportamentais que persistem até a idade adulta (Levin *et al.*, 2002; Icenogle *et al.*, 2004).

Um aspecto intrigante da exposição a baixas doses de compostos organofosforados é que eles podem diferir substancialmente em sua rede de efeitos no desenvolvimento cerebral e performance comportamental, que não necessariamente estão ligados a inibição colinesterásica. Numa série de estudos com exposições toxicodinamicamente equivalentes em ratos neonatos foi demonstrado que os pesticidas organofosforados clorpirifós, diazinon e paration causam anormalidades comportamentais relacionadas aos sistemas colinérgico e serotoninérgico, mas estas podem ser diferentes de acordo com o organofosforado administrado (Roegge *et al.*, 2008; Slotkin, 2005; Slotkin *et al.*, 2008b; Slotkin *et al.*, 2009). Como exemplo, podemos citar o fato que o pesticida paration, embora seja reconhecidamente mais tóxico sistemicamente, não causou prejuízos cognitivos, analisados através do labirinto aquático radial, como foi demonstrado para os outros dois organofosforados na adolescência e idade adulta (Slotkin *et al.* 2008b; Timofeeva *et al.*, 2008a).

Estudo comparativo

Como dito acima, além do conhecido efeito anti-colinesterásico, a exposição a pesticidas organofosforados pode promover uma série de outras alterações no cérebro em desenvolvimento que podem refletir consequências da ação destas substâncias em outros sistemas neurotransmissores que não o colinérgico. De maneira interessante, o alvo, a forma e a intensidade com que estas exposições

afetam o sistema nervoso são sugestivamente diferentes entre os vários pesticidas desta classe (Pope, 1999; Gupta, 2004; Aldridge *et al.*, 2005a; Timofeeva *et al.*, 2008a). Não obstante, a capacidade de atuação de vários compostos organofosforados sobre sistemas-chave para o desenvolvimento cerebral são ainda pouco estudados, enquanto o impacto da exposição ao pesticida clorpirifós no período de desenvolvimento já é relativamente bem conhecido e, por isso, o controle do uso desta substância já é uma realidade em todo o mundo.

Desta forma, a análise dos efeitos da exposição a outros compostos da mesma classe e de até que ponto estes efeitos são semelhantes aos efeitos do clorpirifós é de extrema importância para a determinação dos riscos do uso indiscriminado destes compostos à espécie humana. Assim como já foram descritos diversos efeitos adversos para o uso de clorpirifós mesmo a doses muito inferiores às necessárias para causar sintomas de síndrome colinérgica, é provável que também outros organofosforados ofereçam iguais ou maiores consequências, inclusive apresentando efeitos inexistentes na exposição a clorpirifós. A comparação entre os organofosforados tem o potencial de ajudar profissionais da área a selecionar aqueles que são menos prejudiciais à população.

Um desafio para a realização da comparação entre os dois pesticidas usados neste estudo (clorpirifós e metamidofós) foi a escolha de uma dose de exposição para as duas substâncias que fosse toxicologicamente equivalente. A escolha da dose equivalente nos permite comparar resultados neuroquímicos e comportamentais obtidos devido à exposição a diferentes pesticidas. Para isso, no presente estudo, foi realizada uma etapa preliminar de construção de uma curva dose resposta de inibição da AChE na qual se buscou identificar uma dose para cada um dos pesticidas que causasse o mesmo nível de inibição enzimática nas duas regiões cerebrais estudadas. Nosso objetivo, baseado em estudos anteriores, foi identificar a dose de cada pesticida que causasse aproximadamente 20% de inibição da AChE um dia após o término do período de exposição, sendo que esta dose seria utilizada nos experimentos seguintes onde alterações em sistemas de neurotransmissores centrais e o comportamento animal seriam avaliados. Esta escolha foi baseada em estudos que utilizaram organofosforados como diazinon, clorpirifós e paration, nos quais foi demonstrado que este nível de inibição causa alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores e no comportamento.

Como descrito em detalhe na sessão de Resultados, tivemos sucesso em identificar uma dose de metamidofós e outra de clorpirifós que causassem em média 20% de inibição da AChE, no entanto, a análise mais detalhada dos dados demonstrou que o grau de inibição variou em relação ao sexo e à região cerebral.

Apesar da dose do pesticida metamidofós que causou uma inibição da atividade enzimática de cerca de 20% não ter variado em função da região cerebral e do sexo, a exposição a clorpirifós promoveu níveis de inibição diferentes para machos e fêmeas. As fêmeas expostas a clorpirifós tiveram a atividade da enzima mais afetada que os machos. Adicionalmente, os machos tiveram inibições diferentes de acordo com a região analisada. Não obstante as doses escolhidas terem causado níveis variáveis de inibição, estas podem ser consideradas baixas em relação a esse parâmetro. Assim, como descrito nas sessões de Métodos e Resultados, optamos por analisar e apresentar em separado os resultados obtidos. Contudo, mantivemos a discussão comparativa dos dados, ressaltando que em algumas situações, as inibições da AChE não foram semelhantes entre os pesticidas, o que pode ter influenciado os resultados.

Importância da avaliação dos sistemas colinérgico e serotoninérgico

Ainda hoje, pouco se sabe sobre a natureza da relação entre transtornos psiquiátricos e exposição a organofosforados. Contudo, sabe-se que alterações no sistema serotoninérgico são críticas uma vez que estão associadas tanto com transtornos da ansiedade quanto com comportamento depressivo (Risch e Nemeroff, 1991; Nemeroff, 1998; Courtet *et al.*, 2001; Nutt, 2002; Olausson *et al.*, 2002; Gross e Hen 2004; White *et al.*, 2005; Celine *et al.*, 2006;). Além disso, existem fortes evidências do envolvimento do sistema colinérgico central e de interações entre o sistema colinérgico e o serotoninérgico na modulação da ansiedade (File *et al.*, 2000; Degroot e Treit, 2002; 2003).

A avaliação do sistema colinérgico é de extrema importância no presente estudo. Os pesticidas organofosforados têm como alvo indiscutível a inibição da AChE e, portanto, se espera que hajam alterações colinérgicas como consequência da sua exposição. No entanto, nós selecionamos doses de exposição que causam níveis baixos de inibição enzimática para cada pesticida. Assim, caso haja

alterações colinérgicas diretamente decorrentes da atividade colinesterásica, estas devem ser proporcionais às inibições encontradas para cada pesticida utilizado neste trabalho e, caso contrário, alterações outras, não associadas à inibição da AChE podem ser investigadas. Não obstante, tanto as alterações colinesterásicas como outras possíveis ações sobre o sistema colinérgico podem acarretar disfunções de outros sistemas neurotransmissores, já que o sistema colinérgico participa da modulação de várias outras vias no sistema nervoso. Receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) pré-sinápticos modulam a liberação, além da própria acetilcolina, de outros neurotransmissores como noradrenalina, GABA, serotonina, glutamato (Wonnacott, 1997) assim como neuropeptídeos, entre eles o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), o hormônio liberador de corticotropina (CRH) e o neuropeptídeo Y (NPY). Adicionalmente, estudos anteriores demonstram que estes neurotransmissores participam da fisiopatologia da ansiedade (Bergink *et al.*, 2004). Além disso, os nAChRs também estão envolvidos com o processo de retenção de memória. Nos quadros de demência ou disfunções cognitivas, há um declínio da transmissão colinérgica (Dani, 2001; Newhouse *et al.*, 2004).

Em relação ao sistema serotoninérgico, é indiscutível a relevância da sua participação nos mecanismos fisiológicos tanto da depressão e quanto da ansiedade. A hipótese serotoninérgica da depressão de Korf e van Praag (1971) sugere que a depressão maior resulta de uma considerável deficiência de serotonina ou uma ineficiência dos receptores serotoninérgicos.

Em adição, diversas alterações tanto sobre o sistema colinérgico quanto o serotoninérgico foram descritas após exposição a pesticidas organofosforados, particularmente durante o período de desenvolvimento.

1 OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivos principais verificar se a exposição a baixas doses dos pesticidas organofosforados metamidofós e clorpirifós durante o desenvolvimento causa alterações colinérgicas e/ou serotoninérgicas de curto prazo no sistema nervoso central e se há diferenças na resposta à exposição a baixas doses de diferentes pesticidas da mesma classe.

Além dos efeitos de curto prazo, pretendemos avaliar os efeitos comportamentais persistentes ou programados que possam ser observados na idade adulta, manifestados em desordens do humor, cognitivas ou locomotoras e determinar até que ponto estas alterações comportamentais refletem efeitos de longo prazo nos sistemas colinérgicos e/ou serotoninérgicos para cada pesticida.

Objetivos específicos:

Produzir baixos níveis de inibição da enzima AChE:

Uma vez que este estudo visa avaliar os efeitos de cada um dos dois pesticidas avaliando as contribuições relativas da inibição da AChE *versus* outros mecanismos associados a eventos do desenvolvimento do sistema nervoso central afetados por pesticidas, é crucial que as doses dos pesticidas a serem utilizadas neste estudo sejam bem inferiores ao limiar para ocorrência de toxicidade sistêmica. Assim, nosso primeiro objetivo específico foi identificar quais doses dos pesticidas em questão produziriam níveis baixos de inibição da atividade colinesterásica, em torno de 20%.

Avaliar se a exposição a baixas doses de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento pós-natal recente causa alterações colinérgicas e/ou serotoninérgicas de curto prazo no sistema nervoso central e se há diferenças na resposta à exposição a diferentes pesticidas da mesma classe:

Após a escolha da dose de cada pesticida que causa níveis baixos de inibição da AChE, verificamos se a exposição aos diferentes pesticidas causa efeitos distintos nos sistemas colinérgico e serotoninérgico centrais um dia após o término da exposição. Como forma de avaliação do sistema colinérgico, dosamos a atividade

das enzimas acetilcolinesterase, colina-acetiltransferase e do transportador pré-sináptico de colina; e, como forma de avaliar o sistema serotoninérgico, quantificamos a ligação de marcadores específicos aos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, 5HT₂ e ao transportador pré-sináptico de serotonina.

Avaliar se a exposição a baixas doses de pesticidas organofosforados durante o desenvolvimento pós-natal recente causa alterações do humor, cognitivas ou locomotoras e até que ponto estas alterações comportamentais refletem efeitos de longo prazo nos sistemas colinérgicos e/ou serotoninérgicos.

Com o objetivo de verificar se a exposição aos diferentes pesticidas causa alterações comportamentais distintas quando administrados a baixas doses, selecionamos testes normalmente utilizados para acessar níveis de ansiedade, comportamento associado à depressão, aprendizado e memória e atividade locomotora. Os animais foram testados na idade adulta. Nestes animais, verificamos também se a exposição aos pesticidas causa efeitos distintos nos sistemas colinérgico e serotoninérgico centrais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a declaração de Helsinki e com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* adotado e promulgado pelo *National Institutes of Health*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA) sob o número de protocolo CEUA/006/2011.

2.1 Animais

Os animais foram criados e mantidos sob temperatura controlada, em um ciclo de 12 horas de claro e 12h de escuro (as luzes acendiam às 2:00 e apagavam às 14:00 horas com objetivo de viabilizar os testes realizados na fase escura, mimetizando o período noturno) e o acesso à água e comida era livre. Foram utilizadas apenas ninhadas de camundongos da cepa *Swiss* com número de filhotes entre 8 e 12, que está em torno da média de animais por ninhada geralmente observada para esta cepa, para que as possíveis diferenças de desenvolvimento oriundas do padrão nutricional a que eles foram submetidos desde a gestação fossem minimizadas. Foram usados para de 7 a 10 animais por sexo e por grupo para cada etapa do estudo.

2.2 Desenho experimental

O período de exposição dos animais neonatos utilizados neste projeto está compreendido dentro de um dos períodos considerados de maior vulnerabilidade do cérebro de roedores a agentes neurotóxicos, os primeiros dias de vida pós-natal. Em

relação ao desenvolvimento do sistema nervoso, este período corresponde ao terceiro trimestre de gravidez, em humanos (Quinn, 2005; Clancy *et al.*, 2007).

Considerando o dia do nascimento dos animais como PN1 (ou seja, primeiro dia de vida pós-natal), o período de exposição estendeu-se do terceiro dia de vida (PN3) ao nono dia de vida (PN9). Neste período os animais receberam injeções subcutâneas diárias de metamidofós (MET), clorpirifós (CPF) ou dimetilsulfóxido (ou DMSO, veículo de diluição das drogas).

Numa etapa preliminar do estudo, foram administradas 3 diferentes doses para cada um dos organofosforados para a construção de uma curva dose-resposta de inibição da AChE. Tanto para o metamidofós quanto para clorpirifós foram usadas as doses de 0,25mg/kg (dose menor ou DMenor), 1mg/kg (dose intermediária ou DInt) e 3mg/kg (maior dose ou DMAior). Estas doses foram escolhidas com base em estudos prévios da inibição colinesterásica causada pela exposição à organofosforados em modelo animal (Whitney, *et al.* 1995; Moser, 1999; Slotkin *et al.*, 2006).

Cada animal de cada ninhada recebia apenas uma dose de um dos compostos organofosforados ou DMSO (animais controle, CT) em uma injeção subcutânea diária, de maneira que as diferentes doses eram aplicadas em cada ninhada mas somente havia exposição a um dos organofosforados em cada ninhada, evitando contaminações cruzadas entre pesticidas. Assim, o tratamento dos animais foi realizado conforme esquematizado abaixo (Fig 2). O volume de solução injetado era sempre 1mL/kg e para diferenciar os grupos (tratado ou controle) e as doses (DMenor, DInt e DMAior), os animais receberam marcações com uma solução atóxica de violeta de genciana (cloreto de pararosanilina), que eram reforçadas todos os dias logo após a injeção da droga. Os animais controle também eram pintados para manter o padrão de manipulação e estresse o mais homogêneo possível. No dia seguinte ao término do tratamento, os animais foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram dissecados para a realização do ensaio enzimático da atividade da AChE e construção da curva dose-resposta. Foram utilizadas as regiões do **córtex cerebral** (região rica em projeções colinérgicas e serotoninérgicas) e **tronco encefálico** (região que contém a maioria dos corpos celulares colinérgicos e serotoninérgicos).

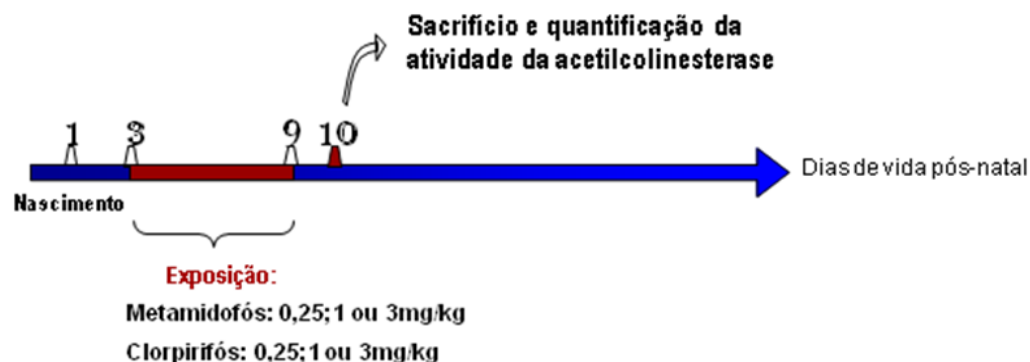


Figura 2. Primeira etapa: Linha temporal da etapa de construção da curva dose-resposta

Estudos anteriores verificaram que a exposição a baixas doses de OPs como clorpirifos, diazinon e paration, as quais resultaram em inibições de até 20% da atividade da AChE, causaram alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores assim como alterações comportamentais durante o desenvolvimento e na idade adulta (Slotkin *et al.*, 2006b; 2008c; 2009; Slotkin and Seidler, 2007). Assim, com base nos resultados obtidos a partir da curva dose-resposta, escolhemos as doses de MET e CPF que geraram inibições próximas de 20% no córtex e tronco cerebral para serem utilizadas nas etapas seguintes deste estudo. Como descrito em detalhes na sessão de Resultados, as doses escolhidas foram 1mg/kg para MET e 3mg/kg para CPF.

Assim, após esta etapa inicial, as ninhadas passaram a ser distribuídas apenas entre controles e tratados (desta vez com uma única dose do pesticida). Porém os animais das ninhadas foram subdivididos também de acordo com o período de avaliação experimental. Uma parte deles foi destinada à avaliação neuroquímica na fase de desenvolvimento e, portanto, foi sacrificada em PN10. A outra parte foi destinada às análises comportamentais e neuroquímicas e foi mantida com a mãe até o período do desmame (PN21), quando os filhotes eram separados por sexo e mantidos em grupos de 2 a 4 animais por gaiola até completarem PN60. Na idade adulta, de PN60 a PN63, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e em seguida foram sacrificados (PN63), de acordo com a sequência esquematizada

na Fig 3. Os animais neonatos foram sacrificados por decapitação, através de corte único com tesoura cirúrgica e os adultos foram sacrificados por deslocamento cervical. Em ambos os casos, o cérebro foi dissecado e as regiões de interesse foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -45°C para posterior análise.

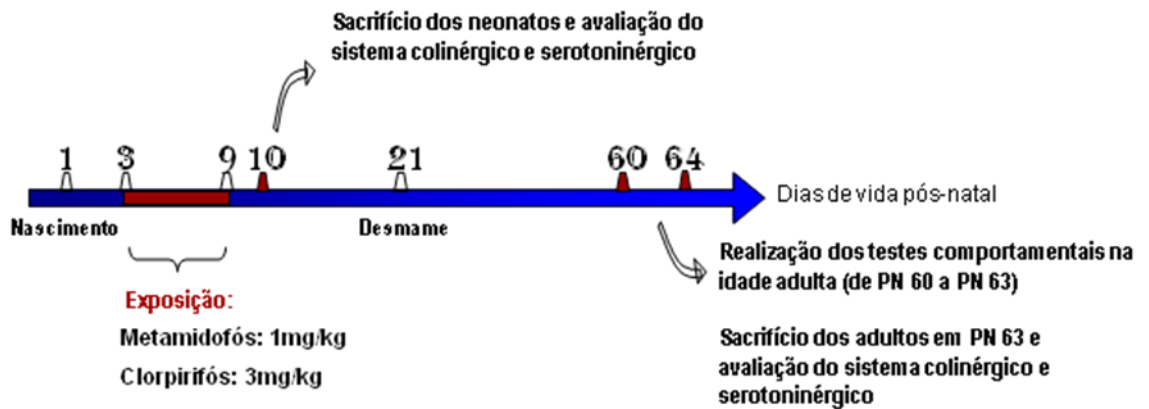


Figura 3. Segunda etapa: Estudo dos efeitos neuroquímicos e comportamentais de baixas doses de MET e CPF

2.3 Avaliação da atividade colinesterásica

A atividade da acetilcolinesterase foi medida através do modo espectrofotométrico descrito por Ellman (Ellman *et al.*, 1961). O tronco encefálico (mesencéfalo+ponte+bulbo) e o córtex cerebral de cada animal foram pesados e homogeneizados (aproximadamente a 90 mg/mL) em tampão fosfato de sódio (0.12M, pH 7.6) em um homogeneizador tipo Ultra-Turrax T10 *basic*. A seguir, em uma cubeta de 1 mL, foram adicionados 0.1 mL do tecido homogeneizado a uma solução contendo 709 μL de tampão fosfato de sódio a 0.12M (pH=7.6), 177 μL de ácido ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB, 0.63mM em tampão fosfato 0.12M, pH7.6) e 177 μL de acetiltiocolina (acetylthiocholine iodide, 6.6mM em água destilada). Imediatamente após a adição do tecido homogeneizado, a solução foi lida a 412nm,

em modo cinético a cada 5 segundos, durante 2 minutos. A absorbância do branco foi subtraída dos valores finais de leitura.

Para obtermos os valores de atividade da acetilcolinesterase em nmoles de produto formado por unidade de tempo, fizemos uma correlação com uma curva padrão de L-cisteína, previamente construída.

A curva padrão de L-cisteína (dados não apresentados) foi construída a partir da utilização de diferentes concentrações do aminoácido L-cisteína, o qual reage diretamente com o DTNB sem que seja necessária a hidrólise da molécula ou qualquer reação enzimática.

2.4 Medidas bioquímicas de avaliação da função colinérgica e serotoninérgica

Todas as medidas bioquímicas realizadas em animais em PN10 ou PN63 foram corrigidas pela concentração de proteína total presente no tecido (no caso das enzimas ensaiadas) ou de proteínas de membrana presentes no preparado de membrana (no caso dos receptores analisados). As proteínas foram medidas por ensaio do ácido bicinconínico (BCA).

Preparação tecidual: Os tecidos foram descongelados, e homogeneizados em tampão Tris a 50mM na diluição de 20x (19 volumes de tampão por massa de tecido) utilizando um homogeneizador tipo Ultra-Turrax T10 *basic*. Uma alíquota deste homogenado foi separada para o ensaio da atividade da colina acetil transferase (ChAT) e para quantificação do teor total de proteínas presente no tecido. Somente em PN63, uma segunda alíquota deste homogenado foi utilizada para medir a atividade da AChE. O restante do tecido homogeneizado foi então sedimentado através de centrifugação a 39000 x g durante 15 min. O pellet gerado foi ressuspensionado com adição do mesmo volume de tampão que o originou e novamente homogeneizado. A seguir o tecido foi novamente centrifugado e novamente ressuspensionado no mesmo tampão, mas desta vez com ¼ do volume original e utilizando um pistilo de teflon (*Teflon pestle*). O homogenado final, chamado de fração de membrana, foi utilizado para a quantificação de proteínas de membrana e obtenção das demais medidas colinérgicas: Ligação ao transportador

colinérgico pré-sináptico; e serotoninérgicas: Ligação ao receptor 5HT1A, ao receptor 5HT2 e ao transportador serotoninérgico pré-sináptico, descritas abaixo.

Ligação ao transportador colinérgico pré-sináptico: Ligação do Hemicolinium-3 (HC3) marcado radioativamente (HC-3 tritiado ao transportador pré-sináptico de colina

Após o processo de homogeneização tecidual e obtenção da fração de membrana, uma parte do homogenado foi separada para quantificação do transportador pré-sináptico de colina. A partir desta alíquota, amostras iguais foram diluídas e distribuídas a quatro tubos de ensaio, duas das quais receberam uma solução TOTAL (contendo apenas o ligante específico do transportador, [³H]HC-3 e a solução de tamponamento de pH a 7,4) e outras duas que receberam uma solução NÃO-ESPECÍFICA (que, além do HC-3 acoplado ao trítio radioativo, contém uma alta concentração do ligante HC-3 não-tritiado). Todas as amostras foram incubadas por 20min a 20°C em tampão fosfato (pH 7,4) e 150mM de NaCl com adição de 2nM de [³H]HC-3 em volume final de 1mL. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à ultra-filtração no *Cell Harvester* (Brandel, Gaithersburg, Maryland, EUA) para que os complexos ligante-proteína presentes nas membranas celulares ficassem presos a filtros aderentes. Os papéis de filtro foram previamente tratados com solução de polietilamina a 0,1% por, no mínimo, 30 minutos. As porções de filtro referentes a cada amostra foram coletadas e guardadas em tubos plásticos com adição de 5mL de líquido cintilográfico por pelo menos 12h. A leitura da emissão radioativa é realizada por espectrometria de cintilação líquida.

A função da solução NÃO-ESPECÍFICA é o preenchimento de todos os sítios específicos de ligação presentes no transportador com o HC-3 não-tritiado, para garantir que a leitura de emissão radioativa nestes tubos, ao final do experimento, seja decorrente apenas de ligações inespecíficas do HC-3 tritiado a outras proteínas membranares. Assim, a ligação especificamente ao transportador pré-sináptico é dada pela diferença entre a média das duas primeiras amostras e o valor obtido na segunda, ou seja: leitura TOTAL menos NÃO-ESPECÍFICA. O valor encontrado para marcação específica é corrigido pela concentração de proteínas de membrana presente na amostra. Desta forma, os valores finais são apresentados como marcação específica por miligrama de proteína de membrana.

Atividade da colina acetiltransferase: Para avaliação da atividade da ChAT, amostras contendo 44 μL do homogenato geral, ou seja, da suspensão obtida na primeira homogeneização tecidual, foram diluídas em tampão fosfato (pH 7,9) e distribuídas em triplicatas. A cada tubo da triplicata foi adicionada uma mistura (“MIX”) contendo NaCl a 200mM, MgCl_2 a 17mM, EDTA a 1mM, Triton X-100 a 0,2% em tampão, fisostigmina a 0,12mM, albumina de soro bovino a 0,6mg/ml, cloreto de colina a 20mM e $[^{14}\text{C}]$ acetil-coenzima A a 50mM. Aos “brancos” da reação, foi adicionado tampão de diluição no mesmo volume de tecido que foi adicionado às triplicatas do ensaio, mais o “MIX”. Todos os tubos, entre amostras e brancos, em triplicata, foram pré-incubados por 15min a 4°C e em seguida foram incubados por 30min a 37°C . Sob estas condições a reação enzimática se passa durante o período de incubação e a ChAT presente no tecido catalisa a reação de síntese da acetilcolina a partir da $[^{14}\text{C}]$ acetil-coenzima A e colina fornecidas às amostras. Uma vez que o substrato de ação da enzima está marcado radioativamente, o produto da reação medido ao final também está, ou seja, há formação de moléculas de acetilcolina acopladas ao átomo de ^{14}C . A fração contendo acetilcolina marcada foi extraída por centrifugação e o sobrenadante foi transferido para tubos plásticos especiais (*vials*) e a eles foi adicionado líquido cintilográfico. A emissão radioativa foi mensurada por espectrometria de cintilação líquida. A atividade da enzima foi expressa em relação à concentração de proteínas totais presentes no tecido.

Ligação ao receptor 5HT1A: Para ligação ao receptor 5HT1A, as amostras de tecido, subdivididas em alíquotas que receberam ou solução TOTAL ou solução NÃO-ESPECÍFICA foram incubadas com $[^3\text{H}]$ 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina ($[^3\text{H}]$ 8-OH DPAT) na concentração de 1nM a 25°C por 30 minutos em tampão Tris a 50mM (pH 8) contendo MgCl_2 a 0,5 mM e ascorbato de sódio a 0,5 mM. A solução NÃO-ESPECÍFICA contém serotonina em alta concentração (100 μM) para deslocar o sítio de ligação específico.

Ligação ao receptor 5HT2: Para a ligação ao receptor 5HT2, as amostras foram incubadas com $[^3\text{H}]$ ketanserina a 0,4nM a 37°C durante 15 minutos em tampão Tris,

50 mM (pH7,4). Para deslocar o sítio de ligação específico do receptor foi adicionado metilsergídeo em alta concentração (10 μ M).

Ligação ao transportador 5HTT: Para a ligação ao transportador pré-sináptico de serotonina, as amostras de tecidos foram incubadas com [³H]Paroxetina a 85pM por 2horas a 20°C em tampão Tris, 50mM (pH 7,4) contendo NaCl a 120mM e KCl a 5mM. Da mesma forma que para o ensaio do receptor 5HT1A, a solução NÃO-ESPECÍFICA contém serotonina em alta concentração (100 μ M) para deslocar o sítio de ligação ao transportador.

Todas as reações para avaliação do sistema serotoninérgico foram interrompidas por adição do tampão de incubação gelado e as amostras foram submetidas à ultra-filtração no *Cell Harvester* (Brandel, Gaithersburg, Maryland, EUA). Os papéis de filtro referentes a cada amostra foram coletados e a eles foram adicionados 5mL de líquido cintilográfico. A leitura da emissão radioativa foi realizada por espectrometria de cintilação líquida.

De forma análoga à quantificação da atividade do transportador pré-sináptico de colina, os valores de ligação específica aos receptores e transportador serotoninérgico foram calculados a partir da diferença entre a solução TOTAL menos a NÃO-ESPECÍFICA e os valores apresentados foram corrigidos pela concentração de proteínas de membrana.

2.5 Medidas comportamentais

Os animais a partir de PN60 foram submetidos aos testes comportamentais que avaliam alterações do humor (labirinto em cruz elevado, campo aberto, teste do nado forçado e teste da suspensão pela cauda), cognitivas (teste da esQUIVA inibitória e labirinto em cruz elevado) e locomotoras (caixa de atividade). Os testes comportamentais eram realizados na seguinte sequência: Primeiro dia: Labirinto em cruz elevado, sempre realizado à tarde; segundo dia: teste da caixa de atividade ou campo aberto pela manhã e teste do nado forçado à tarde (com intervalo de 4 horas entre os testes); terceiro dia: teste da suspensão pela cauda, realizado à tarde;

quarto dia: teste da esquivia inibitória, com uma primeira etapa realizada pela manhã e a segunda etapa realizada a tarde.

2.5.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado é uma das formas de detecção de alterações nos níveis ansiedade mais amplamente utilizado em modelo animal (Carobrez e Bertoglio, 2005). O teste consiste em colocar o animal em um aparelho acrílico de cor cinza constituído por 2 plataformas estreitas, perpendiculares entre si e em formato de cruz, compondo 4 braços. Dois destes braços, dispostos de modo especular, têm as laterais e extremidades fechadas por paredes acrílicas opacas (braços fechados) enquanto os outros dois são livres da presença de paredes (braços abertos). Desse modo os animais podem explorar livremente qualquer braço, cruzar de um lado para outro ou ainda permanecer no centro (ponto de interseção entre os 4 braços). As expressões comportamentais observadas no LCE representam uma combinação de comportamentos exploratórios e de esquivia, assim como de atividade geral (Carobrez e Bertoglio, 2005). O aparelho tem como medidas 31cm de altura. Os braços apresentam 6cm de largura, 67cm de comprimento e, no caso dos braços fechados, as paredes apresentam 16cm de altura (a partir da base do braço).

O animal é colocado no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados e seu comportamento é monitorado por uma câmera de vídeo por 10 minutos.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo de permanência dos animais nos braços abertos e braços fechados assim como número de entradas nos braços abertos e braços fechados; para tal foi utilizado o programa ACC PlusM 102 Avaliação Computadorizada de Comportamento (desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia/DCF/IBRAG/UERJ). A partir destas medidas, foram quantificados o percentual de tempo nos braços abertos e o percentual de entradas nos braços abertos.

O percentual de tempo nos braços abertos (BA) e o percentual de entradas nos braços abertos foram utilizados como medidas de ansiedade (Pellow et al., 1985; Lal *et al.*, 1991). A avaliação do comportamento associado à ansiedade baseia-se na observação de que o BA constitui um ambiente aversivo para o animal, no qual ele está sujeito à queda e desprotegido, e a permanência nesta condição indica que o animal está menos ansioso e, portanto, se arrisca mais explorando todos os braços do aparelho. O número de entradas nos braços fechados (BF) foi utilizado como medida de atividade, enquanto que o tempo em que os animais permaneciam no centro do aparelho foi utilizado como indicação de comportamento de tomada de decisão (Rodgers *et al.*, 1997).



Figura 4. Teste do labirinto em cruz elevado

2.5.2 Caixa de atividade ou teste do campo aberto

O teste da caixa de atividade ou campo aberto consiste em colocar o animal em uma caixa retangular, a qual ele pode explorar livremente por 10 minutos. A caixa tem como dimensões externas 50cm de comprimento, 48cm de altura e 50cm de profundidade. Este teste é amplamente empregado para avaliar atividade motora e exploratória dos animais e, secundariamente, é capaz também de identificar comportamento associado à ansiedade.

A atividade locomotora dos animais é realizada através do registro automático da distância em centímetros percorrida por cada animal a cada minuto durante 10 minutos. O aparelho registra o deslocamento dos animais através de feixes de luz infravermelho que ao serem interrompidos pelo corpo do animal determinam sua

localização na área do aparelho a todo momento. O aparelho possui 16 saídas de raios infravermelhos de dois lados do aparelho, posicionados de forma ortogonal.

Em adição à medida de atividade locomotora, neste teste, o tempo de permanência no centro foi usado como indicador de comportamento associado à ansiedade. Essa medida é frequentemente relacionada ao comportamento ansioso e se baseia na observação de que o aumento do tempo que o animal permanece no centro do aparelho (local que oferece mais riscos e no qual o animal encontra-se mais desprotegido) sugere uma diminuição de ansiedade e vice-versa (Prut and Belzung, 2003; Filgueiras *et al.*, 2009).



Figura 5. Caixa de atividade

2.5.3 Teste do nado forçado

No teste no nado forçado (*forced swimming test*), cada camundongo foi submetido a uma sessão de 10 minutos de nado forçado. O procedimento do teste é descrito em detalhes em Filgueiras *et al.* (2006). Neste teste, cada camundongo foi colocado em um recipiente de plástico (diâmetro=21cm, altura=23cm) preenchido com água (altura da coluna d'água=16cm) a uma temperatura de aproximadamente 25°C. O comportamento do animal foi continuamente registrado ao longo da sessão através de uma câmera de vídeo.

A imobilidade dos animais foi medida a partir do material gravado. O tempo que os animais permaneciam flutuando com as patas e a cauda imóveis representou a

medida de imobilidade e foi utilizada como medida de comportamento associado à depressão. O tempo que os animais permanecem imóveis pode representar uma perda de motivação semelhante à encontrada como sintoma clássico do quadro depressivo humano e é classicamente considerado um indicador de comportamento depressivo em modelo animal.

Animal nadando ativamente**Animal imóvel**

Figura 6. Teste do nado forçado

2.5.4 Teste da suspensão pela cauda

No teste da suspensão pela cauda (*tail suspension test*) os camundongos foram individualmente suspensos pela cauda, que era presa em uma haste de ferro com o auxílio de uma fita adesiva cirúrgica (Steru *et al.*, 1985; Shaw *et al.*, 2007). A imobilidade dos animais foi medida a partir do material gravado. O tempo que os camundongos permaneciam com as patas e o tronco imóveis representou a medida de imobilidade e foi utilizada como medida de comportamento associado à depressão. De forma análoga ao teste do nado forçado, o aumento do tempo que os animais permanecem sob a condição imóvel, indica uma possível apatia e perda de motivação, que pode ser interpretada como comportamento depressivo.

Animal em movimento de escape**Animal imóvel**

Figura 7. Teste da suspensão pela cauda

2.5.4 Teste da esquiiva inibitória

O teste da esquiiva inibitória (*Step-down Passive Avoidance*) é realizado em uma caixa (25cm x 30cm) com uma plataforma circular com diâmetro de 6,5cm e altura de 2cm, posicionada centralmente sobre uma grade metálica (espaçamento de 1 cm entre as barras de 2 mm de diâmetro). No primeiro teste, os animais são individualmente colocados sobre a plataforma e, imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica, recebem um choque de 0,2 mA durante 2 segundos. No segundo teste, os animais são recolocados na plataforma 3h após o primeiro teste. As latências de descida da plataforma (L0 e L3) são medidas nos dois momentos sendo que quanto maior o aumento na latência do 1º para o 2º teste melhor a medida de memória/aprendizado. Como forma de corrigir as diferenças de latência para descida apresentadas pelos animais já no primeiro teste, foi utilizada a medida de correção para comparação entre os grupos: $(L3 - L0) / L0$.



Figura 8. Teste da esquiva inibitória

2.6 Análise estatística

Atividade da AChE: A análise dos dados obtidos pela exposição a metamidofós e a clorpirifós foi realizada de forma independente. Tanto para os animais expostos a metamidofos como a clorpirifos no período neonatal (PN10), os dados foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA), na qual a *Dose* (DMaior, DInt ou DMenor e CT MET ou CT CPF), a *Região Cerebral* (córtex e tronco encefálico) e o *Sexo* foram usados como fatores. Para os animais avaliados na idade adulta (PN63), foram realizadas ANOVAs com todos os fatores- *Tratamento* (MET e CT MET ou CPF e CT CPF), *Região Cerebral* (córtex e tronco) e *Sexo*.

Biomarcadores colinérgicos e serotoninérgicos. A análise estatística dos dados obtidos dos grupos MET e CT MET foi realizada de forma independente daquela realizada para os grupos CPF e CT CPF. Os resultados foram avaliados primeiro por ANOVAs com medidas repetidas (rANOVAs) com todos os fatores: *Tratamento* (MET e CT MET ou CPF e CT CPF), *Idade* (PN10 e PN63), (*Região Cerebral* (córtex e tronco) e *Sexo*). Para cada OP, a primeira rANOVA, as *Medidas colinérgicas* (ChAT e Ch transporter) foram consideradas como fator de repetição. Para a segunda rANOVA, as *Medidas serotoninérgicas* (receptor 5HT_{1A}, receptor 5HT₂ e transportador 5HTT) foram considerados como fator de repetição.

Testes comportamentais. A análise estatística dos dados obtidos dos grupos MET e CT MET foi realizada de forma independente daquela realizada para os

grupos CPF e CT CPF. Os resultados foram avaliados por ANOVAs. O *Tratamento* e o *Sexo* foram considerados fatores na análise. Para o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), as medidas Percentual do tempo nos braços abertos (%Tempo BA) e de Percentual de entradas nos braços abertos (%Ent BA), foram consideradas como fator de repetição. Foram realizadas ANOVAs separadas das Entradas no braço fechado e do Tempo no centro. Para o teste do Campo Aberto foram realizadas ANOVAs com a distância percorrida pelos animais e o tempo de permanência no centro (cada uma em um momento) sendo consideradas como variáveis. Para o Teste do Nado Forçado (FST) e da Suspensão pela Cauda (TSC), ANOVAs separadas do Tempo de imobilidade foram realizadas. Para o Teste da esQUIVA inibitória, foi realizada uma ANOVA para o índice (L3-L0)/L0.

Sempre que as ANOVAs indicavam efeitos do tratamento que diferissem entre os vários fatores, regiões cerebrais, idade e/ou sexo, os dados eram re-examinados separadamente usando ANOVAs de menor ordem. Os dados foram log-transformados sempre que a variância era heterogênea. Todos os resultados significativos foram descritos na sessão de resultados, no entanto, apenas o resultado direto das análises de menor ordem foi representado nas figuras. A significância foi assumida quando o valor de prova (P) era menor do que 0,05 para os efeitos de Tratamento, o fator de maior interesse. Para interações entre Tratamento e os demais fatores, visando avaliar se os efeitos eram mantidos após a subdivisão dos fatores da interação, realizávamos ANOVAs de menor ordem quando $P < 0,1$, (Snedecor and Cochran, 1967). Após esta subdivisão dos fatores, $P < 0,05$ era assumido como nível de significância para os efeitos de Tratamento.

Todos os resultados da exposição a MET ou a CPF são apresentados como percentuais do seu respectivo grupo controle (controles das ninhadas do MET ou CT MET e controle das ninhadas do CPF ou CT CPF). Apesar disso, os dados foram avaliados estatisticamente a partir dos valores brutos originais de cada medida bioquímica ou comportamental. Estes valores originais dos grupos controle são apresentados nas Tabelas 2 e 3.

3 RESULTADOS

3.1 Primeira etapa: curva dose-resposta de inibição da AChE após exposição neonatal a metamidofós e clorpirifós (Tabela 1)

3.1.1 Metamidofós

A ANOVA univariada com todos os fatores (*Dose, Região Cerebral e Sexo*) detectou uma inibição dose-dependente da atividade da AChE (*Dose: $F_{3,109}=61.0$, $P<0.001$*), medida 24 horas após a exposição a metamidofós no período neonatal. Não houve diferenças significativas entre as inibições de machos e de fêmeas. Para verificar os efeitos específicos sobre cada região, foram realizadas ANOVAs de menor ordem para cada região em separado. A exposição à metamidofós promoveu uma inibição enzimática proporcional às doses usadas tanto no córtex cerebral (*Dose: $F_{3,55}=40.8$, $P<0.001$*) quanto no tronco encefálico (*Dose: $F_{3,54}=25.7$, $P<0.0010$*). Em ambas as regiões, a Dose Intermediária e a Maior Dose de metamidofós causaram inibições significativas quando comparadas ao seu respectivo grupo controle ($P<0.001$) para todas as comparações), enquanto a inibição promovida pela Menor Dose de metamidofós foi significativa apenas no tronco encefálico ($P=0.005$).

A Dose Intermediária de metamidofós promoveu 20% de inibição da AChE no córtex e 18.7% no tronco. Em fêmeas, a inibição promovida no córtex foi de 23.4% e em machos de 18% e no tronco as inibições atingiram 23.6% e 16% em fêmeas e machos, respectivamente. Deste modo, a Dose Intermediária promoveu um percentual de inibição de cerca de 20% da atividade enzimática e, por isso, foi selecionada para ser usada na etapa seguinte do estudo, na qual outros aspectos da função colinérgica, a função serotoninérgica e alguns comportamentos dos animais foram avaliados.

3.1.2 Clorpirifós

Para a exposição neonatal à clorpirifós, analisada também através de ANOVA univariada considerando a Dose, a Região Cerebral e o Sexo como fatores, houve uma interação significativa entre a Dose administrada e o Sexo ($F_{3,78}=6,2$, $P=0,0008$) e também entre a Dose e a Região ($F_{3,78}=3,4$, $P=0,021$). Nós então subdividimos os dados por Sexo e por região e reexaminamos os resultados por ANOVAs de menor ordem. Detectamos assim interações significativas entre a Dose e o Sexo tanto no córtex cerebral ($F_{3,38}= 2,9$, $P=0,045$) quanto no tronco encefálico ($F_{3,40}=4,5$, $P=0,008$). No córtex cerebral, a D_{Maior} causou inibição significativa em relação ao controle ($P=0,011$) e no tronco encefálico, todas as doses usadas causaram inibições significativas em fêmeas (D_{Menor}: $P=0,0045$; D_{Int}: $P=0,035$; D_{Maior}: $P<0,0001$) enquanto em machos a maior dose administrada causou inibição significativa em relação ao grupo controle ($P=0,047$).

A maior dose de clorpirifós administrada promoveu 18% e 22% de inibição da atividade enzimática no córtex e tronco encefálico respectivamente. As fêmeas expostas a esta dose tiveram níveis maiores de inibição: em torno de 30%, tanto no córtex quanto no tronco. E os machos tiveram aproximadamente 4% no córtex e 14% no tronco. Optamos, então, por utilizar esta dose nas etapas seguintes do estudo, uma vez que as inibições encontradas, embora diferentes para machos e fêmeas, foram abaixo da dose necessária para detectar sintomas de crise colinérgica.

Tabela 1. Atividade da AChE 24h após o término do tratamento

<i>Atividade enzimática durante a exposição a MET</i>									
	DMenor			DInt			Dmaior		
	Fêmea	Macho	Ambos	Fêmea	Macho	Ambos	Fêmea	Macho	Ambos
Córtex	-11,6±4,6	-3,4±2,7	-3,5±3,1	-23,4±2,9	-18,0±2,1	-19,9±1,7	-34,2±2,9	-32,9±1,9	-33,4±1,6
Tronco	-16,0±5,4	-6,5±1,8	-9,8±2,9	-23,6±3,7	-16,0±3,1	-18,7±2,3	-32,4±3,5	-22,5±2,8	-26,2±2,1
<i>Atividade enzimática durante a exposição a CPF</i>									
	DMenor			DInt			Dmaior		
	Fêmea	Macho	Ambos	Fêmea	Macho	Ambos	Fêmea	Macho	Ambos
Córtex	-13,5±4,1	-2,7±4,9	-7,9±3,1	-18,1±3,1	4,8±3,8	-6,3±3,0	-28,6±4,1	-3,9±3,7	-18,1±3,8
Tronco	-17,0±3,7	-10,7±3,7	-22,0±3,2	-12,0±2,1	-10,5±4,0	-0,3±2,3	-30,4±2,7	-13,9±7,4	-22,0±3,2

Efeitos da exposição neonatal a Metamidofós ou a Clorpirifós sobre a atividade da AChE apresentados em percentual do grupo controle. Os valores marcados em negrito indicam as inibições promovidas pelas doses escolhidas de cada pesticida. DMenor: menor dose usada (0.25mg/kg); DInt: dose intermediária (IntD, 1mg/kg); Dmaior: maior dose usada no estudo (3mg/kg); MET, metamidofós; CPF, clorpirifós.

Os resultados bioquímicos e comportamentais apresentados no presente estudo são apresentados como percentuais do controle. No entanto, para efeitos de visualização das dimensões das medidas analisadas, os valores brutos dos grupos controle relativos a cada pesticida (grupos CT MET e CT CPF) são apresentados como MÉDIA±EPM nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Valores brutos dos biomarcadores colinérgicos, biomarcadores serotoninérgicos e medidas comportamentais para o grupo CT MET

		Córtex					
		PN10			PN63		
		Fêmeas	Machos	Ambos	Fêmeas	Machos	Ambos
AChE		295,0±24,0	292,2±9,2	293,2±9,6	840,9±26,1	795,1±23,8	819,5±18,2
ChAT		0,23±0,02	0,22±0,01	0,22±0,01	1,40±0,05	1,26±0,06	1,33±0,04
ChT		43,4±1,6	44,2±1,5	43,8±1,1	103,5±4,6	111,2±3,7	107,3±3,0
5HT _{1A}		32,8±2,8	27,2±0,6	29,7±1,6	45,3±0,8	39,4±1,1	42,3±1,0
5HT ₂		29,3±1,5	23,2±0,9	25,9±1,3	59,6±1,7	56,4±2,0	58,0±1,3
5HTT		139,3±3,6	141,1±7,6	140,3±4,3	183,2±5,3	172,0±7,2	177,6±4,5
		Tronco					
		PN10			PN63		
		Fêmeas	Machos	Ambos	Fêmeas	Machos	Ambos
AChE		432,7±16,7	385,9±4,9	401,5±8,5	100,5±3,5	97,5±2,2	98,9±2,0
ChAT		0,45±0,01	0,47±0,03	0,46±0,02	0,63±0,02	0,57±0,02	0,60±0,02
ChT		34,5±1,5	41,9±1,4	38,7±1,4	24,3±0,6	25,6±0,5	25,0±0,4
5HT _{1A}		12,9±1,2	14,7±0,7	14,1±0,7	23,2±0,7	22,1±0,7	22,7±0,5
5HT ₂		27,7±3,0	26,7±2,1	27,0±1,7	7,5±0,2	4,9±0,4	6,2±0,4
5HTT		211,4±5,4	219,7±13,1	216,9±8,7	109,6±4,3	108,7±4,6	109,2±3,1
		Comportamento					
		Fêmeas		Machos		Ambos	
LCE	%Tempo BA	4,1±1,2		1,7±0,5		2,8±0,7	
	%Entradas BA	10,5±2,9		6,8±2,1		8,6±1,8	
	Tempo Cen	82,8±10,9		82,5±9,7		82,6±7,2	
	Entradas BF	9,6±1,2		8,9±0,9		9,2±0,7	
CA	Ambulação CA	1716,9±149,7		1830,5±151,8		1763,2±106,7	
	Tempo Cen CA	32,4±4,5		31,3±6,3		31,9±3,6	
TNF	Tempo de Imob	7,8±4,6		22,9±8,5		15,7±5,2	
EP	(L3-L0)/L0	2,3±0,7		1,3±0,3		1,9±0,5	

Marcadores bioquímicos: AChE (nmoles/min/mg de proteína); ChAT, (fmol/mg de proteína/min); ChT, 5HT_{1A}, 5HT₂ and 5HTT (fmol/mg de proteína). AChE, acetilcolinesterase; ChAT, colina acetiltransferase; ChT, transportador pré-sináptico de colina de alta afinidade; 5HTT, transportador 5HT.

Medidas comportamentais: Tempo Cen (segundos); Ambulação (centímetros); Tempo de Imob (segundos). LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto; TNF: Teste do Nado Forçado; EP: teste da Esquiva passiva. %Tempo BA: percentual de tempo nos braços abertos; %Entradas BA: percentual de entradas nos braços abertos; Tempo Cen: tempo no centro; Tempo de Imob: tempo de imobilidade.

Tabela 3. Valores brutos dos biomarcadores colinérgicos, biomarcadores serotoninérgicos e medidas comportamentais para o grupo CT CPF

		Córtex					
		PN10			PN63		
		Fêmeas	Machos	Ambos	Fêmeas	Machos	Ambos
AChE		254,3±25,3	228,6±5,1	240,3±11,8	745,8±35,08	749,2±39,7	747,4±25,4
ChAT		0,22±0,01	0,22±0,01	0,22±0,01	1,17±0,04	1,21±0,05	1,19±0,03
ChT		36,7±2,3	43,9±3,4	40,3±2,2	89,3±4,4	90,5±3,6	89,9±2,7
5HT _{1A}		26,5±1,3	28,3±2,2	27,5±1,3	50,9±2,0	38,3±1,8	44,7±2,1
5HT ₂		29,9±2,6	28,8±2,0	29,3±1,5	63,5±3,2	53,9±2,1	58,7±2,2
5HTT		142,8±6,6	149,4±7,5	146,8±5,07	181,2±7,0	165,4±4,4	173,3±4,5
		Tronco					
		PN10			PN63		
		Fêmeas	Machos	Ambos	Fêmeas	Machos	Ambos
AChE		422,3±24,1	356,6±12,8	383,9±15,3	476,0±21,1	472,58±21,8	474,2±14,6
ChAT		0,44±0,02	0,46±0,02	0,45±0,02	0,68±0,02	0,53±0,02	0,60±0,02
ChT		34,2±2,8	39,8±2,5	37,4±1,9	23,0±0,6	21,8±0,9	22,4±0,5
5HT _{1A}		12,9±0,5	12,6±0,6	12,8±0,4	17,0±0,5	16,7±0,9	16,8±0,5
5HT ₂		36,1±1,5	28,6±2,5	32,7±1,7	8,2±0,5	6,8±0,3	7,5±0,3
5HTT		259,0±25,7	189,5±6,6	220,3±16,5	119,2±3,8	102,5±4,1	110,8±3,5
		Comportamento					
		Fêmeas		Machos		Ambos	
LCE	%Tempo BA	3,5±1,2		5,7±1,6		4,5±0,9	
	%Entradas BA	11,8±2,7		10,0±2,5		11,0±1,8	
	Tempo Cen	50,6±4,4		75,6±8,4		62,2±5,1	
	Entradas BF	9,1±1,6		15,8±1,8		12,3±1,3	
CA	Ambulação CA	1627,6±61,9		1862,5±171,9		1737,2±87,8	
	Tempo Cen CA	25,0±4,6		31,6±2,8		28,3±2,7	
TNF	Tempo de Imob	15,5±3,8		14,3±3,8		14,9±2,7	
EP	(L3-L0)/L0	5,9±1,4		0,9±0,3		3,7±0,9	

Marcadores bioquímicos: AChE (nmoles/min/mg de proteína); ChAT, (fmol/mg de proteína/min); ChT, 5HT_{1A}, 5HT₂ and 5HTT (fmol/mg de proteína). AChE, acetilcolinesterase; ChAT, colina acetiltransferase; ChT, transportador pré-sináptico de colina de alta afinidade; 5HTT, transportador 5HT.

Medidas comportamentais: Tempo Cen (segundos); Ambulação (centímetros); Tempo de Imob (segundos). LCE: Labirinto em Cruz Elevado; CA: Campo Aberto; TNF: Teste do Nado Forçado; EP: teste da Esquiva passiva. %Tempo BA: percentual de tempo nos braços abertos; %Entradas BA: percentual de entradas nos braços abertos; Tempo Cen: tempo no centro; Tempo de Imob: tempo de imobilidade.

3.2 Segunda etapa: estudo dos efeitos neuroquímicos e comportamentais de baixas doses de MET e CPF

3.2.1 Efeitos sobre o peso corporal dos animais

A ANOVA de repetição, considerando o Dia de injeção do pesticida como fator de repetição, não identificou alterações no peso corporal dos animais durante o período de exposição a 1mg/kg de metamidofós.

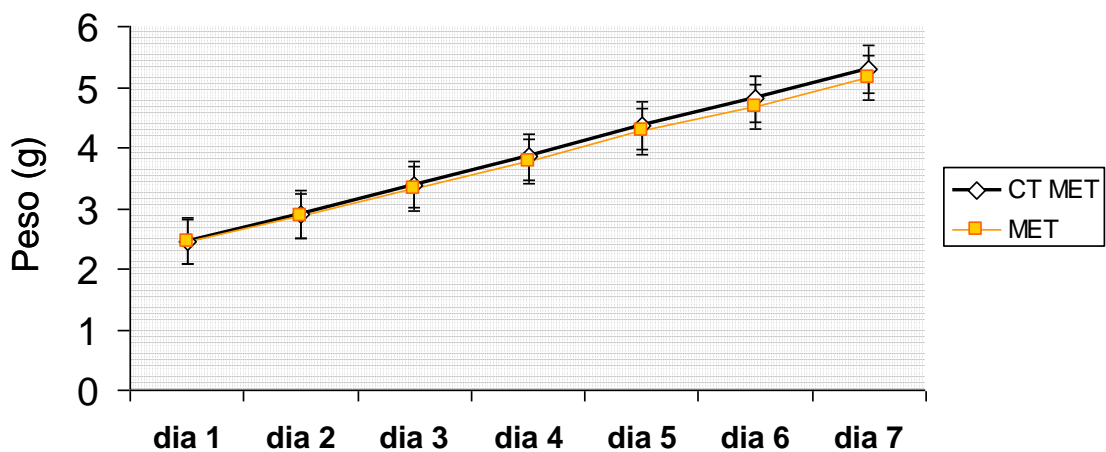


Figura 9. Variação de peso corporal durante a exposição a metamidofós

De modo semelhante, a exposição diária a 3mg/kg de clorpirifós também não alterou o ganho de peso dos neonatos.

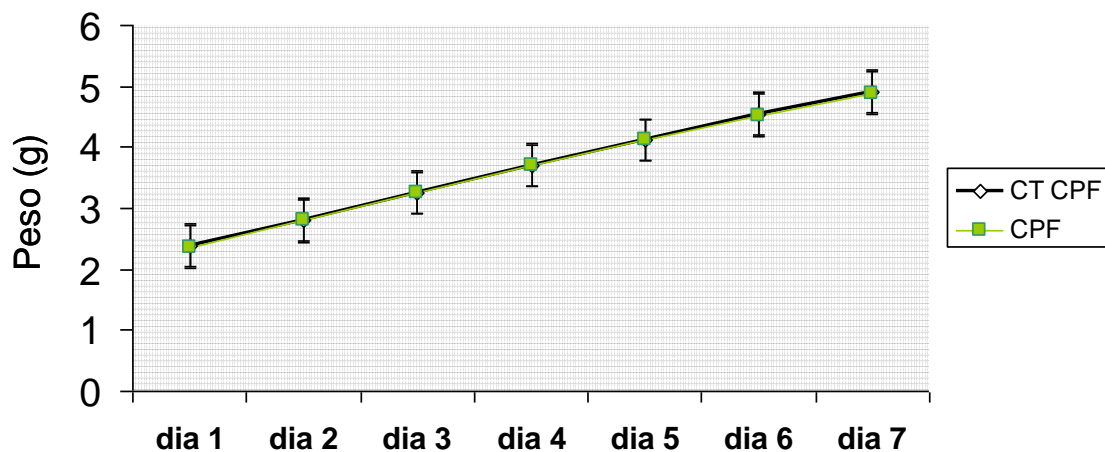


Figura 10. Variação de peso corporal durante a exposição a clorpirifós

3.2.2 Análises globais dos biomarcadores colinérgicos e serotoninérgicos

Exposição a metamidofós:

Para a exposição à metamidofós, a ANOVA de repetição (rANOVA) do **sistema colinérgico** considerando como fatores os biomarcadores colinérgicos (ChAT e transportador colinérgico), os tratamentos, as regiões cerebrais, as idades e os sexos, identificou interações entre *Tratamento e Idade* ($F_{1,142} = 4,2$; $P = 0,04$), *Tratamento, Medida Colinérgica e Sexo* ($F_{1,142} = 4,9$; $P = 0,03$) e entre *Tratamento, Medida Colinérgica, Região e Sexo* ($F_{1,142} = 2,9$; $P = 0,09$). A rANOVA para as medidas do **sistema serotoninérgico** considerando os mesmos fatores como medidas de repetição, detectou interações significativas entre *Tratamento, Idade e Sexo* ($F_{1,238} = 3,7$; $P = 0,071$), entre *Tratamento, Região, Idade e Sexo* ($F_{1,238} = 3,3$; $P = 0,055$), entre *Medida Serotoninérgica, Tratamento, Idade e Sexo* ($F_{2,238} = 2,9$; $P = 0,055$) e *Medida Serotoninérgica, Tratamento, Região, Idade e Sexo* ($F_{2,238} = 3,7$; $P = 0,026$).

Exposição a clorpirifós:

Para as animais expostos a clorpirifós, da mesma forma que para os expostos a metamidofós, foram considerados para a análise global dos dados os tratamentos, as regiões cerebrais, as idades e os sexos na rANOVA tanto para avaliação do sistema colinérgico como para o sistema serotoninérgico. Foram detectadas interações significativas, no **sistema colinérgico**, entre o *Tratamento, Idade e Sexo* ($F_{1,145} = 8,9$; $P = 0,032$), entre *Tratamento, Região e Sexo* ($F_{1,145} = 2,7$; $P = 0,098$) e entre *Medida colinérgica, Tratamento e Sexo* ($F_{1,145} = 3,0$; $P = 0,085$). No **sistema serotoninérgico**, foram detectadas interações significativas entre o *Tratamento, Medida Serotoninérgica e Idade* ($F_{2,238} = 2,9$; $P = 0,052$) e entre *Tratamento, Medida Serotoninérgica, Idade e Sexo* ($F_{2,238} = 3,9$; $P = 0,021$).

Devido às interações identificadas em ambas as rANOVAs e para ambos os pesticidas, nós separamos os dados pelas medidas colinérgicas e serotoninérgicas individuais, pelas regiões cerebrais e pelas idades e os reexaminamos. Após as subdivisões dos dados, nós incluímos mantivemos o Sexo como fator nas análises.

3.2.3 Efeitos durante o desenvolvimento sobre o sistema colinérgico

A exposição neonatal aos pesticidas metamidofós e clorpirifós não alterou a atividade da ChAT em relação ao controle (FIGURA 11) nas regiões cerebrais analisadas neste estudo, logo após o final da exposição aos pesticidas.

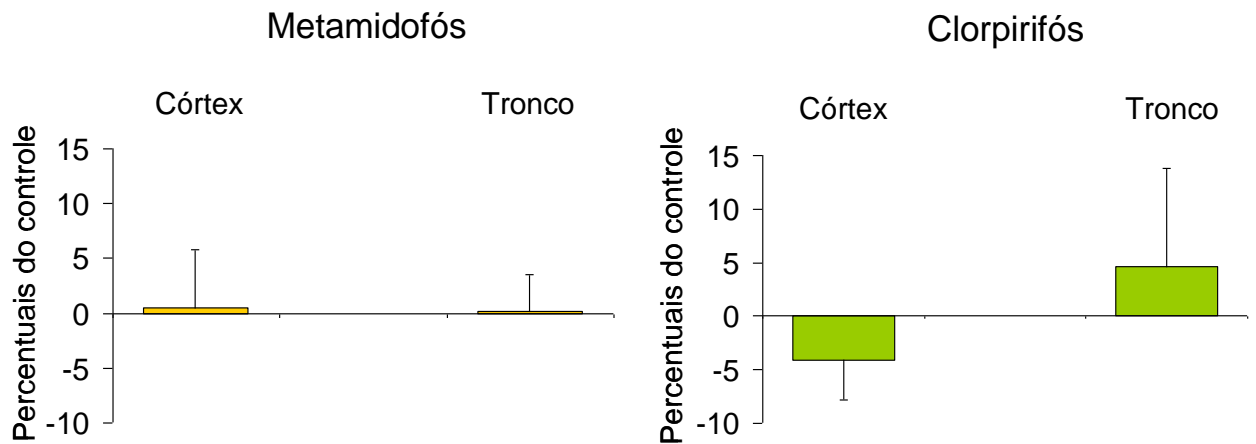


Figura 11. Atividade da ChAT no período neonatal

Conforme apresentado na FIGURA 12, a ligação ao transportador pré-sináptico de colina foi significativamente aumentada no tronco encefálico logo após exposição a metamidofós apenas em fêmeas ($F_{1,13} = 21,6$; $P = 0,0005$). A exposição a clorpirifós, por outro lado, promoveu aumento significativo da ligação ao transportador colinérgico apenas no córtex cerebral das fêmeas ($F_{1,14} = 8,3$; $P = 0,012$), enquanto machos apresentaram uma tendência de redução da atividade quando comparados aos controles ($F_{1,14} = 3,3$; $P = 0,088$).

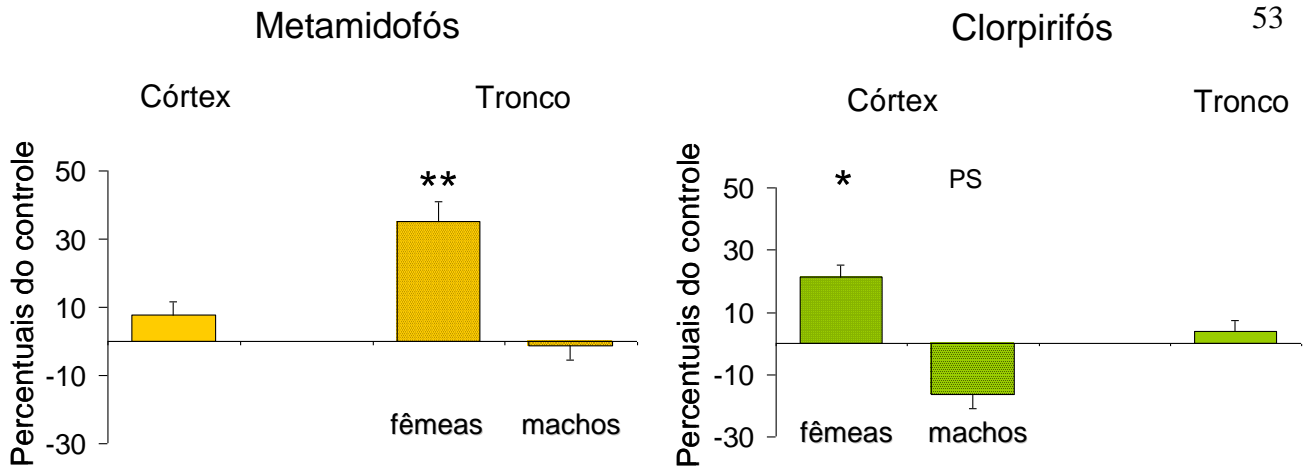


Figura 12. Ligação ao transportador pré-sináptico colinérgico no período neonatal

3.2.4 Efeitos durante o desenvolvimento sobre o sistema serotoninérgico

Não foram detectadas alterações significativas na ligação ao receptor serotoninérgico 5TH1A logo após a exposição a metamidofós nas regiões analisadas. Ao passo que a exposição a clorpirifós causou um aumento significativo da ligação ao receptor 5TH1A no tronco encefálico das fêmeas em relação ao controle ($F_{1,9} = 6,7$; $P=0,03$) (FIGURA 13). No córtex cerebral, clorpirifós também não causou alterações significativas.

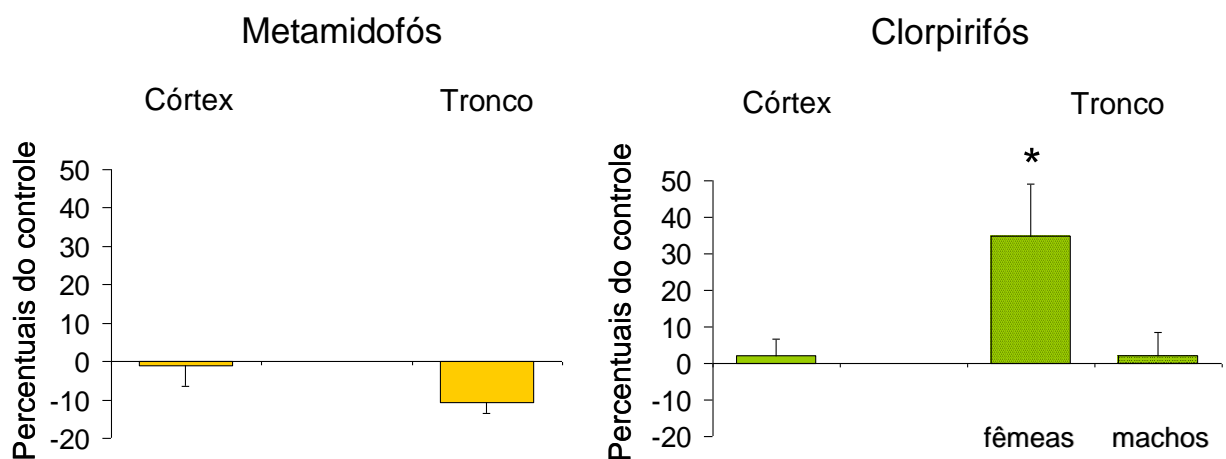


Figura 13. Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT1A no período neonatal

Em relação à ligação ao receptor 5HT₂, metamidofós não promoveu alterações significativas nas regiões cerebrais avaliadas. A exposição a clorpirifós, entretanto, causou uma diminuição da ligação ao receptor 5HT₂ no tronco encefálico de machos e fêmeas ($F_{1,18} = 4,6$; $P = 0,045$) (FIGURA 14).

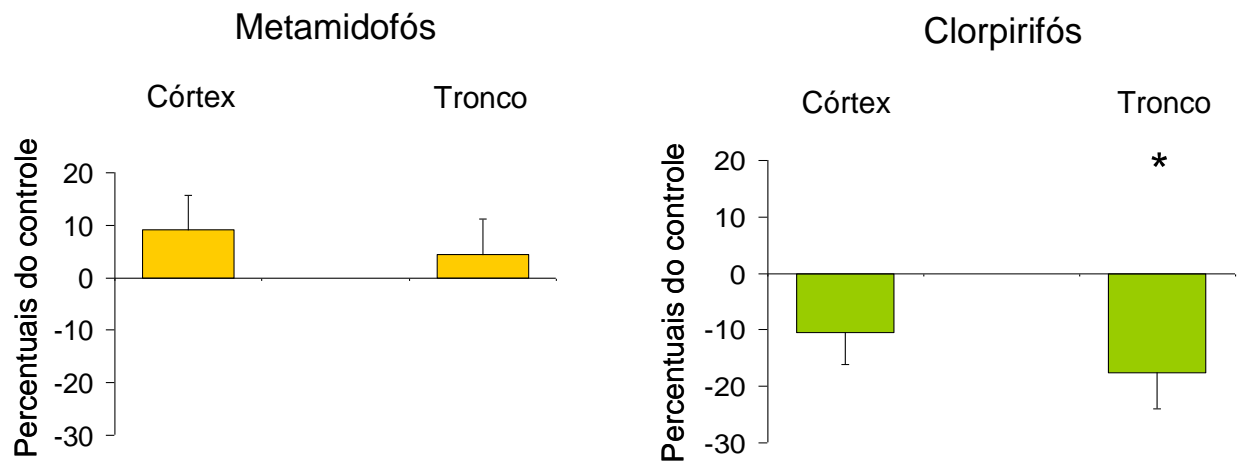


Figura 14. Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT₂ no período neonatal

A exposição neonatal a metamidofós não alterou a ligação ao transportador pré-sináptico serotoninérgico nas regiões cerebrais analisadas. Já a exposição a clorpirifós promoveu um aumento da ligação ao transportador no córtex cerebral das fêmeas expostas em relação ao controle ($F_{1,7} = 5,7$; $P = 0,047$) (FIGURA 15).

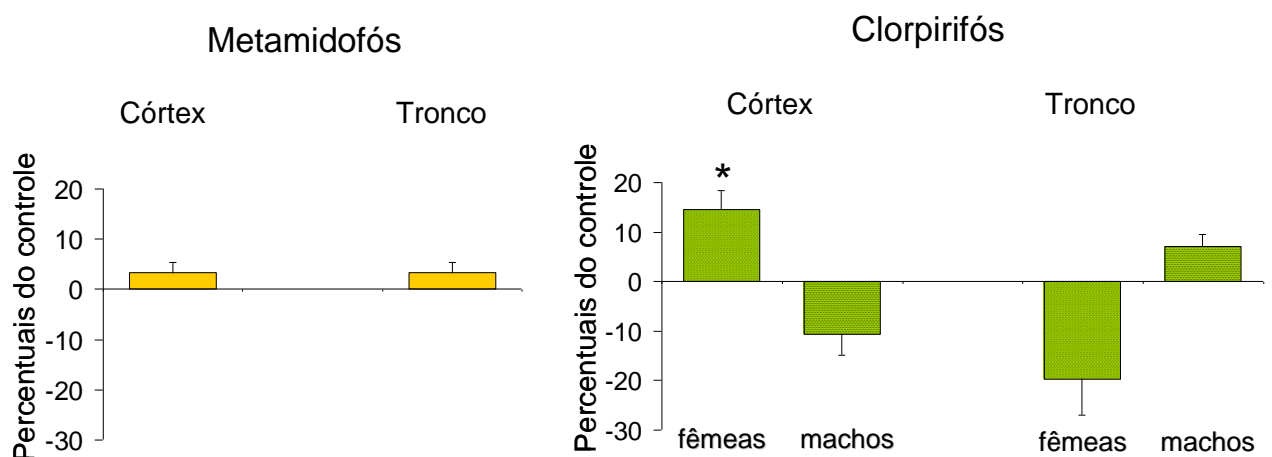


Figura 15. Ligação ao transportador pré-sináptico 5HT no período neonatal

3.2.5 Efeitos na idade adulta sobre o sistema colinérgico

A avaliação da atividade colinesterásica na idade adulta mostrou que a atividade enzimática estava reestabelecida na idade adulta dos animais. A TABELA 4 mostra os percentuais de atividade em relação aos respectivos grupos controle na idade adulta. As variações em relação ao controle não foram significativas.

Tabela 4. Atividade da AChE na idade adulta

Atividade enzimática após exposição a MET			
	Fêmea	Macho	Ambos
Córtex	-6,1±2,2	-2,4±3,9	-4,5±2,1
Tronco	-9,2±3,6	2,9±3,5	-3,1±2,7
Atividade enzimática após exposição a CPF			
	Fêmea	Macho	Ambos
Córtex	-6,4±4,4	6,6±4,2	-0,7±3,4
Tronco	-2,2±3,8	12,6±6,3	5,6±4,1

A exposição neonatal a metamidofós, avaliada na idade adulta (PN63), promoveu uma diminuição significativa da atividade da ChAT no córtex cerebral de machos e fêmeas em relação aos animais controle ($F_{1,27} = 8,7$; $P = 0,0066$), enquanto o tronco encefálico não foi afetado. Já o tratamento com clorpirifós causou uma diminuição significativa da atividade da ChAT no tronco das fêmeas tratadas em relação ao controle ($F_{1,14} = 16,2$; $P = 0,0012$) e um aumento significativo da atividade da ChAT no tronco encefálico dos machos ($F_{1,14} = 9,4$; $P = 0,0083$). O tratamento com clorpirifós não alterou a atividade enzimática no córtex (FIGURA 16).

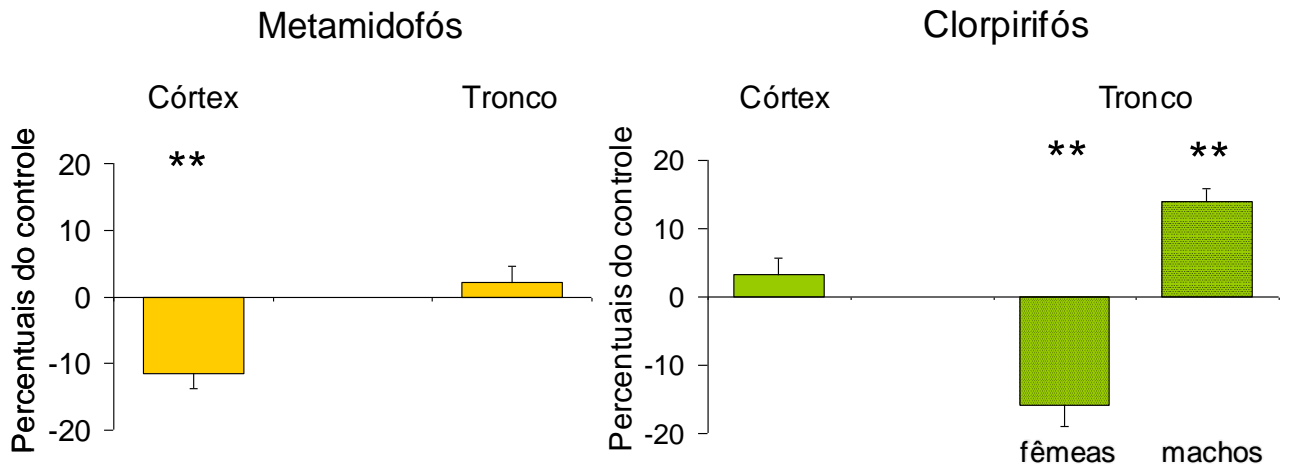


Figura 16. Atividade da ChAT na idade adulta

A ligação ao transportador pré-sináptico de colina foi diminuída na idade adulta após tratamento com metamidofós no tronco encefálico de machos e fêmeas ($F_{1,28} = 9,7$; $P = 0,004$) (FIGURA 17).

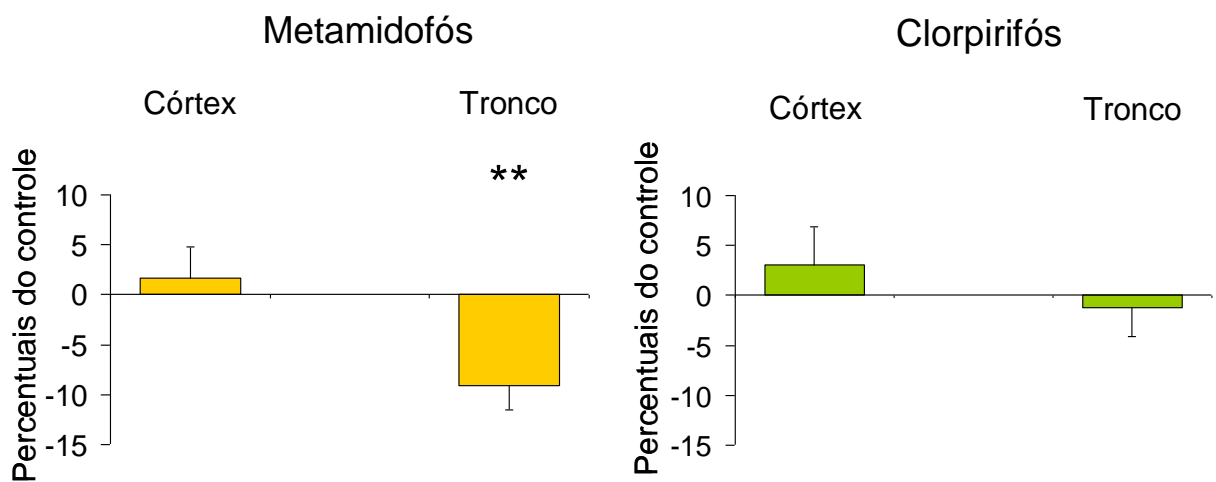


Figura 17. Ligação ao transportador pré-sináptico colinérgico na idade adulta

3.2.6 Efeitos na idade adulta sobre o sistema serotoninérgico

O tratamento neonatal com metamidofós promoveu uma diminuição da ligação ao receptor serotoninérgico 5HT1A no tronco encefálico de fêmeas ($F_{1,14}= 5,2$; $P=0,038$). Já o tratamento com clorpirifós alterou de forma sexo-dependente a ligação ao 5HT1A no córtex cerebral: houve diminuição da ligação em fêmeas ($F_{1,14}= 12,2$; $P=0,0036$) e aumento em machos ($F_{1,14}= 4,7$; $P=0,048$) (FIGURA 18).

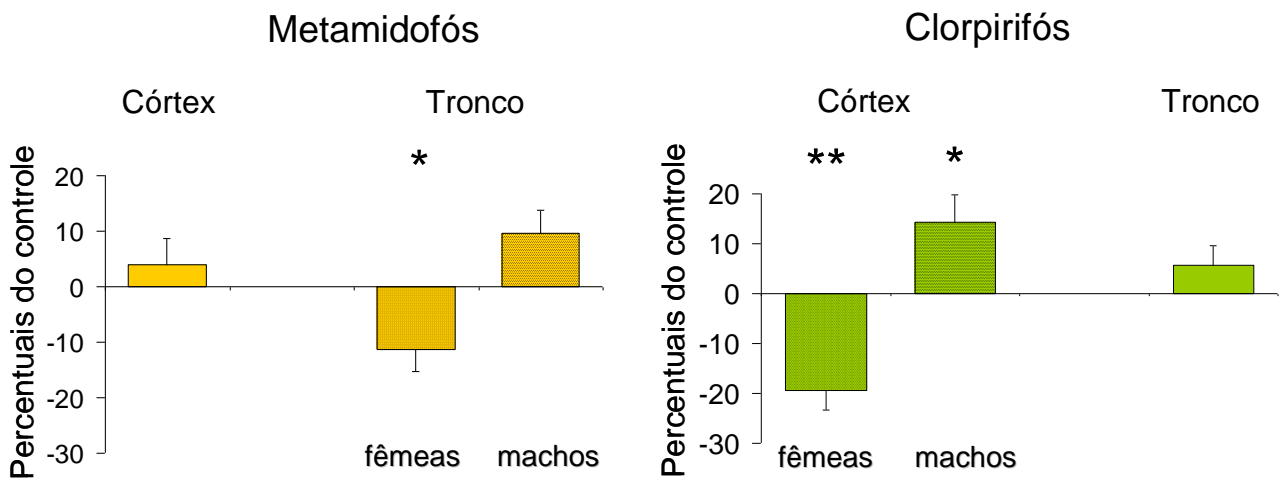


Figura 18. Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT1A na idade adulta

Em relação à ligação ao receptor serotoninérgico 5HT2, houve um aumento significativo da ligação após exposição neonatal à metamidofós no córtex cerebral de machos e fêmeas ($F_{1,28}= 4,8$; $P=0,037$) e no tronco encefálico dos machos ($F_{1,14}= 28,8$; $P<0,0001$) (FIGURA 19).

A exposição a clorpirifós, por sua vez, não alterou a ligação ao receptor 5HT2 em ambas as regiões analisadas.

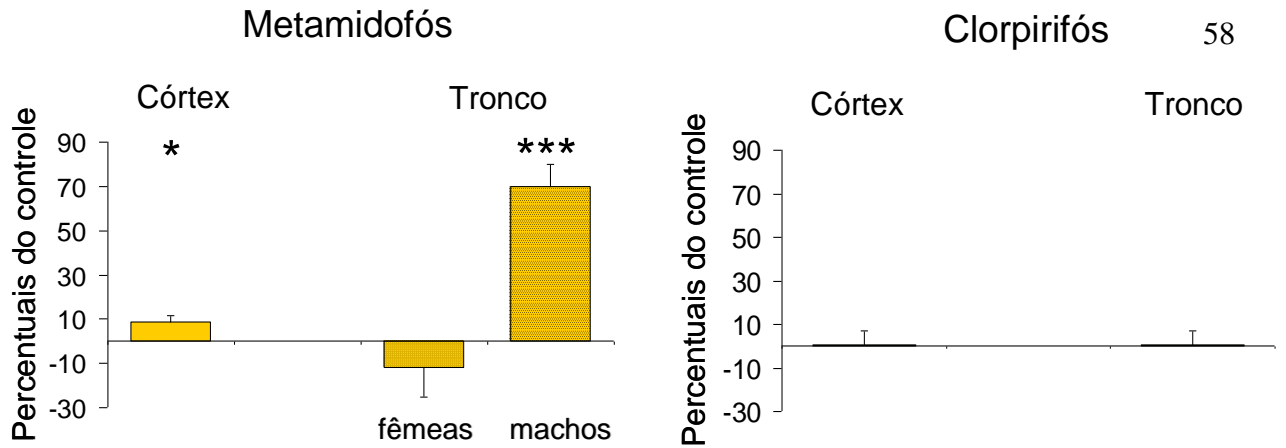


Figura 19. Ligação ao receptor serotoninérgico 5HT2 na idade adulta

Para a ligação ao transportador pré-sináptico de serotonina, não houve efeitos na idade adulta após a exposição neonatal a metamidofós.

Já os animais expostos a clorpirifós apresentaram, na idade adulta, uma diminuição significativa da ligação ao transportador 5HT no tronco encefálico das fêmeas ($F_{1,14} = 9,1$; $P = 0,009$) (FIGURA20).

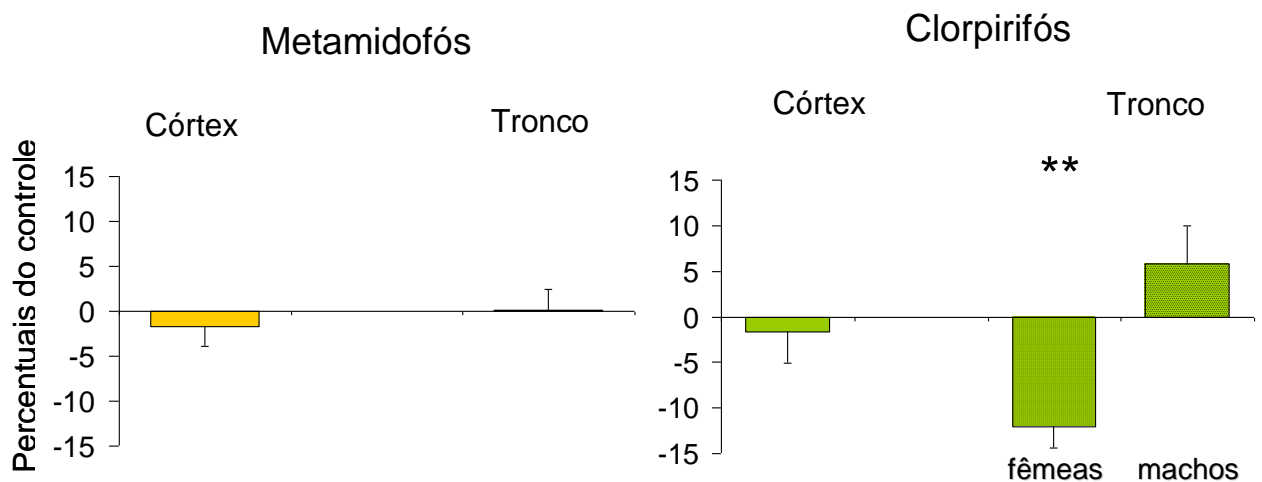


Figura 20. Ligação ao transportador pré-sináptico 5HT na idade adulta

3.2.7 Efeitos comportamentais

A análise do comportamento (FIGURA 21) dos animais no Teste do Nado Forçado detectou um aumento significativo do tempo de imobilidade nos animais tratados com **metamidofós** em relação ao seu correspondente grupo controle, independente do sexo ($F_{1,44} = 5,1$; $P = 0,029$). Este aumento no tempo de imobilidade, conforme elucidado na descrição metodológica, é um indicativo de comportamento associado à depressão em modelos animais. No Teste da Suspensão pela Cauda, não foram detectados efeitos significativos após a exposição a metamidofós.

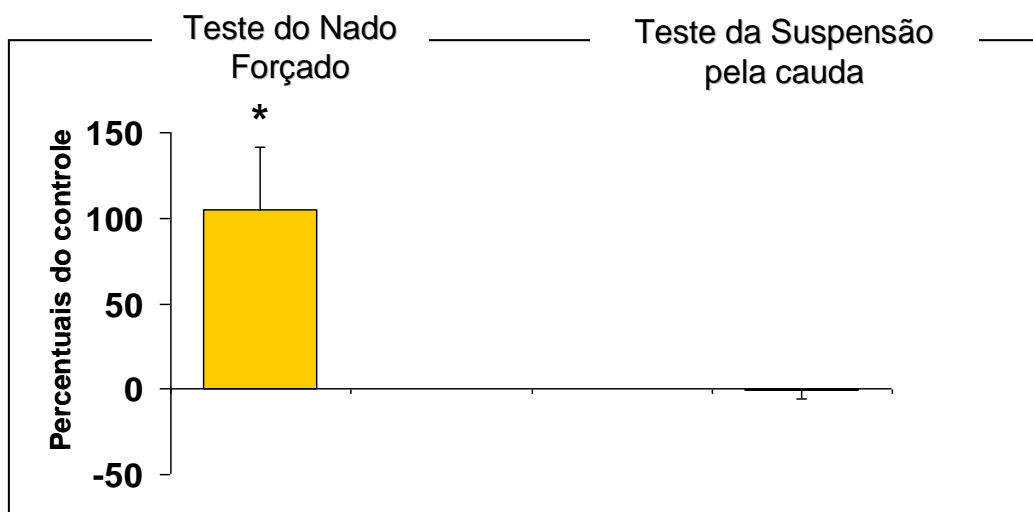


Figura 21. Efeitos da exposição a metamidofós sobre o tempo de imobilidade

Em relação ao tratamento com **clorpirifós** (FIGURA 22), não houve efeitos significativos detectados pelo Teste do Nado Forçado ou pelo Teste da Suspensão pela Cauda no tempo de imobilidade dos animais em relação ao grupo controle.

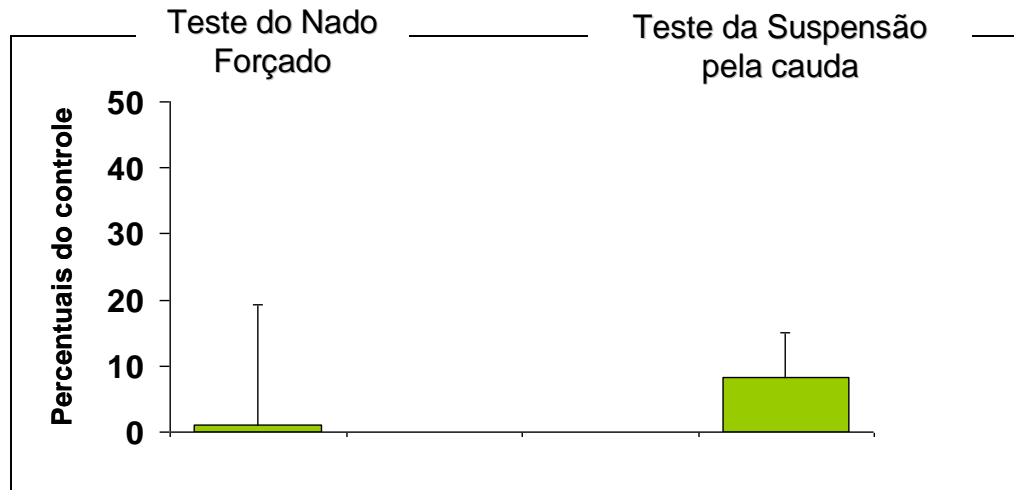


Figura 22. Efeitos da exposição a clorpirifós sobre o tempo de imobilidade

A análise do comportamento associado à ansiedade representada pelo percentual de tempo e de entradas no Braço Aberto (BA) do Labirinto em Cruz Elevado, assim como pelo tempo de permanência dos animais no centro do Campo Aberto é mostrada nas FIGURAS 23 e 24. O tratamento com metamidofós não promoveu alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados como indicativos de ansiedade em modelo animal. Já a análise do tratamento com clorpirifós (FIGURA 24), detectou um efeito sexo-dependente no percentual de entradas no BA, no qual machos não apresentaram alterações enquanto as fêmeas apresentaram uma diminuição significativa do percentual de entradas no BA de mais de 50% em relação ao grupo controle ($F_{1,29} = 4,6$; $P = 0,039$), o que sugere aumento de comportamento associado à ansiedade em fêmeas.

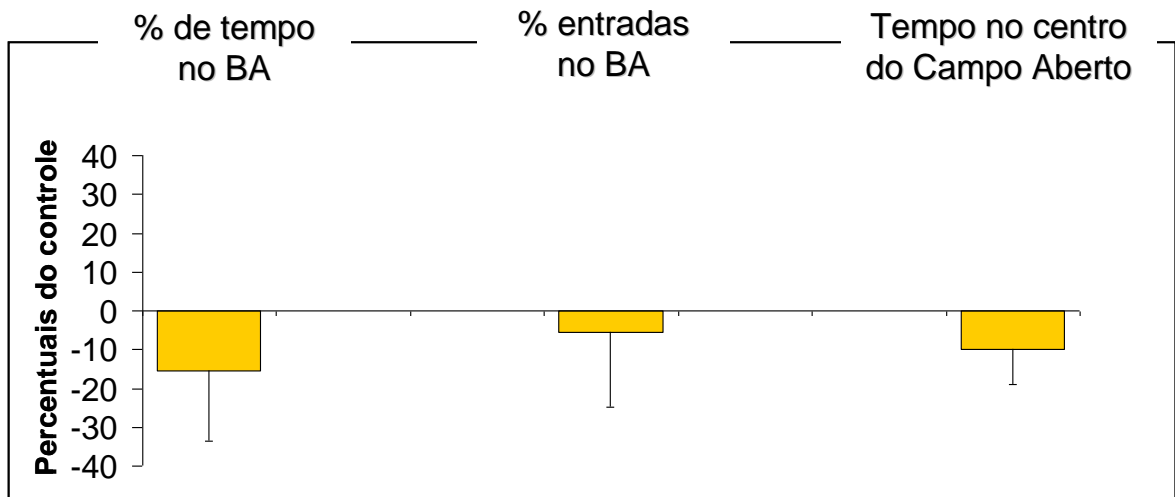


Figura 23. Efeitos da exposição a metamidofós sobre o comportamento associado à ansiedade

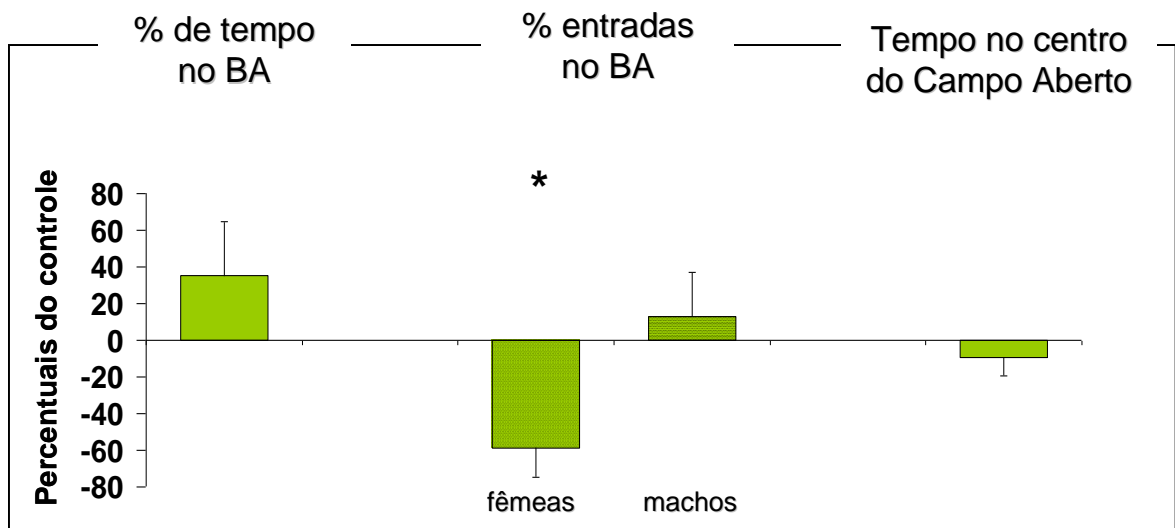


Figura 24. Efeitos da exposição a clorpirifós sobre o comportamento associado à ansiedade

A avaliação da atividade locomotora mostrada nas FIGURAS 25 e 26, foi realizada tanto pelo número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz

Elevado quanto pela distância percorrida no Teste do Campo Aberto. E exposição neonatal a metamidofós (FIGURA 25) ou a clorpirifós (FIGURA 26) não alterou os parâmetros da atividade locomotora avaliados neste estudo.

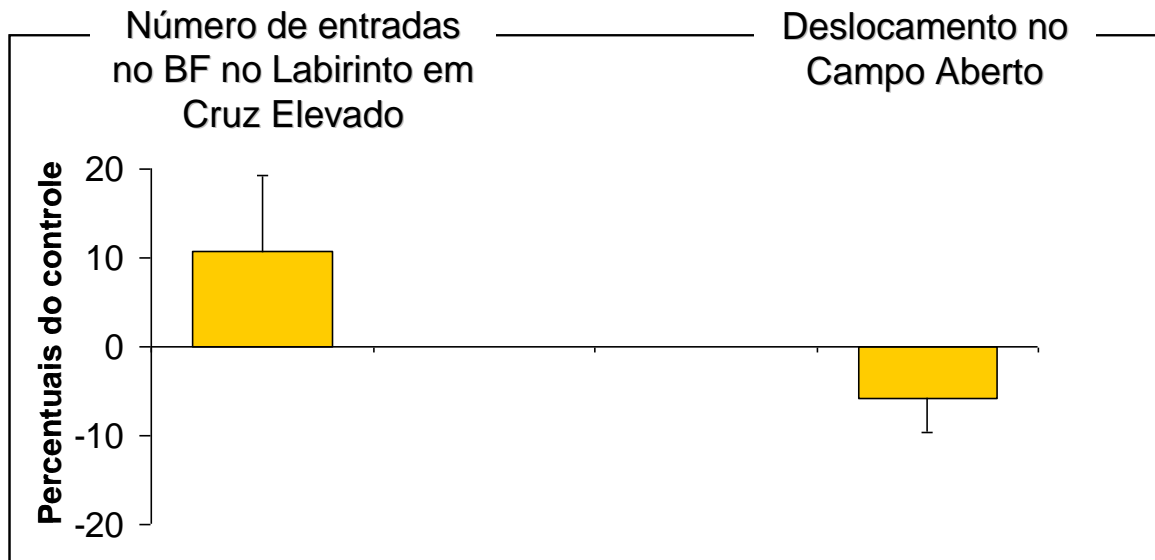


Figura 25. Efeitos da exposição a metamidofós sobre a atividade locomotora

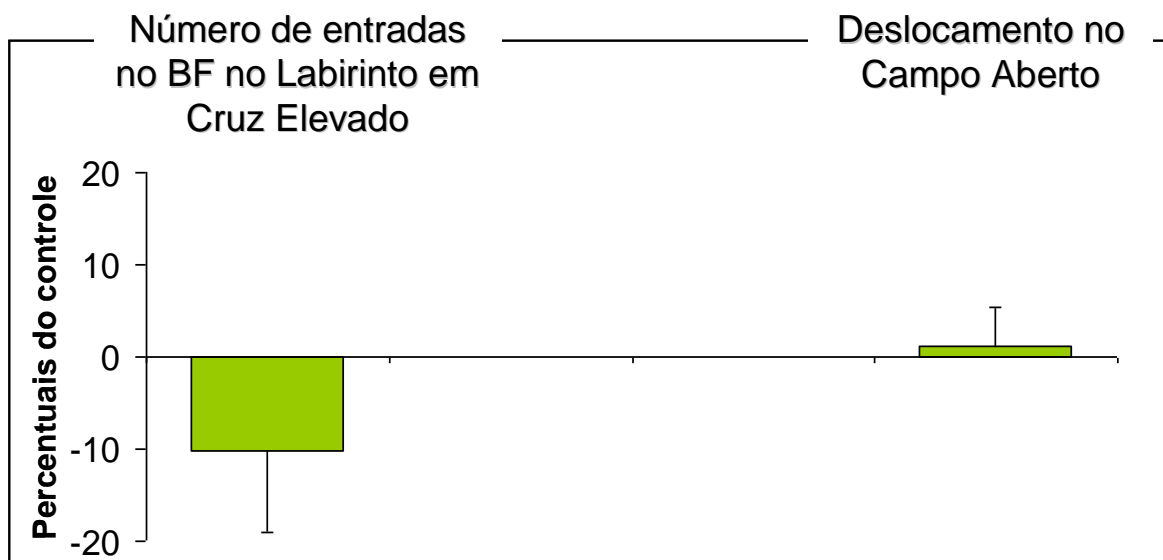


Figura 26. Efeitos da exposição a clorpirifós sobre a atividade locomotora

A avaliação dos efeitos sobre a tomada de decisão dos animais (FIGURA 27) mostrou efeitos inversos para animais expostos a metamidofós ou clorpirifós. Os animais expostos a metamidofós apresentaram uma diminuição significativa do

tempo de permanência no centro do Labirinto em Cruz Elevado em relação ao grupo controle ($F_{1,63} = 5,0$; $P = 0,029$), sugerindo uma melhora na capacidade de tomada de decisão ou, como outra possível interpretação, um aumento da impulsividade, enquanto os animais expostos a clorpirifós apresentaram, ao contrário, um aumento do tempo de permanência no centro em relação ao seu respectivo grupo controle ($F_{1,53} = 4,5$; $P = 0,038$), sugerindo um prejuízo na capacidade de tomada de decisão destes animais, que também pode ser interpretado como diminuição da impulsividade.

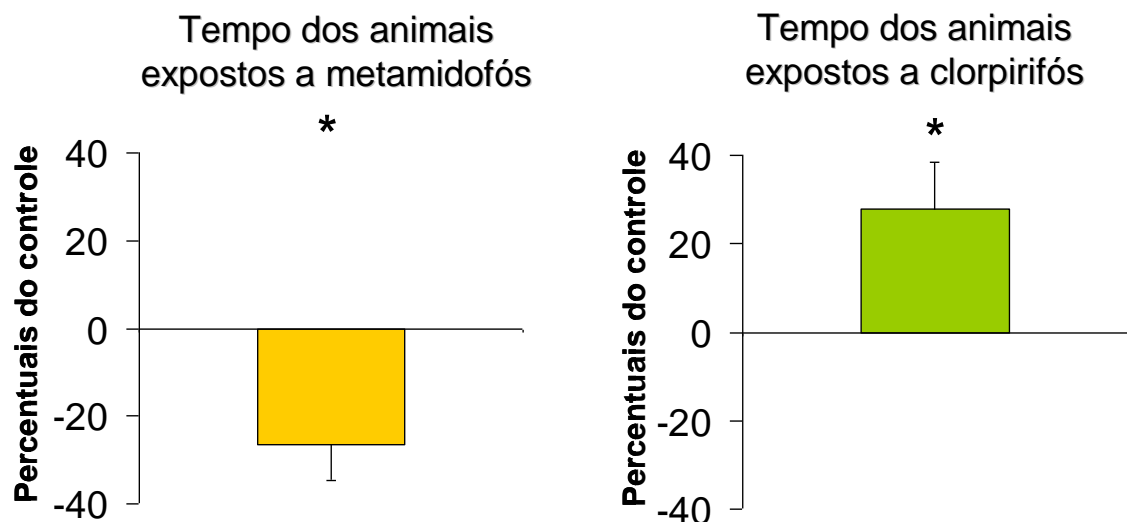


Figura 27. Efeitos da exposição a metamidofós ou a clorpirifós sobre o tempo no centro do Labirinto em Cruz Elevado

A análise do índice corrigido $(L3-L0)/L0$ no teste da Esquiva Passiva, indicou que as fêmeas expostas a clorpirifós apresentaram um desempenho pior do que os animais controle ($P = 0,0457$) embora os machos não tenham apresentado efeitos

significativos. Este resultado sugere que houve um prejuízo na memória/aprendizado das fêmeas expostas.

A exposição a metamidofós não promoveu alterações significativas nos animais testados nesta idade.

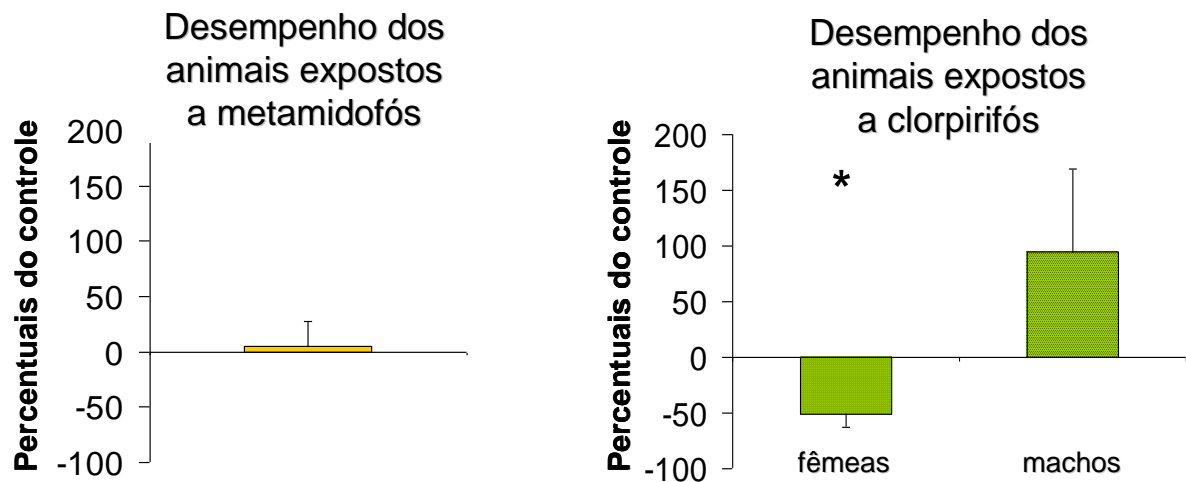


Figura 28. Efeitos da exposição a metamidofós ou a clorpirifós sobre aprendizado no Teste da Esquiva Passiva

4 DISCUSSÃO

4.1 Escolha das doses de exposição

A proposta original do presente estudo envolvia a investigação global dos efeitos da exposição, em um período crítico do desenvolvimento cerebral, a dois agentes neurotóxicos amplamente utilizados: metamidofós e clorpirifós. Em um estudo anterior do nosso grupo, havíamos detectado efeitos relacionados à depressão, através também de testes comportamentais em modelo animal, após exposição sub-crônica ao pesticida metamidofós na idade adulta (Lima *et al.*, 2009). Em outro estudo complementar, observamos alterações no sistema serotoninérgico destes mesmos animais expostos a metamidofós quando adultos (Lima *et al.*, 2011). Já em relação ao período do desenvolvimento, quando o cérebro é particularmente vulnerável a agentes neurotóxicos, os efeitos da exposição a metamidofós são desconhecidos.

Um pouco melhor conhecidos são os efeitos promovidos por clorpirifós, o pesticida mais amplamente estudado. Porém, não sabíamos qual seriam os efeitos observados devido a exposição a clorpirifós no período exato do desenvolvimento que investigamos aqui ou ainda com a espécie e a cepa de animais experimentais usada. Por isso, expusemos dois diferentes grupos de animais neonatos a injeções diárias dos dois pesticidas a fim de comparar seus efeitos. Desta forma, nosso grupo fecharia um estudo mais completo dos efeitos e elucidação dos riscos impostos a adultos e crianças expostos a metamidofós e, assim como acontece há tempos com o uso de clorpirifós, poderíamos contribuir para maior conscientização e reforçar a necessidade de restrições ao uso e comercialização desta substância.

Para isso, buscamos encontrar uma dose para cada pesticida, que fosse equivalente em relação ao parâmetro toxicológico clássico quando se trata de exposição a organofosforados: a inibição da atividade da AChE. No entanto, as doses de exposição usadas para cada pesticida promoveram níveis de inibição diferentes para fêmeas e machos, em geral as inibições foram maiores em fêmeas.

Desse modo, embora as inibições promovidas tenham sido equivalentes para as doses escolhidas de metamidofós e clorpirifós quando colabamos os dois sexos, ao analisarmos machos e fêmeas separadamente os dois pesticidas não causaram inibições equivalentes entre si. Para as fêmeas, a dose escolhida de metamidofós, 1mg/kg, causou aproximadamente 23% de inibição da AChE no córtex e no tronco enquanto as fêmeas tratadas com clorpirifós, 3mg/kg, tiveram cerca de 30% da atividade enzimática inibida. Nos machos, a dose escolhida para metamidofós causou 18 e 16% de inibição no córtex e tronco respectivamente, enquanto a dose escolhida de clorpirifós causou 4 e 14% de inibição no córtex e tronco, respectivamente.

Assim, as comparações dos efeitos entre metamidofós e clorpirifós, devem ser feitas com cautela pois as inibições promovidas sobre a AChE, parâmetro que nós usamos para estabelecer uma equivalência toxicológica entre os dois pesticidas, não foram equivalentes entre os dois sexos.

Com esses níveis de inibição enzimática não foram notados sinais de intoxicação aguda como tremores, alterações de peso corporal ou lacrimejamento. Uma vez que os animais tratados eram muito jovens, sintomas como ataxia e dilatação pupilar não foram possíveis de ser observados.

4.2 Efeitos da exposição a metamidofós e a clorpirifós durante o desenvolvimento sobre o sistema colinérgico

No presente estudo, além da inibição da AChE cerebral, nós avaliamos outros parâmetros da atividade colinérgica, tais como atividade da colina acetil transferase, ChAT, e a ligação ao transportador pré-sináptico de colina de alta afinidade.

Sobre a atividade da ChAT, avaliada no dia seguinte ao término do tratamento, a exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós não promoveu alterações significativas. Este resultado vem ao encontro de estudos prévios sobre efeitos de clorpirifós durante o desenvolvimento. Richardson e Chambers, em seus estudos publicados em 2003 e 2004 investigaram os efeitos da exposição pré-natal a clorpirifós e avaliaram os impactos e a permanência dos efeitos sobre a atividade da

ChAT, entre outros marcadores do sistema colinérgico. Nestes estudos, foi observado que a exposição a clorpirifós durante a gestação (a partir do sexto até o vigésimo dia de gestação), com doses que chegaram a promover aproximadamente 45% de inibição da AChE no primeiro dia de vida pós-natal dos filhotes, foi incapaz de alterar a atividade da ChAT nos primeiros dias de vida pós-natal (Richardson e Chambers, 2003). Nos referidos trabalhos, a inibição da AChE foi persistente nos filhotes até o sexto (Richardson e Chambers, 2004) e o nono (Richardson e Chambers, 2003) dias de vida pós-natal, enquanto a atividade da ChAT não foi afetada neste período. De forma interessante, alguns dias após a interrupção da exposição, em ambos os estudos, houve uma diminuição de cerca de 10% da atividade da ChAT (avaliada no nono e no décimo segundo dias de vida pós-natal, respectivamente), quando a atividade colinesterásica já havia sido recuperada. Ou seja, a atividade da ChAT pode não estar alterada durante a exposição ao pesticida, quando a inibição colinesterásica é significativamente alta, mas isto não significa que a função desta enzima permanecerá inalterada a médio ou longo prazo. Uma alteração tardia da atividade desta enzima que participa da síntese de ACh pode se manifestar após a recuperação da atividade da AChE (Richards e Chambers, 2003; 2004). Aparentemente, a alteração promovida pelos pesticidas sobre a atividade da AChE no período de desenvolvimento é bastante transitória, em decorrência da alta taxa de síntese protéica e formação de novas enzimas, mas os impactos posteriores sobre outros parâmetros colinérgicos podem ser mais duradouros ou mesmo surgir em outra etapa da vida.

Sobre a ligação ao transportador pré-sináptico de colina de alta afinidade, observamos aqui que 24 horas após a interrupção do tratamento, houve alterações de maneira região e sexo-dependentes. No córtex cerebral observamos aumento da ligação ao transportador colinérgico nas fêmeas tratadas e uma tendência de redução nos machos após o tratamento com clorpirifós, enquanto no tronco encefálico os machos não apresentaram alterações e tivemos novamente aumento da ligação em fêmeas, porém este aumento ocorreu após exposição a metamidofós.

Este resultado sugere que as alterações observadas sobre o transportador colinérgico acompanham as alterações colinesterásicas. As inibições colinesterásicas se mostraram maiores nas fêmeas tratadas no presente estudo, para o tratamento com clorpirifós, e o aumento na ligação ao transportador

aconteceu de forma significativa exclusivamente sobre as fêmeas. Uma possível explicação para esta relação é que a diminuição da concentração de colina nas fendas sinápticas pode ter induzido um aumento na atividade do transportador, no sentido de compensar esta diminuição e manter os níveis intracelulares deste substrato da síntese de ACh. Neste sentido, já foi demonstrado, a partir de estudos com sinaptossomos cerebrais de ratos, que altos níveis de colina extracelulares promoveram rápida diminuição da expressão do transportador colinérgico na superfície celular devido à aceleração da sua internalização (Okuda *et al.*, 2011). Da mesma forma, a resposta inversa é possível de ser observada e, conforme no presente estudo, poderia ocorrer um aumento da expressão do transportador em função da depleção de colina nas fendas sinápticas colinérgicas.

4.3 Efeitos da exposição à metamidofós e a clorpirifós durante o desenvolvimento do sistema serotoninérgico

No presente estudo, não foram identificadas alterações sobre o sistema serotoninérgico 24 horas após a exposição neonatal ao pesticida metamidofós. Após a exposição a clorpirifós, entretanto, houve várias alterações observadas durante o período de desenvolvimento. A maioria destas alterações foi sexo-dependente, evidenciando uma maior vulnerabilidade específica para as fêmeas.

Os resultados de clorpirifós observados aqui corroboram estudos anteriores que identificaram efeitos diferenciais para machos e fêmeas que podem se estender desde medidas bioquímicas até alterações comportamentais (Dam *et al.*, 2000; Aldridge *et al.*, 2005a; 2005b, , Levin *et al.*, 2010). Alguns parâmetros, como alterações no reflexo de endireitamento, podem ser mais afetados em fêmeas e outros parâmetros, como diminuição da atividade locomotora, podem ser mais afetados em machos (Dam *et al.*, 2000). Em adição, foi demonstrado que a exposição a clorpirifós durante o desenvolvimento teve efeitos sexo-seletivos no Labirinto em Cruz Elevado, com aumento do tempo nos braços abertos observado apenas em machos (Aldridge *et al.*, 2005a). Em relação às medidas bioquímicas, a exposição neonatal a clorpirifós pode promover uma diminuição geral do conteúdo

de serotonina nas fendas sinápticas, efeitos que pode se apresentar somente nas fêmeas (Aldridge *et al.*, 2005b). Estes resultados, somados aos nossos, revelam a multiplicidade de efeitos dos organofosforados durante o desenvolvimento e a sua capacidade de afetar de formas diferentes o desenvolvimento cerebral.

As ações sexo-dependentes dos compostos organofosforados podem ser associadas à taxa de detoxificação hepática, que mostra-se mais rápida em ratos adultos machos (Chambers *et al.*, 1994). Além disso, os organofosforados podem afetar distintamente fêmeas e machos por influências hormonais, pois já foi demonstrado que eles afetam os hormônios pituitários e sexuais (Recio *et al.*, 2005).

Observamos, no presente estudo, um aumento da ligação ao receptor 5HT1A no tronco encefálico de fêmeas após exposição a clorpirifós. Este efeito já havia sido observado em um modelo parecido de exposição a clorpirifós em um período mais recente do desenvolvimento (animais expostos de PN1 a PN4) em ratos (Aldridge *et al.*, 2003). Porém, quando se trata de alterações sobre a ligação ao receptor 5HT1A, os efeitos de diferentes organofosforados quando administrados em baixas doses podem ser diversos. Em uma exposição pré-natal ao pesticida organofosforado diazinão de PN1 a PN4, por exemplo, houve um efeito semelhante ao nosso, com aumento da ligação ao 5HT1A, avaliado 24 horas após o término do tratamento (Slotkin *et al.*, 2006). Mas, no mesmo estudo, foi identificada uma significativa redução da ligação ao mesmo receptor, principalmente em fêmeas, quando ratos neonatos foram expostos ao pesticida paration (Slotkin *et al.*, 2006). Metamidofós, no entanto, conforme nossos resultados indicam, não foi capaz de alterar a ligação a este receptor no período analisado no presente estudo.

Sobre o receptor 5HT2, por sua vez, nós detectamos com nosso modelo de exposição a clorpirifós, uma diminuição significativa da ligação no tronco encefálico dos camundongos, ao contrário do aumento da ligação a este receptor verificado após exposição neonatal a clorpirifós (Aldridge *et al.*, 2003) e após exposição a diazinão (Slotkin *et al.*, 2006).

Já sobre o transportador pré-sináptico de serotonina, nós verificamos um efeito imediato de aumento da ligação, particularmente sobre o córtex cerebral das fêmeas. Um estudo prévio da exposição a clorpirifós, também com exposições que se estenderam de PN1 a PN4, havia descrito resultados em fêmeas diferentes dos nossos, com diminuições da ligação ao transportador 5HT em regiões corpos

celulares serotoninérgicos e um aumento da ligação no prosencéfalo, região rica em projeções (Raines *et al.*, 2001). Neste mesmo estudo os machos apresentaram diminuições persistentes da ligação ao transportador em ambas as regiões.

Assim, deduz-se que os diferentes pesticidas organofosforados são capazes de promover alterações variadas sobre os marcadores serotoninérgicos durante o desenvolvimento e que o sexo, a cepa animal, o período de exposição e o tempo de duração, podem todos ser decisivos para a definição do tipo de efeito apresentado.

4.4 Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e clorpirifós sobre o sistema colinérgico avaliados na idade adulta

A atividade da AChE foi restabelecida após o longo período de interrupção da exposição aos pesticidas. Assim, os valores de atividade colinesterásica, medidos em PN63, não foram diferentes dos valores do grupo controle, tanto para os animais tratados com metamidofós quanto para os tratados com clorpirifós.

A atividade da ChAT, no entanto, mostrou-se afetada na idade adulta tanto pelo tratamento com metamidofós como pelo tratamento com clorpirifós. Conforme colocado no item 6.2, a atividade da ChAT não foi diferente do grupo controle, quando avaliada no dia seguinte ao término das exposições, porém foi diminuída no grupo tratado com metamidofós no córtex cerebral e pelo grupo tratado com clorpirifós no tronco encefálico das fêmeas. De modo contraditório, houve um aumento da sua atividade no tronco encefálico dos machos tratados com clorpirifós.

Estes resultados reforçam as evidências prévias descritas por Richardson e Chambers (2004 e 2005) de que alterações na atividade da ChAT podem surgir após a interrupção do tratamento peri-natal com organofosforado, quando os níveis de atividade da AChE já retornaram aos valores normais. Tanto nossos resultados de diminuição da atividade promovida no córtex por metamidofós quanto a diminuição observada no tronco das fêmeas por clorpirifós são consistentes com os resultados destes estudos prévios, os quais descreveram também reduções na atividade da ChAT após exposições durante a gestação (Richardson e Chambers, 2004) ou nos primeiros dias da vida pós-natal (Richardson e Chambers, 2005). Isto

sugere que a exposição a estes dois pesticidas apresenta efeitos semelhantes neste aspecto da função colinérgica e que a alteração promovida em determinadas etapas do desenvolvimento deste sistema pode ser observada mesmo após o período de recuperação colinesterásica.

O aumento da atividade da ChAT observado aqui após tratamento com clorpirifós se manifestou pontualmente no tronco encefálico dos machos. Isto sugere que, além da forma como os pesticidas organofosforados afetarem os circuitos cerebrais ser diferente para machos e fêmeas, a região avaliada também pode responder a este tipo de exposição de forma diferente. E estas diferenças inerentes à região, não puderam ser observadas por Richardson e Chambers, pois em seus estudos o cérebro foi analisado por inteiro.

Em relação ao transportador colinérgico de alta afinidade, nós não encontramos alterações significativas promovidas por clorpirifós. Isto sugere que a alteração encontrada no período neonatal após exposição a clorpirifós foi revertida durante o decorrer do desenvolvimento dos animais neste modelo de exposição. Como hipótese de interpretação desta recuperação, é possível que uma vez que no período neonatal, a atividade do transportador estivesse aumentada supostamente como resultado da inibição colinesterásica e conseqüente diminuição da concentração de colina nas fendas, uma vez recuperada a atividade da AChE, a ligação ao transportador de colina também retornou aos níveis normais.

Já os animais tratados com metamidofós, apresentaram diminuição da ligação ao transportador no tronco encefálico (em cerca de 10%), o qual logo após a interrupção da exposição se apresentava aumentada nas fêmeas. Este efeito já havia sido observado após exposição a clorpirifós durante o desenvolvimento gestacional a curto (Richardson e Chambers, 2004) e longo (Qiao *et al.*, 2003) período após o tratamento em várias regiões cerebrais.

4.5 Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós sobre o sistema serotoninérgico avaliados na idade adulta

Na idade adulta, após 54 dias de interrupção da exposição neonatal aos pesticidas organofosforados metamidofós e clorpirifós, o sistema serotoninérgico dos animais apresentou-se afetado em relação aos vários parâmetros avaliados. A exposição a metamidofós, que não tinha causado alterações nesta via logo após a exposição, na idade adulta promoveu alterações sexo e região-dependentes sobre os receptores avaliados, mas não sobre o transportador 5HT. A exposição a clorpirifós, por sua vez, causou alterações sexo-dependentes sobre o receptor 5HT_{1A} e sobre o transportador serotoninérgico, mas nenhuma alteração foi verificada na ligação ao receptor 5HT₂.

A exposição neonatal a clorpirifós já foi relativamente bem estudada e efeitos sexo-seletivos já foram descritos sobre o sistema serotoninérgico em animais tratados nos primeiros dias de vida pós-natal e avaliados quando adultos, após um longo período de interrupção do tratamento (Aldridge *et al.*, 2005b), com efeitos preponderantes sobre fêmeas.

Aqui, as fêmeas expostas a clorpirifós apresentaram, no córtex cerebral, diminuição da ligação ao receptor 5HT_{1A} e os machos, aumento; e sobre o transportador pré-sináptico de serotonina houve diminuição da ligação no tronco encefálico de fêmeas. Já os animais expostos a metamidofós apresentaram diminuição da ligação ao receptor 5HT_{1A} no tronco encefálico de fêmeas e aumento da ligação ao 5HT₂ no córtex e tronco dos machos. Estes resultados, comparados às alterações verificadas no período neonatal, sugerem que as diferenças oriundas da diferenciação sexual ao longo do desenvolvimento, podem contribuir para a programação das alterações e a maneira como as mudanças sobre o desenvolvimento deste sistema vão ocasionar alterações a longo prazo.

As alterações sobre este sistema, somadas às alterações colinérgicas observadas na idade adulta, quando foram feitos os testes comportamentais, são interessantes para ajudar a esclarecer as alterações comportamentais observadas aqui, devido ao fato de que estes sistemas são extensamente associados a alterações de humor e cognitivas.

4.6 Efeitos da exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós sobre o comportamento dos animais

No presente estudo, foi verificado um aumento do tempo de imobilidade na idade adulta pelo teste do nado forçado, nos animais expostos ao pesticida metamidofós, enquanto os animais expostos a clorpirifós não apresentaram alterações significativas. Este teste é o mais amplamente usado para detecção de efeitos de drogas antidepressivas e comportamento depressivo em modelos animais alterados geneticamente e é baseado na observação de que roedores, quando submetidos a um ambiente cilíndrico e inescapável, cheio de água, desenvolvem inicialmente movimentos orientados em tentativa de escape e, a seguir, apresentam uma postura imóvel (Cryan *et al.*, 2005). Se drogas antidepressivas são administradas antes do teste, os animais permanecem significativamente mais tempo nadando em movimento de escape do que os animais controle.

Em relação à exposição a metamidofós, o aumento do tempo de imobilidade verificado no presente estudo, corrobora as evidências prévias que indicam uma associação entre a exposição a pesticidas organofosforados e a indução de distúrbios psiquiátricos, especialmente depressão (Amr *et al.*, 1997; Salvi *et al.*, 2003). Além disso, estendem para este crucial período do desenvolvimento os efeitos relacionados a esta distúrbio de humor que nós já havíamos antes observado com exposição sub-crônica a metamidofós na idade adulta (Lima *et al.*, 2009).

Já a exposição a clorpirifós no nosso modelo não foi capaz de afetar o comportamento associado à depressão, conforme avaliado pelo teste do nado forçado e da suspensão pela cauda. Este resultado vai de encontro ao estudo prévio dos efeitos de clorpirifós durante os primeiros dias de vida pós natal em ratos com a dose de 1mg/kg, o qual detectou comportamento associado a depressão em ratos através do teste de anedonia (Aldridge *et al.*, 2005a). Este resultado reforça a constatação de que um mesmo organofosforado pode ter ações distintas sobre o comportamento de acordo com a duração e o período de desenvolvimento

específico dos animais. Além da observação de que diferentes espécies de roedores podem não apresentar os mesmos padrões de resposta.

De forma interessante, o efeito de aumento do tempo de imobilidade e, portanto, de comportamento associado à depressão verificado aqui após a exposição neonatal a metamidofós não foi detectado pelo segundo teste de comportamento depressivo baseado em tempo de imobilidade que nós usamos: o teste da suspensão pela cauda. De fato, nós já havíamos observado no estudo prévio de avaliação dos efeitos de metamidofós quando a exposição ocorre na idade que os dois testes parecem detectar alterações comportamentais que são resultado de vias biológicas ou sistemas diferentes.

A diferença mais importante entre os dois testes é que o teste do nado forçado não tem sido tradicionalmente visto como um modelo sensível e consistente para detecção da ação dos antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, enquanto o teste da suspensão pela cauda é mais eficaz para detecção dos efeitos antidepressivos por esta via de ação (Cryan *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que animais “knockout” para o receptor GABA_B ou que receberam tratamento com antagonista seletivo para este receptor, apresentaram diminuição do comportamento associado à depressão, ou seja efeito anti-depressivo, no teste do nado forçado, porém não apresentaram nenhuma modificação no teste da suspensão pela cauda (Mombereau *et al.*, 2004).

Assim, é possível que as vias pelas quais o pesticida metamidofós está atuando no presente estudo, estejam levando a um tipo de alteração comportamental que é detectada com eficiência por um teste e não pelo outro.

Finalmente, apesar das alterações sobre o sistema serotoninérgico observadas aqui terem sido divergentes nos dois sexos e nas duas regiões analisadas, não podemos descartar a hipótese de que as alterações do funcionamento deste sistema estejam relacionadas ao aumento do comportamento associado à depressão.

Nós verificamos que a exposição neonatal a clorpirifós promoveu uma diminuição do percentual de entradas dos animais nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, apenas em fêmeas, o que sugere que houve um efeito ansiogênico dependente do sexo. Este resultado corrobora um recente estudo desenvolvido em camundongos por Braquenier e colaboradores que identificou aumento do comportamento associado à ansiedade após exposição perinatal a clorpirifós,

exclusivamente sobre fêmeas (Braquenier *et al.*, 2010). Estes resultados reforçam as evidências de maior susceptibilidade das fêmeas no que se refere a alterações de ansiedade.

Nós observamos também alterações contrárias promovidas por metamidofós e clorpirifós em relação ao comportamento de tomada de decisão, detectado pelo tempo de permanência dos animais no centro do labirinto em cruz elevado. Enquanto os animais expostos a metamidofós apresentaram uma melhor capacidade de tomar decisão, os animais expostos a clorpirifós apresentaram esta capacidade prejudicada. A resposta de tomada de decisão é um parâmetro secundário na análise do comportamento dos animais pelo labirinto em cruz elevado, que detecta com maior especificidade comportamento associado à ansiedade e a diminuição do tempo no centro e, portanto, da tomada de decisão tem sido associada com diminuições de ansiedade (Clément *et al.*, 2007) pois está relacionada ao fato dos animais explorarem mais os braços abertos, ambiente onde o animal está submetido a maior risco. Neste sentido, as alterações observadas após o tratamento com clorpirifós são consistentes com a hipótese levantada por Clément e colaboradores, pois as resposta contrárias, de aumento do tempo no centro e aumento de ansiedade foram detectadas com o nosso modelo de exposição, apesar do efeito ansiogênico de clorpirifós ter sido observado apenas em fêmeas.

No que se refere à análise de aprendizado/memória dos animais, avaliada pelo teste da esQUIVA passiva, nós observamos um desempenho piorado das fêmeas que foram expostas a clorpirifós. Em relação à memória de trabalho, são clássicas as diferenças relacionadas ao sexo no teste do labirinto aquático, no qual as fêmeas controle têm significativamente mais erros, e portanto pior desempenho, que os machos (Icenogle *et al.*, 2004, Levin *et al* 2001; 2002). Porém, em estudo prévio da exposição neonatal a clorpirifós, Aldridge e colaboradores (Aldridge *et al.*, 2005a) detectaram efeito inverso ao observado aqui, com tendência de prejuízo de desempenho de aprendizado nos machos tratados mas não em fêmeas. Esta contradição nos leva a supor que os efeitos da exposição a clorpirifós sobre a cognição são sexo-dependentes, porém o tipo de efeito apresentado é variável e pode ser dependente da fase em que a exposição ocorre.

Sobre os parâmetros locomotores avaliados no presente estudo, nós não encontramos nenhuma alteração significativa após a exposição a metamidofós ou a clorpirifós, o que indica que as alterações centrais colinérgicas não foram capazes de atingir as vias periféricas a ponto de afetar o desempenho locomotor dos animais.

É possível que as alterações comportamentais observadas aqui estejam sendo direta ou indiretamente influenciadas pelas modificações que nós detectamos nos sistemas neurotransmissores colinérgico e serotoninérgico, porém estas relações não estão completamente claras. O desconhecimento dos impactos de nossos tratamentos sobre as próprias concentrações dos neurotransmissores envolvidos dificulta uma interpretação mais completa dos resultados. Assim, estudos posteriores destes e de outros sistemas neurotransmissores ainda são necessários para completar a elucidação dos efeitos da exposição a estas duas substâncias nesta etapa do desenvolvimento e suas consequências.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a exposição neonatal a metamidofós e a clorpirifós é capaz de alterar a atividade colinérgica a curto e longo prazo. Em relação aos efeitos sobre o sistema serotoninérgico, metamidofós não alterou os parâmetros avaliados aqui, indicando que este período pode não ser o de maior vulnerabilidade aos efeitos deste pesticida. Na idade adulta, no entanto, os animais expostos a metamidofós apresentaram alterações sobre os receptores serotoninérgicos, indicando que mesmo que o efeito não se apresente no momento da exposição, as mudanças causadas nesta etapa podem culminar no desenvolvimento de anormalidades tardias. Clorpirifós, por sua vez, promoveu alterações em ambos os sistemas tanto durante o desenvolvimento quanto na idade adulta, reforçando os impactos da exposição neonatal a este pesticida já evidenciado por outros estudos. A observação de que mesmo após um longo período de interrupção das exposições, quando a atividade da acetilcolinesterase já havia sido recuperada, os sistemas colinérgico e serotoninérgico estarem alterados, indica que os efeitos de organofosforados vão além da inibição enzimática classicamente verificada. As alterações comportamentais observadas aqui, embora diferenciais para os dois pesticidas, reforçam as evidências epidemiológicas de que existe uma associação entre a exposição a organofosforados e desordens psiquiátricas. Assim, o presente estudo contribui para reforçar as preocupações com os impactos da exposição, mesmo que a doses que não causam sinais de toxicidade sistêmica, de pesticidas organofosforados na espécie humana, particularmente quando se trata do período de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

Abou-Donia M. Organophosphorus compounds Neurotoxicology. CRC Press, Boca Raton. 1992. FL: pp 446-458.

Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res*. 2011 Aug 10;221(2):367-78

Aldridge JE, Levin ED, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ. Health Perspect*. 2005a. 113: 527-531.

Aldridge, JE., Meyer, A., Seidler, FJ., Slotkin, TA. Alterations in Central Nervous System serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ. Health Perspect*. 2005b.113, 1027-1031.

Aldridge JE., Seidler FJ., Meyer A, Thillai I, and Slotkin TA. Serotonergic Systems Targeted by Developmental Exposure to Chlorpyrifos: Effects during Different Critical Periods. *Environ. Health Perspect* 2003.111: 1736-1743.

Amr, MM, Halim, ZS. and. Moussa SS. Psychiatric Disorders among Egyptian Pesticide Applicators and Formulators. *Environmental Research*. 1997. 73, 193–199.

Araújo AJ, Lima JS, Moreira JC, Jacob SC, Soares MO, Monteiro MCM, Amaral AM, Kuboa A, Meyer A, Cosenza C, Neves C, Markowitz S. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciência e saúde coletiva*. 2007. 12:115-130.

Araújo SMM, Lemos RNS, Queiroz MER., Nunes GS. Uso de inseticidas organofosforados nos pólos de produção na ilha de São Luís (MA): condições de trabalho e contaminação de hortaliças. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2001. v.11, p. 159-179.

Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109(8):851-7.

Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(33):14108-13.

Barone S, Das KP, Lassiter TL, White LD. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. 2000. *Neurotoxicology* 21: 15:36.

Bergink V, Van Megen HJ, Westenberg HG. Glutamate and anxiety. *European neuropsychopharmacology: The journal of European College of neuropsychopharmacology*. 2004. 14: 175-83.

Blair A, Zahm SH. Agricultural exposures and cancer. *Environ Health Perspect.* 1995. 103 Suppl 8:205-8. Review.

Braquenier JB, Quertemont E, Tirelli E, Plumier JC. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicol and Teratol.* 2010. 32: 234-239.

Brocardo PS, Assini F, Franco JL, Pandolfo P, Müller YM, Takahashi RN, Dafre AL, Rodrigues AL. Zinc attenuates malathion-induced depressant-like behavior and confers neuroprotection in the rat brain. *Toxicol Sci.* 2007. 97: 140-148

Bunney WE Jr, Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry.* 1965. 13(6):483-94.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(8):1193-205.

Casida JE, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol.* 2004. 17:983–98.

Castillo ARGL, Recondo E, Asbahr FR, Manfro GG. Transtornos de ansiedade. *Rev Bras Psiquiatr.* 2000. 22: 20-23

Celine F, Ouissame MF, Nasser H. Long-term adaptive changes induced by serotonergic antidepressant drugs. *Expert Rev Neurother.* 2006. 6: 235-245

Chambers, H.W. Organophosphorus compounds; An overview. In *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects* (J. Chambers and P. Levi, Ed.). *Academic Press.* 1992. pp. 11–12.

Chambers JE, Ma T, Boone JS, Chambers HW. Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sci.* 1994. 54(18):1357-64.

Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., Anand, K.J. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology.* 2007. 28, 931-937.

Clegg DJ, van Gemert M. Determination of the reference dose for chlorpyrifos: proceedings of an expert panel. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 1999. 2: 211-255.

Clément Y, Joubert C, Kopp C, Lepicard EM, Venault P, Misslin R, Cadot M, Chapouthier G. Anxiety in mice: a principal component analysis study. *Neural Plast.* 2007. 2007:35457.

Courtet P, Baud P, Abbar M, Boulenger JP, Castelnaud D, Mouthon D, Malafosse A, Buresi C. Association between violent suicidal behavior and the low activity allele of the serotonin transporter gene. *Mol. Psychiat.* 2001. 6: 338-341

Cryan JF, Page ME, Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. *Psychopharmacology.* 2005. 182(3):335-44.

Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000. 30:121(2):179-87.

D'Amato C, João P M Torres e Olaf Malm. DDT (Diclorodifenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quim Nova.* 2002. 25:995 - 1002

Dani JA, De Biasi M. Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2001. 70: 439-46.

Deakin JFW, Guimarães FS, Wang M, Hensman R. Experimental tests of the 5HT receptor imbalance theory of affective disturbance. Em: M Sandler, A Coppen, S Harnett (orgs.). 5-Hydroxytryptamine in psychiatry. A spectrum of ideas. *Oxford: Oxford University Press.* 1991. 143-154.

Degroot A, Treit D. Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res.* 2002. 949: 60-70

Degroot A, Treit D. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems interact in the modulation of anxiety. *Neuroscience.* 2003;117(2):493-501.

Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev.* 1979. 3(1):79-83.

Domingos JB, Longhinotti E, Machado VG, Nome F. A química dos ésteres de fosfato. 2003. *Química Nova.* No 5.

Dremencov E, Newman ME, Kinor N, Blatman-Jan G, Schindler Cj, Overstreet DH, Yadid G. Hyperfunctionality of serotonin-2C receptor-mediated inhibition of accumbal dopamine release in an animal model of depression is reversed by antidepressant treatment. *Neuropharmacology.* 2005. 48: 34–42.

Dribben WH, Creeley CE, Farber N. Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2011. 33(4):473-80.

Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2008. 84(1):30-44.

Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neubert D, Schulte-Hermann R, Spencer PS. Review of the

toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol*. 2008. 38 Suppl 2:1-125.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961. 7:88-95.

File SE, Kenny PJ, Cheeta S. The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2000. 66: 65-72

Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Krahe TE, Manhães AC. Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behav Brain Res*. 2006. 15;172(1):33-8.

Filgueiras CC, Ribeiro-Carvalho A, Nunes F, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009. 93(2):148-54.

Gorwood P. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2008. 10(3):291-9.

Graeff FG, Brandão ML. Neurobiologia das doenças mentais. *Lemos Editorial*. 1993.

Gray AJ, Thompson CM, Fukuto TR. Distribution and excretion of [¹⁴C]methamidophos after intravenous administration of a toxic dose and the relationship with anticholinesterase activity. *Pesticide biochemistry and physiology*. 1982. 18: 28-37.

Gross C, Hen R. The developmental origins of anxiety. *Nature*. 2004. 5: 545-552

GUPTA RC. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. *Toxicol Mech Methods*. 2004. 14: 103:143.

Heim C, Plotsky PM, Nemeroff CB. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004. 29(4):641-8. Review.

Icenogle LM, Christopher C, Blackwelder WP, Caldwell DP, Qiao D, Seidler FJ, et al. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology and teratology*. 2004. 26: 95-101.

Jaga K, Dharmani C. The interrelation between organophosphate toxicity and the epidemiology of depression and suicide. *Rev Environ Health*. 2007. 22: 57-73

Jamal GA, Hansen S, Pilkington A, Buchanan D, Gillham RA, Abdel-Azis M, Julu PO, Al-Rawas SF, Hurley F, Ballantyne JP. A clinical neurological, neurophysiological,

and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides. *Occup Environ Med.* 2002. 59: 434-441

Kandel E, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of Neural Science. 3rd Ed Appleton & Lange, International Edition. 1991.

Kandel E, Schawrtz JH, Jessel TM. Principals of neural science – 4. ed. Mc Graw Hill, 2000.

Korf J, van Praag HM. Endogenous depressions with and without disturbances in the 5-hydroxytryptamine metabolism: A biochemical classification? *Psychopharmacologia.* 1971. 19(2):148-52.

Lafer B. e Vallada Filho H.P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. *Revista Brasileira de psiquiatria.* 1999. Vol21.

Landrigan PJ. Pesticides and polychlorinated biphenyls (PCBs): an analysis of the evidence that they impair children's neurobehavioral development. *Mol Genet Metab.* 2001. 73(1):11-7. Review

Lauder JM, Schambra UB. Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environmental health perspectives.* 1999. 107:65-69.

Leonard, BE. The role of noradrenaline in depression: a review. *J. Psychophatology.* 1997. 11 (4): S39:S47.

Levin ED, Addy N, Christopher NC, Seidler FJ, Slotkin TA. Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposure in rats. *Developmental Brain Research.* 2001. 130: 83-89.

Levin ED, Addy N, Christopher NC, Seidler FJ et al. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. 2002. *Neurotoxicology and teratology.* 2001. 24: 733-741.

Levin ED, Timofeeva OA, Yang L, Petro A, Ryde IT, Wrench N, Seidler FJ, Slotkin TA. Early postnatal parathion exposure in rats causes sex-selective cognitive impairment and neurotransmitter defects which emerge in aging. *Behav Brain Res.* 2010. 2;208(2):319-27.

Li W, Casida JE. Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block outgrowth of neurite and cell process in cultured cells. *Toxicology letters.* 1998. 98:139-146.

Lima CS, Ribeiro-Carvalho A, Filgueiras CC, Manhães AC, Meyer A, Abreu-Villaça Y. Exposure to methamidophos at adulthood elicits depressive-like behavior in mice. *Neurotoxicol.* 2009. 30: 471-478.

Lima CS, Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Filgueiras CC, Manhães AC, Meyer A, Abreu-Villaça Y. Exposure to methamidophos at adulthood adversely affects serotonergic biomarkers in the mouse brain. *Neurotoxicology*, 2011. 32(6):718-24

Litovitz T L, Smilkstein M, Felberg L, Klein-Schwartz W, Berlin R, Morgan JR. Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *Am. J Emerg.* 1997. 15: 447-500.

London L, Flisher AJ, Wesseling C, Mergler D, Kromhout H. Suicide and exposure to organophosphate insecticides: cause or effect? *Am J Ind Med.* 2005. 47:308-21.

Meyer A, Seidler FJ, Cousins MM, and Slotkin TA. Research Article Developmental neurotoxicity elicited by gestational exposure to chlorpyrifos: when is adenylyl cyclase a target? *Environ Health Perspect.* 2003. 111(16): 1871–1876.

Meyer A, Seidler FJ, Aldridge JE, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Critical Periods for Chlorpyrifos-Induced Developmental Neurotoxicity: Alterations in Adenylyl Cyclase Signaling in Adult Rat Brain Regions after Gestational or Neonatal Exposure. *Environ Health Perspect.* 2004. 112: 295-301.

Mombereau, C., Kaupmann, K., Froestl, W., Sansig, G., van der Putten, H., Cryan, J.F. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA_B receptors in the modulation of anxiety and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology.* 2004. 29, 1050–1062

Moser VC. Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat: behavioral and biochemical parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999. 157: 94-106

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron.* 2002. 28;34(1):13-25. Review.

Nemeroff CB. The neurobiology of depression. *Sci. Am.* 1998. 278(6): 42-49

Newhouse PA, Potter A, Singh A. Effects of nicotinic stimulation on cognitive performance. *Curr Opin Pharmacol.* 2004. 4(1):36-46. Review.

Nunes-Freitas AL, Ribeiro-Carvalho A, Lima CS, Dutra-Tavares AC, Manhães AC, Lisboa PC, Oliveira E, Gaspar de Moura E, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: time course of effects on the central cholinergic system of rats. *Toxicol Sci.* 2011. 123(1):144-54.

Nunes F, Ferreira-Rosa K, Pereira Mdos S, Kubrusly RC, Manhães AC, Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC. Acute administration of vinpocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2011. 1;119(1-2):81-7.

- Nutt DJ. The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2002. 17: S1-S12
- Okuda T, Konishi A, Misawa H, Haga T. Substrate-induced internalization of high-affinity choline transporter. *J Neurosci.* 2011. 19;31(42):14989-97.
- Olausson P, Engel JA, Soderpalm B. Involvement of serotonin in nicotine dependence: processes relevant to positive and negative regulation of drug intake. *Farmacol. Biochem. Behav.* 2002. 71: 757-771
- Oswald I, Brezinova LE, Dunleavy DLF. On the slowness of action of tricyclic antidepressant drugs. *The British Journal of Psychiatry: The journal of Mental science.* 1972. 120: 673-677.
- Pena MF, Amaral EH, Von Sperling E, Cruz I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia a líquido de alta eficiência. *Revista de ecotoxicologia e meio ambiente.* 2003. 13: 37-44
- Pohl-Guimaraes F, Krahe TE, Medina AE. Early valproic acid exposure alters functional organization in the primary visual cortex. *Exp Neurol.* 2011. 228(1):138-48.
- Pope CN. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health.* 1999. 2: 161-181
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003. 463:3–33.
- Qiao D, Seidler FJ, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Fetal chlorpyrifos exposure: adverse effects on brain cell development and cholinergic biomarkers emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect.* 2003. 111(4):536-544.
- Qiao D, Seidler FJ, Abreu-Villaça Y, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Chlorpyrifos exposure during neurulation: cholinergic synaptic dysfunction and cellular alterations in brain regions at adolescence and adulthood. *Dev. Brain Res.* 2004. 148: 43-52.
- Quinn, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition.* 2005. 21, 775-777.
- Raines KW, Seidler FJ, Slotkin TA. Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001. 23;130(1):65-72.
- Recio R, Ocampo-Gómez G, Morán-Martínez J, Borja-Aburto V, López-Cervante M, Uribe M, Torres-Sánchez L, Cebrián ME. Pesticide exposure alters follicle-stimulating hormone levels in Mexican agricultural workers. *Environ Health Perspect.* 2005. 113(9):1160-3.

Rhodes MC, Seidler FJ, Qiao D, Tate CA, Cousins MM, Slotkin TA. Does pharmacotherapy for preterm labor sensitize the developing brain to environmental neurotoxicants? Cellular and synaptic effects of sequential exposure to terbutaline and chlorpyrifos in neonatal rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004. 195:203-217.

Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Resolução - RDC Nº 226, de 28 de setembro de 2004. Proíbe o uso do ingrediente ativo organofosforado clorpirifós em formulações de saneantes domissanitários.

Richardson J, Chambers J. Effects of gestational exposure to chlorpyrifos on postnatal central and peripheral cholinergic neurochemistry. *J Toxicol Environ Health A*. 2003. 14;66(3):275-89.

Richardson JR, Chambers JE. Neurochemical effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in developing rats. *Toxicol Sci*. 2004. 77(1):83-90.

Richardson JR, Chambers JE. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on cholinergic neurochemistry in developing rats. *Toxicol Sci*. 2005. 84(2):352-359.

Risch CS, Nemeroff CB. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J. Clin. Psychiat*. 1991. 53 (suppl. 10): 3-6

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res*. 1997. 30(3):289-304.

Roegge CS, Tomofeeva AO, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. Developmental diazinon neurotoxicity in rats: later effects on emotional response. *Brain Research Bulletin*. 2008. 75:166-172.

Rosenstock L, Daniell W, Barnhart S, Schwartz D, Demers PA. Chronic neuropsychological sequelae of occupational exposure to organophosphate insecticides. *American Journal of Industrial Medicine* n.18. 1990.

Rothlein J, Rohlman D, Lasarev M, Phillips J, Muniz J, McCauley L. Organophosphate pesticide exposure and neurobehavioral performance in agricultural and non-agricultural Hispanic workers. *Environ Health Perspect*. 2006. 114(5):691-6.

Rotterdam Convention – Notifications of final regulatory actions for banned or severely restricted chemicals. 12 December 2012

Roy TS, Andrews JE, Seidler FJ, Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*. 1998. 58: 62-68.

Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Sci.* 2003. 72: 267-271

Sanchez-Amate MC, Flores P, Sanchez-Santed F. Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. *Behav. Pharmacol.* 2001. 12: 285-292

Santibanez M., Bolumar F. and Garcia A.M. Occupational risk factors in Alzheimer's disease: a review assessing the quality of published epidemiological studies. *Occup. Environ.* 2007. 723–732.

Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American Journal of Psychiatry*. 1965. 122(5):509-522.

Schuh RA, Lein PJ, Beckles RA, Jett DA. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca²⁺/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002. 182:176–185.

SHAW AM, Boules M, Zhang Y, Williams K, Robinson J, Carlier PR, Richelson E. Antidepressant-like effects of novel triple reuptake inhibitors, PRC025 and PRC050. *Eur J Pharmacol.* 2007. 19;555(1):30-6.

Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of organophosphates: a case study of chlorpyrifos. In: R.C. Gupta, Editor, Toxicity of organophosphate and carbamate pesticides. *Elsevier Academic Press*. 2005. 293-314.

Slotkin TA, Tate CA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain region: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect* 2006a. 114:1542-6.

Slotkin TA, Tate CA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ Health Perspect.* 2006b. 114:1542-1546.

Slotkin TA and Seidler FJ. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res Bull.* 2007. 72: 232 – 274.

Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008a. 1;233(2):211-9.

Slotkin TA, Bodwell BE, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective impairment of acetylcholine systems in brain regions during adolescence and adulthood. *Environ Health Perspect.* 2008b. 116: 1308-1314.

Slotkin TA, Ryde IT, Levin ED, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of low dose diazinon exposure of neonatal rats: Effects on serotonin systems in adolescence and adulthood. *Brain Res Bull.* 2008c. 75:640-647.

Slotkin TA, Levin ED, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of parathion: progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicology and Teratology.* 2009. 31: 11-17.

Snedecor G.W., Cochran W.G. Statistical methods. 6th edn Iowa State University Press.1967

Stahl SM. Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressant have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiatry.* 1998. 4: 5-14.

Stein DJ. Depression, anhedonia, and psychomotor symptoms: the role of dopaminergic neurocircuitry. *CNS Spectrums.* 2008.13(7):561-5.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 1985. 85(3):367-70

Swedo SE, Leonard HL, Allen AJ. New developments in childhood affective and anxiety disorders. *Curr Probl Pediatr.* 1994. 24(1):12-38. Review.

Thomas PT. Pesticide-induced immunotoxicity: are Great Lakes residents at risk? *Environ Health Perspect.* 1995. 103 Suppl 9:55-61. Review

Timofeeva OA, Roegge CS, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. *Neurotoxicol Teratol.* 2008a. 30(1):38-45.

Timofeeva OA, Sanders D, Seemann K, Yang L, Hermanson D, Regenbogen S, Agoos S, Kallepalli A, Rastogi A, Braddy D, Wells C, Perraut C, Seidler FJ, Slotkin TA, Levin ED. Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Res Bull.* 2008b. 16;77(6):404-11.

U. S. EPA. Chlorpirifos: end use products cancellation order. 2002. Fed Reg 67:3698-3700. Disponível em:<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2002>.

van Wijngaarden E. An exploratory investigation of suicide and occupational exposure. *Journal of Occupational and Environmental Medicine.* 2003. 45:96-101.

Walker DL, Davis M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002. 71(3):379-92. Review.

White KJ, Walline CC, Barker EL. Serotonin transporters: implications for antidepressant drug development. *AAPS J.* 2005. 7: E421-433

Whitney KD, Seidler FJ, Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995. 134(1):53-62.

Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 1997. 20(2):92-8. Review.

Zarate e Manji. Putative drugs and target for bipolar disorder. *The mount sinai journal of medicine.* 2008. 75(3): 226-247.

Methamidophos Exposure During the Early Postnatal Period of Mice: Immediate and Late-Emergent Effects on the Cholinergic and Serotonergic Systems and Behavior

Carla S. Lima,*† Ana C. Dutra-Tavares,* Fernanda Nunes,* André L. Nunes-Freitas,* Anderson Ribeiro-Carvalho,‡ Cláudio C. Filgueiras,* Alex C. Manhães,* Armando Meyer,§ and Yael Abreu-Villaça*¹

*Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 20550-170, Brazil; †Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21715-000, Brazil; ‡Departamento de Ciências, Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, São Gonçalo, RJ 24435-005, Brazil; and §Instituto de Estudos em Saúde Coletiva e Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-598, Brazil

¹To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Neurofisiologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, 5 andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ 20550-170, Brazil. Fax: (5521) 2868-8029. E-mail: yael_a_v@yahoo.com.br.

Received February 7, 2013; accepted April 8, 2013

Organophosphates (OPs) are among the most used pesticides. Although some OPs have had their use progressively more restricted, other OPs are being used without sufficient investigation of their effects. Here, we investigated the immediate neurochemical and delayed neurochemical and behavioral actions of the OP methamidophos to verify whether there are concerns regarding exposure during early postnatal development. From the third to the ninth postnatal day (PN), Swiss mice were sc injected with methamidophos (1 mg/kg). At PN10, we assessed cholinergic and serotonergic biomarkers in the cerebral cortex and brainstem. From PN60 to PN63, mice were submitted to a battery of behavioral tests and subsequently to biochemical analyses. At PN10, the effects were restricted to females and to the cholinergic system: Methamidophos promoted increased choline transporter binding in the brainstem. At PN63, in the brainstem, there was a decrease in choline transporter, a female-only decrease in 5HT_{1A} and a male-only increase in 5HT₂ receptor binding. In the cortex, choline acetyltransferase activity was decreased and 5HT₂ receptor binding was increased both in males and females. Methamidophos elicited behavioral alterations, suggestive of increased depressive-like behavior and impaired decision making. There were no significant alterations on anxiety-related measures and on memory/learning. Methamidophos elicited cholinergic and serotonergic alterations that depended on brain region, sex, and age of the animals. These outcomes, together with the behavioral effects, indicate that this OP is deleterious to the developing brain and that alterations are indeed identified long after the end of exposure.

Key Words: organophosphate; AChE; ChAT; serotonin; mood disorders; depression; development.

Organophosphates (OPs) are among the most widely used class of pesticides in the world (FAOSTAT, 2010; Terry,

2012). The effects of exposure to high levels of OPs are well documented and mainly involve irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), causing an accumulation of acetylcholine in synaptic clefts and, consequently, cholinergic hyperstimulation (Mileson *et al.*, 1998). However, when the doses of exposure and AChE inhibition are low, the effects in other neurotransmitter systems may prevail and each pesticide in this class may substantially differ in their effects on brain function (Aldridge *et al.*, 2005a; Gupta, 2004; Pope, 1999; Timofeeva *et al.*, 2008). Subchronic or chronic exposures to doses devoid of systemic toxicity are more common in real life than acute exposure to high doses, making the former kinds of exposure a necessary topic of investigation.

Extensive evidence indicates that the developing brain is more vulnerable to OP exposure in that neurodevelopmental effects occur at doses below the threshold for systemic toxicity or even for AChE inhibition (Flaskos, 2012; Slotkin, 2004). During the "brain growth spurt," which, in rodents, comprises the first 10 days of postnatal life (Bayer *et al.*, 1993; Clancy *et al.*, 2007; Quinn, 2005), the brain is highly vulnerable to several neurotoxic agents (Dribben *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2011; Nunes-Freitas *et al.*, 2011; Pohl-Guimaraes *et al.*, 2011) including OPs (Aldridge *et al.*, 2003, 2005a; Slotkin and Seidler, 2007, 2008). This susceptibility is thought to be due to events such as intense dendritic arborization, synaptogenesis, and the migration of multiple neuronal populations in most brain regions (Bandeira *et al.*, 2009; Dobbins and Sands, 1979). It is also the period of entry of cholinergic fibers into the cortex and the period within which the expression of major components of the cholinergic system peak in several brain regions (for review: Abreu-Villaça *et al.*, 2011; Dwyer *et al.*, 2008).

It has been demonstrated that exposure to OPs such as diazinon, parathion, chlorpyrifos, and dichlorvos during the perinatal period elicits widespread abnormalities in indices of cholinergic, dopaminergic, and serotonergic (5HT) synaptic function (Aldridge *et al.*, 2005b; Levin *et al.*, 2010; Slotkin and Seidler, 2007, 2008; Slotkin *et al.*, 2006b, 2008c), which are known to promote behavioral changes later in life (Ahlbom *et al.*, 1995; Aldridge *et al.*, 2005a; Dam *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2010; Slotkin *et al.*, 2001). Accordingly, some OPs have suffered severe restrictions in several countries such as United States (U.S. EPA, 2002) and Brazil (ANVISA, 2004). Despite that, several other OPs are still used, mostly in developing countries (FAOSTAT, 2010), without sufficient investigation of their effects. One such case is the OP methamidophos. Its use has been restricted in several countries (ANVISA, 2011; Rotterdam Convention, 2010a), but it is still extensively used and, in fact, its use has been increasing in the last few years (Rotterdam Convention, 2010b). In our previous studies that investigated the effects of methamidophos at adulthood, we detected behavioral changes associated with depression (Lima *et al.*, 2009) and changes in neurochemical markers of serotonin function (Lima *et al.*, 2011) at exposure levels that caused low cholinesterase inhibition (15%) and even after recovery of cholinesterase activity. These results indicate that methamidophos is able to cause damage to the mature nervous system. However, we do not know whether exposure during critical periods of development elicits similar changes.

Accordingly, here we sought to achieve two main objectives. The first one was to investigate the immediate neurochemical actions of early methamidophos exposure on the cholinergic and serotonergic systems to clarify its interference on brain processes, particularly during the "brain growth spurt." The second objective was to investigate the effects at adulthood, so as to verify whether there are concerns regarding long-term and/or late-emergent neurochemical alterations. We further extended our study to include a battery of behavioral tests at adulthood to verify whether our exposure protocol resulted in functional alterations. We hypothesize that methamidophos exposure would produce immediate and late-emergent cholinergic and serotonergic alterations in the brain, as well as behavioral effects at adulthood. To test this hypothesis, mice were subchronically exposed to methamidophos from the third to the ninth postnatal day. Both by the end of exposure and at adulthood, to analyze the cholinergic system, we assessed the binding of hemicholinium-3 to the high-affinity presynaptic choline transporter (Ch transporter) and the activities of choline acetyltransferase (ChAT) and AChE. For the serotonergic system analysis, we assessed the binding to the 5HT_{1A} and 5HT₂ receptors, as well as the binding to the presynaptic 5HT transporter. The analyses of the cholinergic and serotonergic systems were performed in the cerebral cortex and brainstem.

The cerebral cortex contains major cholinergic and serotonergic projections, and the brainstem, in addition to dendritic arbors, contains the majority of the cholinergic and serotonergic cell bodies of pathways that ascend into the cerebral cortex, hippocampus, and other regions involved in affective disorders and cognition. Considering the relevant association between these neurotransmitter systems, cognitive function, and mood disorders, we chose the following tests to evaluate the behavior of methamidophos-exposed mice at adulthood: The anxiety-like behavior was assessed through the use of the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) tests, the depressive-like behavior was evaluated through the forced-swimming test, the step-down passive avoidance test investigated memory and learning, and the time spent in the center of the EPM was used to assess decision making.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were carried out under institutional approval of the Animal Care and Use Committee of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/006/2011), in accordance with the declaration of Helsinki and with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the National Institutes of Health. All Swiss mice were bred and maintained in a temperature-controlled vivarium on a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 1:00 a.m.). Access to food and water was *ad lib*. After mating, each female mice was placed in an individual cage with free access to water and food until delivery.

Methamidophos Dose Selection

Previous studies have found that developmental exposure to OPs such as chlorpyrifos, diazinon, and parathion, resulting in up to 20% reduction of AChE activity 1 day postexposure, differentially target distinct neurotransmitter systems and behaviors in the developing and adult brain of rodents (Slotkin and Seidler, 2007; Slotkin *et al.*, 2006b, 2008c, 2009). In order to find a comparable dose of methamidophos, 63 animals from 11 litters were submitted to daily sc injections of methamidophos (1 ml/kg, on the hindquarters) from postnatal day (PN)3 to PN9. Control mice (CT) received dimethyl sulfoxide (DMSO) as vehicle. For each litter, offspring were distributed into four groups: higher dose (HighD, 3 mg/kg), intermediate dose (IntD, 1 mg/kg), lower dose (LowD, 0.25 mg/kg), and CT. No more than one male and one female from each litter were assigned to each group.

Mice were sacrificed at PN10 (24–26 h after the last injection), the brains were dissected, and the regions of interest were immediately frozen and stored at -45°C for later analysis of AChE activity. Dissection was performed by a cut through the cerebellar peduncles, whereupon the cerebellum (including flocculi) was lifted from the underlying tissue. The cerebral cortex (forebrain with removal of the hippocampus) was separated from the brainstem (midbrain + pons + medulla) by a cut made rostral to the thalamus. AChE activity was measured by the spectrophotometric mode described by Ellman *et al.* (1961). The cerebral cortex and the brainstem of each animal were weighed and homogenized to approximately 90 mg/ml in sodium phosphate buffer (0.12M, pH 7.6) using a homogenizer Ultra-Turrax T10 basic (IKA, São Paulo, Brazil). Each assay contained 0.1 ml of diluted homogenate in a total volume of 1.16 ml, with final concentrations of 102mM of sodium phosphate buffer (pH 7.6), 0.3mM of 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid, and 1mM of acetylthiocholine iodide. Immediately after the addition of tissue, the duplicates were read at 412nm in kinetic mode every 30 s during 2min. Blank absorbances were subtracted from the final readings. To get the values of AChE activity in nmols/min, we used a previously built standard curve of L-cysteine. The activity was

determined relative to tissue protein. Proteins were measured by bicinchoninic acid (BCA) protein assay.

As described in the Results section, the IntD of methamidophos (1 mg/kg) elicited approximately 20% inhibition of AChE in the brain. Accordingly, for the next experiments, offspring from each litter was exposed either to this dose of methamidophos (MET group) or to vehicle (CT group). To further evaluate whether, during the period of exposure, methamidophos elicited higher levels of AChE inhibition, separate groups of mice received the IntD of methamidophos or vehicle and were sacrificed either 1 or 4 h after the first (PN3, three litters, $n = 24$) or last (PN9, four litters, $n = 24$) injection. At each age, male and female mice were distributed into two treatment groups (CT and MET) and two time points (1 and 4 h). As described in the Results section, AChE inhibition ranged from 29 to 50% at PN3 and from 52 to 67% at PN9.

Evaluation of Neurochemical and Behavioral Effects of Methamidophos

Time Line of the Experiments

One hundred mice from 19 litters were used in this set of experiments. Each litter was distributed into either MET or CT groups. Daily exposure extended from PN3 to PN9. Body weights were measured daily during the period of exposure. Thirty-two animals were sacrificed at PN10. The brains were dissected as described above, and the cerebral cortex and brainstem were immediately frozen and stored at -45°C for later biochemical analysis. Sixty-eight mice were maintained in the vivarium until adulthood, at which time they were submitted to a battery of behavioral tests from PN60 to PN63 and subsequently sacrificed. From these, 32 had the brains dissected and stored for later analysis. No more than one male and one female from each litter were assigned to each treatment group/age.

Evaluation of Cholinergic and Serotonergic Systems

At PN10 and PN63, we evaluated three cholinergic and three serotonergic biomarkers. Regarding the cholinergic system, we evaluated ChAT activity, the binding of [^3H]hemicholinium-3 to the Ch transporter, and AChE activity. ChAT, the enzyme that catalyses acetylcholine biosynthesis, is a constitutive marker for the cholinergic system, which reflects the concentration of cholinergic nerve terminals. Accordingly, ChAT increases during cholinergic synaptogenesis but does not change in response to stimuli that alter cholinergic neuronal activity (Aubert *et al.*, 1996; Happe and Murrin, 1992; Zahalka *et al.*, 1992). In contrast, the Ch transporter is responsive to neuronal activity (Klemm and Kuhar, 1979; Simon *et al.*, 1976); moreover, because acetylcholine synthesis and release depend on the availability of choline, these events are indirectly dependent on the functionality of the transporter and AChE (for review: Ribeiro *et al.*, 2006). For the serotonergic system analysis, we chose to assess the binding to the 5HT_{1A} and 5HT₂ receptors and the binding to the 5HT transporter. The function of these receptors is particularly important during the neonatal period due to their role in modulating both neuronal and glial proliferation and maturation (for review: Azmitia, 2001). In addition, these two receptors play major roles in 5HT-related mental disorders, especially depression (Arango *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2000), whereas the presynaptic 5HT transporter is the primary target for antidepressant drugs (Maes and Meltzer, 1995; Nemeroff, 1998; Nutt, 2002).

Tissues were thawed and homogenized in ice-cold 50mM Tris (pH 7.4). Aliquots of this homogenate were withdrawn for measurements of total protein, ChAT, and AChE activities. The remaining homogenate was then sedimented by centrifugation at $39,000 \times g$ for 15 min. The pellet was resuspended in the original volume of buffer and resedimented, and the resultant pellet was resuspended in $\frac{1}{4}$ of the original volume using a smooth glass homogenizer fitted with a Teflon pestle. Aliquots of this last resuspension were withdrawn for measurements of binding to the Ch transporter, 5HT_{1A} and 5HT₂ receptor binding, 5HT transporter binding and for membrane protein. Proteins were measured by BCA protein assay. All assays have been described in detail in previous articles (Abreu-Villaça *et al.*, 2003, 2004; Lima *et al.*, 2011;

Nunes-Freitas *et al.*, 2011; Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2008, 2009) and will therefore be presented briefly. At PN60, AChE activity measurements came from the same homogenate used for the ChAT and total protein, whereas at PN10, the AChE activity assay was run in a separate group of mice, as described in the Methamidophos dose selection section.

ChAT activity. Assays contained tissue homogenate diluted in phosphate buffer (pH = 7.9) and a mixture with final concentrations of 200mM NaCl, 17mM MgCl₂, 1mM EDTA, Triton X-100 0.2% in buffer, 0.12mM physostigmine, 0.6mg/ml bovine serum albumin, 20mM choline chloride, and 50mM [^{14}C]acetyl-coenzyme A. Triplicate samples from each homogenate were pre-incubated for 15 min at 4°C and then incubated for 30 min at 37°C . Under these conditions, the enzymatic reaction took place and ChAT catalyzed the synthesis of acetylcholine. Labeled acetylcholine was then extracted and the activity determined relative to tissue protein.

High-affinity choline uptake. It was assessed with the binding of [^3H]hemicholinium-3 to the presynaptic high-affinity choline transporter. The binding of [^3H]hemicholinium-3 was determined using a final ligand concentration of 2nM in the membrane fraction; incubations lasted for 20 min at 20°C in a buffer consisting of 10nM NaKHPO₄/150nM NaCl (pH 7.4), and unlabeled hemicholinium-3 (20 μM) was used to displace specific binding for the cholinergic transporter. Incubations were stopped by the addition of excess of ice-cold incubation buffer, and the labeled membranes were trapped by rapid vacuum filtration onto glass fiber filters that were presoaked in 0.15% polyethyleneimine. The filters were then washed with incubation buffer, and radiolabeling was determined. Data were obtained by calculating the specific binding per milligrams of membrane protein.

Serotonin receptors and transporter. The 5HT receptors binding was evaluated by using two radioligands: 1nM [^3H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin for 5HT_{1A} receptors and 0.4nM [^3H]ketanserin for 5HT₂ receptors. Binding to the presynaptic 5HT transporter was evaluated with 85pM [^3H] paroxetine. For 5HT_{1A} receptors, incubations lasted for 30 min at 25°C in a buffer consisting of 50mM Tris (pH 8), 0.5mM MgCl₂, and 0.5mM sodium ascorbate; 100 μM 5HT was used to displace specific binding. For 5HT₂ receptors, incubations lasted for 15 min at 37°C in 50nM Tris (pH 7.4) and specific binding was displaced with 10 μM methysergide. For binding to the presynaptic 5HT transporter, incubations lasted for 120 min at 20°C in a buffer consisting of 50mM Tris (pH 7.4), 120mM NaCl, and 5mM KCl; 100 μM 5HT was used to displace specific binding. Incubations were stopped by the addition of excess of ice-cold incubation buffer, and the labeled membranes were trapped by rapid vacuum filtration onto glass fiber filters that were presoaked in 0.15% polyethyleneimine. The filters were then washed with incubation buffer, and radiolabeling was determined. Data were obtained by calculating the specific binding per milligrams of membrane protein.

Behavioral Tests

From PN60 to PN63, mice were submitted to the four behavioral tests described below. Due to the presence of technical problems with the video data in some of the tests, the sample size used for the quantitative analysis (indicated between parentheses) varied from test to test. On the first day, anxiety levels and decision making were assessed through the use of the EPM ($n = 67$). This test was performed between 2:00 and 4:00 p.m. On the next day, mice were submitted to the OF test ($n = 63$) in the morning (between 09:00 and 11:00 a.m.) and to the forced swimming test ($n = 48$) in the afternoon (between 2:00 and 4:00 p.m.). The OF was used to assess both locomotor activity and anxiety levels, whereas the forced swimming investigated the depressive-like behavior. Finally, memory and learning was assessed in the morning of the fourth day of testing through the use of the step-down passive avoidance test ($n = 68$). Because the EPM and forced swimming tests are classically used to investigate emotional reactivity, both tests were performed in the same period of the circadian cycle of the mice (dark phase). The other tests were performed in the light phase. All behavioral tests were performed in a testing room next to our vivarium and with

lights on (60W fluorescent light bulb, 3 m high). All animals were allowed to habituate for 10 min in the testing room before each behavioral test.

EPM. The anxiety-like behavior was initially investigated by using the EPM test. The test procedure is described in detail elsewhere (Abreu-Villaça *et al.*, 2008). The EPM is shaped like a plus sign and consists of two "open" (no walls, 5×28.5cm) and two "closed" (5×28.5×14cm) arms, arranged perpendicularly and elevated 50cm above the floor. The test began with the animal being placed on the center of the equipment, facing a closed arm. Each test lasted 10 min in a sound attenuated room. All tests were videotaped, and the percentage of time spent in the open arms (%Time OA: the time spent in open arms divided by time spent in open + closed arms) and the percentage of open arms entries (%Entries OA: the number of entries in open arms divided by number of entries in open + closed arms) were used as anxiety measures (Rodgers and Dalvi, 1997). Increased %Time OA and/or %Entries OA correspond to decreased anxiety-like behavior and *vice versa* (Rodgers and Dalvi, 1997). The number of closed arms entries (Entries CA) was used as a measure of activity, and the time spent in the center of the maze (Time Cen) was used as a measure of decision making (Fraga *et al.*, 2011; Rodgers *et al.*, 1997). All the variables were scored using the video images of the tests.

OF. The OF arena consists of an transparent acrylic box (46cm length × 46cm width × 43cm height) that was equipped with 2 arrays of 16 infrared beams each, positioned at 1.5cm above the floor to measure horizontal spontaneous locomotor activity. Interruptions of photocell beams were detected by a computer system, and the location of the animal was calculated by the software with a 0.1-s resolution. Each mouse was individually placed in the center of the arena, and spontaneous locomotor activity was determined. Total ambulation (Ambulation OF) was quantified on the basis of the traveled distance. In addition, considering that measures of central exploration are often regarded as anxiety-related indices (Filgueiras *et al.*, 2009; Prut and Belzung, 2003), the time spent in the center (Time Cen OF) was used as a measure of anxiety-like behavior. Increased Time Cen OF corresponds to decreased anxiety-like behavior and *vice versa* (Filgueiras *et al.*, 2009; Prut and Belzung, 2003).

Forced swimming test. Each mouse was submitted to a 10-min forced swimming testing (FST) session. The test procedure is described in detail elsewhere (Filgueiras *et al.*, 2006). Briefly, each mouse was placed in a plastic container (diameter = 21 cm, height = 23 cm) filled with 16 cm of water at about 25°C. The animal's behavior was continuously recorded throughout the testing session with an overhead video camera. Animals were considered to be immobile when they remained floating with all limbs and tail motionless. The time the animals spent in this condition was considered to be the measure of immobility (Immob Time) and was used as depressive-like measure. Increased Immob Time corresponds to increased depressive-like behavior.

Step-down passive avoidance test. The test apparatus contained one chamber, 25×25×25 cm (length × width × height). The test procedure is described in detail elsewhere (Abreu-Villaça *et al.*, 2013). Mice were submitted to two testing sessions: Initially, in a training/acquisition session, subjects were placed in a circular platform (diameter = 6.5 cm) and allowed up to 3 min to descend from it, whereupon they received a mild foot shock (0.3 mA/3 s). Three hours later, the animals were retested and allowed up to 3 min to descend from the platform (shock was not administered). The latency (L) to descend from the platform on the first (L0) and second (L3) sessions was registered. The learning/memory component of the passive avoidance task is expressed as an increase in the time the animal takes to descend from the platform from the first to the second session. Therefore, in order to visualize more clearly differences between groups, the learning/memory component of the task was evaluated by calculating a memory/learning index as follows: (L3 – L0)/L0.

Materials

Radioisotopically labeled compounds came from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA): [¹⁴C] Acetyl-CoA (specific activity, 4.0 Ci/mmol), [³H]hemicholinium-3 (specific activity, 170 Ci/mmol), [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (specific activity, 170.2 Ci/mmol), [³H]ketanserin (specific activity, 67.0 Ci/mmol), and [³H]paroxetine (specific activity, 24.4 Ci/mmol). Sigma Chemical

Co. (St Louis, MO) was the source for bovine albumin, BCA kit, eserine hemisulfate salt, 3-heptanone, sodium tetraphenylborate, Triton X-100, methamidophos, serotonin, acetylthiocholine, methylsergide, and polyethyleneimine. VETEC Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ) was the source for all other reagents.

Statistical Analysis

AChE Activity

At PN10, the data were evaluated by ANOVA. Dose (HighD, IntD, LowD, and CT), Brain Region (cerebral cortex and brainstem), and Sex were used as between-subject factors. At PN3, PN9 (1 and 4 h after injection) and PN63, separate ANOVAs on all factors—Treatment (MET and CT), Brain Region (cerebral cortex and brainstem), and Sex—were carried out. For PN3 and PN9 data, Time (1 and 4 h after injection) was also a factor in the analysis.

Body Weight

A repeated-measures ANOVA (rANOVA) was carried out. Treatment (MET and CT) and Sex were used as factors. Day (PN3–PN9) was considered the within-subject factor. Within each treatment, animals from the same litter were considered as $n = 1$.

Cholinergic and Serotonergic Markers

Results were evaluated first by two rANOVAs on all factors: Treatment (MET and CT), Brain Region (cerebral cortex and brainstem), Age (PN10 and PN63), and Sex. For the first rANOVA, cholinergic measures (ChAT and Ch transporter) were considered the within-subject factor. For the second rANOVA, serotonergic measures (5HT_{1A} receptor, 5HT₂ receptor, and 5HT transporter) were considered the within-subject factor.

Behavioral Tests

Results were evaluated by ANOVAs. Treatment (MET and CT) and Sex were used as between-subject factors. For the elevated plus maze, EPM measures (%Time OA and %Entries OA) were considered the within-subject factor. Separate ANOVAs on Entries CA and Time Cen were carried out. For the open field, OF measures (Ambulation OF, Time Cen OF) were considered the within-subject factor. For the FST, an ANOVA on Immob Time was carried out. For the passive avoidance, an ANOVA on the (L3 – L0)/L0 index was carried out.

Whenever the ANOVAs indicated treatment effects that differed among the different within-subject factors, brain regions, ages, and/or sexes, data were then re-examined separately using lower order ANOVAs. All data were compiled as means and standard errors. Data were log transformed whenever variance was heterogeneous. All statistical results were described in the Results section. However, to avoid repetition, only results from the lower order tests were provided in the figures. Figures were segmented by sex only when significant Treatment × Sex interactions were observed. Significance was assumed at the level of $p < 0.05$ for main effects; however, for interactions at $p < 0.1$, we also examined whether lower order main effects were detectable after subdivision of the interactive factors (Snedecor and Cochran, 1967). The criterion for interaction terms was not used to assign significance to the effects but rather to identify interactive factors requiring subdivision for lower order tests of main effects of Treatment, the factor of chief interest (Snedecor and Cochran, 1967). The effects of MET exposure were presented as the percentage change from the corresponding CT group, but statistical evaluations involved only the original data; for reference, the CT values for all variables are provided in Table 1.

RESULTS

Methamidophos Dose Selection (Table 2)

The ANOVA on all factors (Dose, Brain Region, and Sex) identified a dose-dependent increase in inhibition of AChE at

TABLE 1
Control Values for Cholinergic and Serotonergic Biomarkers and for Behavioral Measures

	Cortex					
	PN10			PN60		
	Female	Male	Combined	Female	Male	Combined
AChE	295.0±24.0	292.2±9.2	293.2±9.6	840.9±26.1	795.1±23.8	819.5±18.2
ChAT	0.23±0.02	0.22±0.01	0.22±0.01	1.40±0.05	1.26±0.06	1.33±0.04
ChT	43.4±1.6	44.2±1.5	43.8±1.1	103.5±4.6	111.2±3.7	107.3±3.0
5HT _{1A}	32.8±2.8	27.2±0.6	29.7±1.6	45.3±0.8	39.4±1.1	42.3±1.0
5HT ₂	29.3±1.5	23.2±0.9	25.9±1.3	59.6±1.7	56.4±2.0	58.0±1.3
5HTT	139.3±3.6	141.1±7.6	140.3±4.3	183.2±5.3	172.0±7.2	177.6±4.5
	Brainstem					
	PN10			PN60		
	Female	Male	Combined	Female	Male	Combined
AChE	432.7±16.7	385.9±4.9	401.5±8.5	100.5±3.5	97.5±2.2	98.9±2.0
ChAT	0.45±0.01	0.47±0.03	0.46±0.02	0.63±0.02	0.57±0.02	0.60±0.02
ChT	34.5±1.5	41.9±1.4	38.7±1.4	24.3±0.6	25.6±0.5	25.0±0.4
5HT _{1A}	12.9±1.2	14.7±0.7	14.1±0.7	23.2±0.7	22.1±0.7	22.7±0.5
5HT ₂	27.7±3.0	26.7±2.1	27.0±1.7	7.5±0.2	4.9±0.4	6.2±0.4
5HTT	211.4±5.4	219.7±13.1	216.9±8.7	109.6±4.3	108.7±4.6	109.2±3.1
	Behavior					
		Female	Male	Combined		
EPM	%Time OA	4.1±1.2	1.7±0.5	2.8±0.7		
	%Entries OA	10.5±2.9	6.8±2.1	8.6±1.8		
	Time Cen	82.8±10.9	82.5±9.7	82.6±7.2		
OF	Entries CA	9.6±1.2	8.9±0.9	9.2±0.7		
	Ambulation OF	1716.9±149.7	1830.5±151.8	1763.2±106.7		
	Time Cen OF	32.4±4.5	31.3±6.3	31.9±3.6		
FST	Immob Time	7.8±4.6	22.9±8.5	15.7±5.2		
PA	(L3 – L0)/L0	2.3±0.7	1.3±0.3	1.9±0.5		

Note. Neurochemical biomarkers: AChE (nmoles/min/mg protein); ChAT (fmol/mg protein/min); ChT, 5HT_{1A}, 5HT₂, and 5HTT (fmol/mg protein). Behavioral measures: Time Cen (s); Ambulation (cm); Immob Time (s). PA, passive avoidance test; %Time OA, percentage of time spent in the open arms; %Entries OA, percentage of entries in the open arms; EntriesCA, number of entries in the closed arms; Time Cen, time spent in the center; Ambulation, traveled distance; Immob Time, immobility time; (L3 – L0)/L0, memory/learning index.

PN10 (Dose: $F_{3,109} = 61.0, p < 0.001$). The IntD and HighD elicited significant inhibition compared with the CT group in the brainstem and cortex ($p < 0.001$ for all comparisons), whereas the LowD elicited a significant inhibition only in the brainstem ($p = 0.005$). The IntD produced 20.0% of AChE inhibition in the cerebral cortex and 18.7% inhibition in the brainstem. There were no differences in AChE inhibition between males and females. Accordingly, the IntD of methamidophos was chosen to be used in the next set of experiments, in which other aspects of the cholinergic system, the serotonergic system, and animals behavior were evaluated.

The analysis of AChE inhibition 1 or 4 h after the first (PN3) or last (PN9) injection of the IntD of methamidophos elicited higher levels of AChE inhibition during the period of exposure. At PN3 and PN9, the ANOVAs on all factors (Treatment, Brain

Region, Time, and Sex) indicated that methamidophos elicited comparable inhibition in both brain regions, at the two moments after injection and in both sexes (PN3—Treatment: $F_{1,32} = 76.5, p < 0.001$; PN9—Treatment: $F_{1,32} = 43.9, p < 0.001$). At PN3, in the cerebral cortex, AChE inhibition was of 43.4% 1 h after the first injection and 41.6% 4 h after the first injection ($p < 0.01$ for both comparisons). In the brainstem, 1 h after the injection, the mean inhibition was of 29.3% and reached 50.2% at 4 h ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). At PN9, 1 h after the last injection, AChE inhibition in the cerebral cortex was of 53.8% and reached 67.2% at 4 h ($p < 0.01$ for both comparisons). In the brainstem, AChE inhibition was of 52.3% 1 h after the last injection and 53.5% 4 h after the injection ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively).

AChE activity had returned to control levels at adulthood.

TABLE 2
Acetylcholinesterase Activity During Methamidophos Dose Selection (sc Injected) and at Different Time Points After the Selection of the IntD for the Remainder of the Study

	Dose selection (AChE inhibition at PN10)				
	LowD		IntD		HighD
Cortex	-3.5 ± 3.1		-19.9 ± 1.7***		-33.4 ± 1.6***
Brainstem	-9.8 ± 2.9**		-18.7 ± 2.3***		-26.2 ± 2.1***
	AChE inhibition using the IntD				
	PN3 (first injection)		PN9 (last injection)		PN63 (adulthood)
	1 h after injection	4 h after injection	1 h after injection	4 h after injection	
Cortex	-43.4 ± 6.6**	-41.6 ± 4.3**	-53.8 ± 10.3**	-67.2 ± 6.8**	-4.5 ± 2.1
Brainstem	-29.3 ± 7.6**	-50.2 ± 3.6***	-52.3 ± 5.4***	-53.5 ± 3.6**	-3.1 ± 2.7

Note. Data presented as percent change from control values. Bold indicates the dose chosen to be used in the next set of experiments. HighD (3 mg/kg), IntD (1 mg/kg), LowD (0.25 mg/kg).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, versus respective control group.

Effects on Body Mass (Fig. 1)

Body mass significantly increased throughout the exposure period (Day: $F_{6,342} = 927.1$; $p < 0.001$). However, the rANOVA did not indicate significant Treatment effects or interactions.

Overall Analysis of Cholinergic and Serotonergic Biomarkers

The rANOVA across cholinergic biomarkers (ChAT and Ch transporter), treatments, brain regions, ages, and sexes identified interactions of Treatment × Age ($F_{1,142} = 4.2$; $p = 0.04$), Treatment × Cholinergic measure × Sex ($F_{1,142} = 4.9$; $p = 0.03$), and Treatment × Cholinergic measure × Region × Age ($F_{1,142} = 2.9$; $p = 0.09$). The rANOVA across the serotonergic biomarkers (5HT_{1A} receptor, 5HT₂ receptor, and 5HT transporter), treatments, brain regions, ages and sexes identified interactions of Treatment × Age × Sex ($F_{1,119} = 3.8$; $p = 0.05$), Treatment × Region × Age × Sex ($F_{1,119} = 3.3$; $p = 0.07$), Treatment × Serotonergic measure ($F_{2,238} = 4.3$; $p = 0.02$), Treatment × Serotonergic measure × Age × Sex ($F_{2,238} = 2.9$; $p = 0.05$), and Treatment × Serotonergic measure × Region × Age × Sex ($F_{2,238} = 3.7$; $p = 0.03$). Given the interactions, identified in both rANOVAs, we separated the data into the individual cholinergic and serotonergic measures, brain regions, and ages and then re-examined the results. After subdividing the data, we kept the factor Sex in the analysis.

Effects on the Cholinergic and Serotonergic Systems During Early Postnatal Development (Fig. 2)

Methamidophos exposure elicited sex-dependent effects on Ch transporter binding in the brainstem at PN10 (Treatment: $F_{1,27} = 11.5$, $p = 0.002$; Treatment × Sex: $F_{1,27} = 13.6$, $p = 0.001$). Separate analyses for males and females indicated

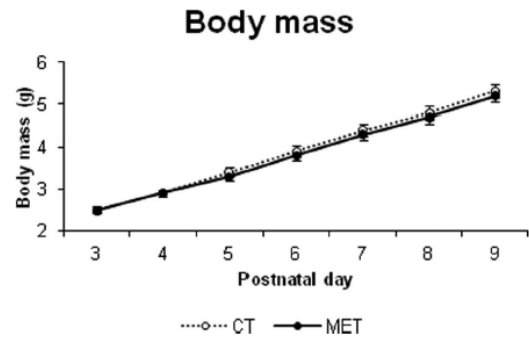


FIG. 1. Effects of neonatal methamidophos exposure (1 mg/kg/day sc) on body mass during the period of exposure. Values are means ± SEM. MET, methamidophos exposure group.

significant effects for females only: Methamidophos increased Ch transporter binding ($F_{1,13} = 21.6$, $p < 0.001$). There were no significant effects in the cortex. As for ChAT activity and the serotonergic measures, there were no significant effects.

Effects on the Cholinergic and Serotonergic Systems at Adulthood (Fig. 3)

Early methamidophos exposure elicited a late-emergent decrease in ChAT activity in the cortex (Treatment: $F_{1,27} = 8.7$, $p = 0.006$) but not in the brainstem. Regarding Ch transporter, there was a decrease in binding in the brainstem (Treatment: $F_{1,28} = 9.7$, $p = 0.004$) but not in the cortex.

There were sex-dependent effects on 5HT_{1A} receptor binding in the brainstem (Treatment × Sex: $F_{1,27} = 8.5$, $p = 0.007$). Separate analyses for males and females indicated a significant methamidophos-elicited decrease for females ($F_{1,14} = 5.2$,

Methamidophos effects during early postnatal development

Cholinergic system

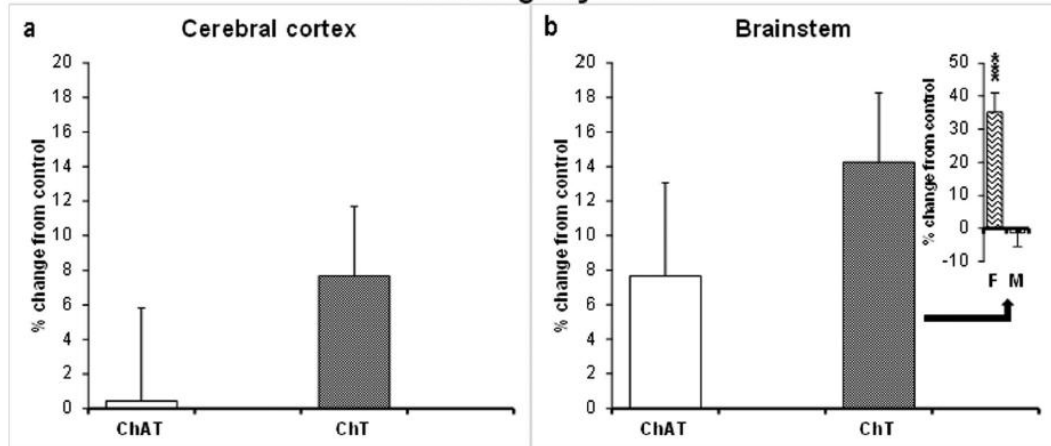


FIG. 2. Effects of neonatal methamidophos exposure (1 mg/kg/day sc, from PN3 to PN9) during early postnatal development presented as percent change from control values. ChAT activity and Ch transporter binding in the cerebral cortex (a) and brainstem (b). In the inset, the data pertaining to Ch transporter binding are separated by sex. 5HT_{1A}, 5HT₂, and 5HT transporter in the cerebral cortex (c) and brainstem (d). Values are means \pm SEM. For each treatment group, 16 animals were examined, equally divided into males and females. 5HT_{1A}, serotonin receptor subtype 1A; 5HT₂ serotonin receptor subtype 2; 5HTT, serotonin presynaptic transporter; F, female; M, male. *** $p < 0.001$, versus respective control group.

$p = 0.03$) and a trend toward increased binding for males ($F_{1,13} = 3.3$, $p = 0.08$). There were no significant effects in the cortex. As for 5HT₂ receptor binding, there were significant increases both in the cortex (Treatment: $F_{1,27} = 4.8$, $p = 0.03$) and brainstem (Treatment: $F_{1,28} = 4.2$, $p = 0.04$; Treatment \times Sex: $F_{1,28} = 12.7$, $p = 0.001$). However, in the brainstem, the increase in binding was restricted to males ($F_{1,14} = 28.8$, $p < 0.001$). As for the 5HT transporter, there were no significant effects at adulthood.

Effects on Behavior at Adulthood (Fig. 4)

In the forced swimming test, the ANOVA demonstrated that early methamidophos exposure elicited an increase in immobility time (Treatment: $F_{1,44} = 5.05$, $p = 0.02$), suggestive of depressive-like behavior (Fig. 4a). Methamidophos failed to elicit significant alterations on all anxiety-related measures: There were no differences between groups in %Time OA and %Entries OA in the EPM (Fig. 4b), and these results were

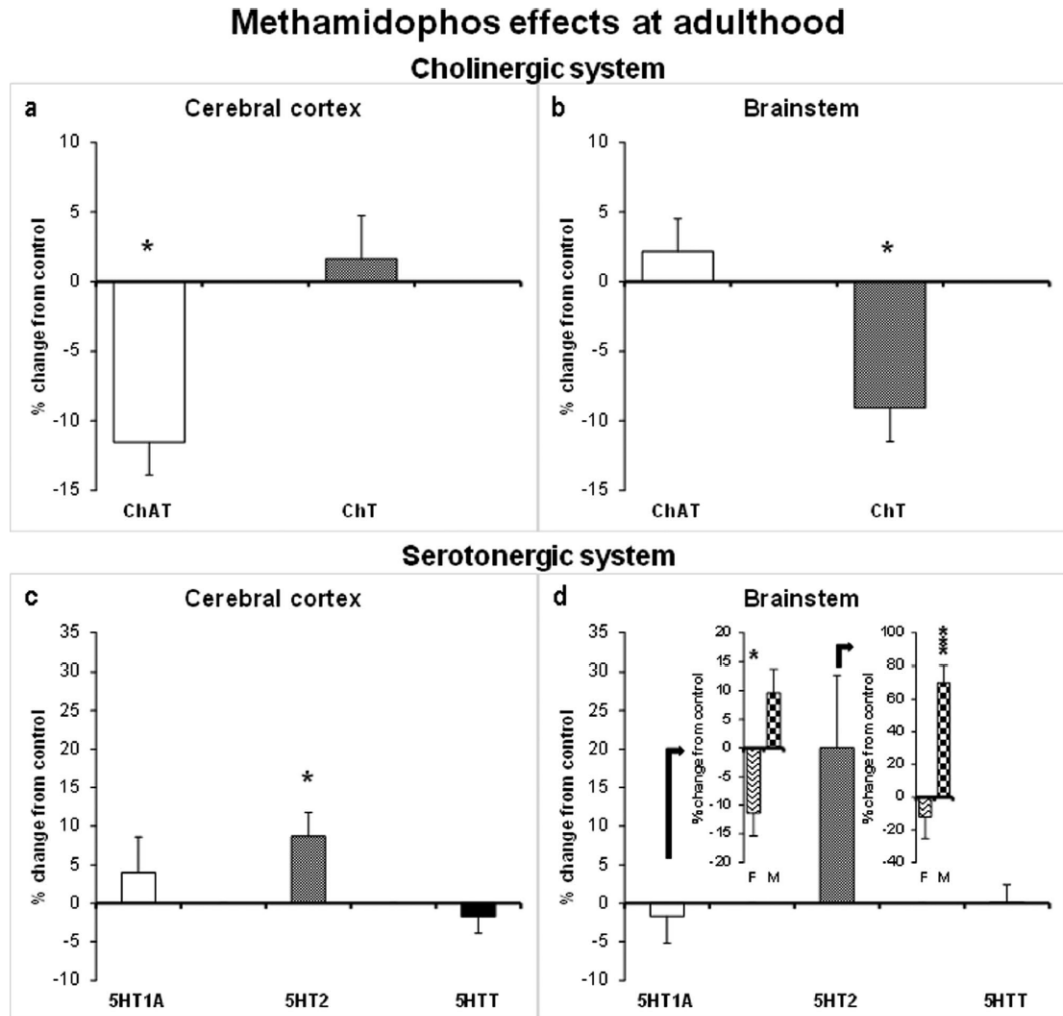


FIG. 3. Effects of neonatal methamidophos exposure (1 mg/kg/day sc, from PN3 to PN9) at adulthood presented as percent change from control values. ChAT activity and Ch transporter binding in the cerebral cortex (a) and brainstem (b). 5HT_{1A}, 5HT₂, and 5HT transporter in the cerebral cortex (c) and brainstem (d). In the inset, the data pertaining to 5HT_{1A} and 5HT₂ are separated by sex. Values are means \pm SEM. For each treatment group, 16 animals were examined, equally divided into males and females. 5HT_{1A}, serotonin receptor subtype 1A; 5HT₂, serotonin receptor subtype 2; 5HTT, serotonin presynaptic transporter; F, female; M, male. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, versus respective control group.

corroborated by the lack of alteration in the time spent in the center of the OF (Time Cen OF) (Fig. 4c). Despite the lack of effects in most measures obtained in the EPM, methamidophos elicited a decrease in the time spent in the center of the maze (Time Cen—Treatment: $F_{1,63} = 5.5$, $p = 0.02$), which indicates less time spent in the cognitive task of choosing which arm (open or closed) to go into (Fig. 4b). Locomotor activity was also not affected by methamidophos exposure both in the EPM (Entries CA, Fig. 4b) and in the OF (Ambulation

OF, Fig. 4c). There were no significant alterations on memory/learning ($[L3 - L0]/L0$) as assessed in the passive avoidance test (Fig. 4d).

DISCUSSION

In this study, methamidophos exposure during the “brain growth spurt” was effective in producing immediate and late-emergent alterations in cholinergic and serotonergic synaptic

Methamidophos effects on behavior at adulthood

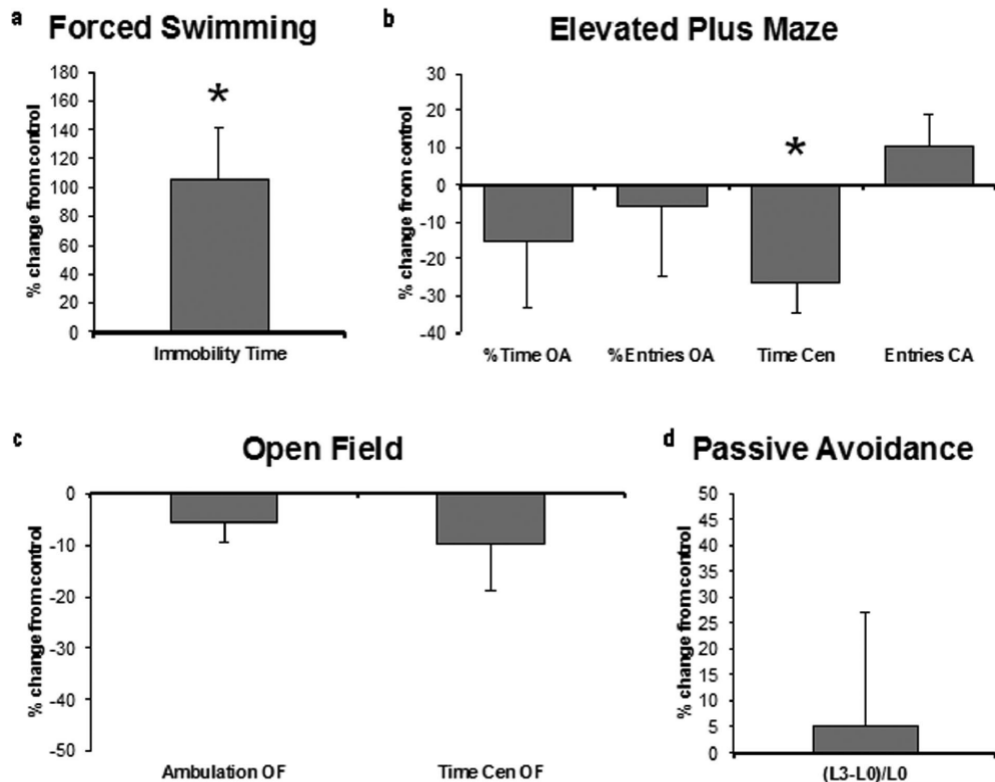


FIG. 4. Effects of neonatal methamidophos exposure (1 mg/kg/day sc, from PN3 to PN9) on behavior at adulthood presented as percent change from control values. In (a), immobility time in the forced swimming test. In (b), anxiety-like measures (%Time OA and % Entries OA), decision making (Time Cen), and activity (Entries OA) measures in the EPM. In (c), locomotor activity (Ambulation OF) and anxiety-like (Time Cen OF) measures in the open field. In (d), memory/learning ((L3 – L0)/L0) in the step-down passive avoidance test. Values are means \pm SEM. For each treatment group, 20–36 animals were examined, divided into males and females. EPM measures: %Time OA, time spent in open arms divided by time spent in open + closed arms; %Entries OA, number of entries in open arms divided by number of entries in open + closed arms; Time Cen, time spent in the center; Entries CA, number of closed arms entries. Open field measures: Ambulation OF, traveled distance; Time Cen OF, time spent in the center. Passive avoidance: (L3 – L0)/L0, memory/learning index based on the latency (L) to descend from the platform on the first (L0) and second (L3) sessions. * $p < 0.05$ versus respective control group.

markers and in eliciting behavioral effects suggestive of depressive-like behavior and impaired decision making in adult mice.

Methamidophos elicited time-dependent and region-selective effects, which may be associated to the fact that distinct regions have specific timetables of maturation. Distinct populations originate from different brain areas that undergo differentiation processes with widely varying schedules (Rodier, 1988). As an example, each component of the cholinergic system follows a characteristic and region-specific developmental plan (Abreu-Villaça *et al.*, 2011); therefore, it is expected that methamidophos elicits effects that are specific to each component and brain region. Moreover, dissimilar immediate and late-emergent

effects reinforce the idea that developmental exposure to OPs can act either producing immediate effects or programming changes that may appear later during development or at adulthood (Ahlbom *et al.*, 1995; Aldridge *et al.*, 2005a; Dam *et al.*, 2000; Levin *et al.*, 2010; Slotkin *et al.*, 2001) and suggest that distinct mechanisms of action are responsible for the immediate and delayed effects. Finally, the selective effects were evident with similar AChE inhibition in both brain regions and even after full recovery of AChE activity at adulthood, which gives support to previous evidence of noncholinesterase effects of OPs (Ahlbom *et al.*, 1995; Aldridge *et al.*, 2005b; Levin *et al.*, 2010; Slotkin and Seidler, 2007, 2008; Slotkin *et al.*, 2006b, 2008c).

Our results were also dependent on the sex. Descriptions of sex differences are common when it comes to the effects of OP exposure on developing animals (Aldridge *et al.*, 2005b; Johnson *et al.*, 2009; Slotkin *et al.*, 2008c). These results, together with ours, reinforce the multiplicity of effects of OPs during development and their capacity to affect several parameters of the cholinergic and serotonergic systems with sex selectivity. The time course of the GABAergic system during development may, in part, explain our sex-dependent effects. GABA *per se* has a trophic role in neuronal maturation, affecting neuronal migration and synapse formation; in addition, it was shown to modulate the expression of neurotrophic factors (for review: Represa and Ben-Ari, 2005). During the early postnatal development, there is a shift in GABA_A receptor-mediated responses from excitatory to inhibitory, which, in turn, could alter the expression of neurotrophic factors (Berninger *et al.*, 1995). This shift, which is dependent on cholinergic activation (Liu *et al.*, 2006), occurs earlier in females compared with males (Nuñez and McCarthy, 2007). Therefore, it is possible that the increased cholinergic stimulation elicited by OPs, including methamidophos, differentially affects males and females. It is also possible that sex-selective actions of OPs are associated with their potential actions as endocrine disruptors. In this regard, chlorpyrifos exposure in the early postnatal period was shown to reduce aromatase activity, an enzyme responsible for a key step in the biosynthesis of estrogens (Buratti *et al.*, 2011). To our knowledge, there are no studies that investigate methamidophos effects on pituitary and sex hormones during the perinatal period; however, there is evidence of significant reduction in testosterone levels (Maia *et al.*, 2011) and increase of ACTH (Spassova *et al.*, 2000) in rodents exposed to methamidophos at adulthood (Maia *et al.*, 2011).

Methodological Issues

Methamidophos was dissolved in DMSO, which may constitute a cause of concern, even though all experimental groups were exposed to this substance, because there are reports of neurotoxic effects of this solvent. Interestingly, we failed to find studies describing an association between DMSO and behavioral or neurochemical alterations during the early postnatal development although, at adulthood, there is little evidence of DMSO-elicited histopathological and behavioral alterations at doses close to the one used in the present study (Authier *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 1983). These findings suggest that it is unlikely that DMSO exposure, in the present study, has affected the results.

Here, we chose two time points to perform the analyses. In the first time point (1 day postexposure), the biochemical findings were identified when AChE inhibition was at 20%, well below the minimum necessary to elicit cholinergic toxicity (Bignami *et al.*, 1975; Slotkin, 2004). In the second time point (at adulthood), both biochemical and behavioral alterations were observed in spite of the fact that AChE activity had already returned to control levels. In spite of the low inhibition levels observed during these time points, during exposure,

the IntD used in this study elicited higher levels of AChE inhibition, which is in accordance with previous evidence of rapid recovery of AChE inhibition in pups exposed to OPs, including methamidophos (Moser, 1999). These higher levels could have elicited systemic toxicity; however, the fact that inhibition levels surpassed the minimum necessary to elicit this adverse effect only at one brain region (cortex) and at one time point (4 h after the last injection), together with the lack of effects in body weight during exposure, suggest that the IntD of methamidophos was devoid of cholinergic toxicity. This conclusion is consistent with those from a previous report in which rats were exposed to a similar dose of methamidophos at PN17 (Moser, 1999).

Effects on the Cholinergic and Serotonergic Systems During Early Postnatal Development

In this study, methamidophos exposure was able to increase Ch transporter binding in the brainstem of developing females. Considering that the Ch transporter binding is responsive to neuronal activity (Klemm and Kuhar, 1979; Simon *et al.*, 1976), the increase in binding indicates increased cholinergic activity, which is consistent and may be directly related to the inhibition of AChE. The inhibition of AChE activity described here may elicit a significant decrease of choline in the synaptic clefts. Accordingly, the increased binding to the Ch transporter may indicate a compensatory response of the presynaptic cell as an effort to maintain physiological intracellular levels of choline to be used as substrate to ACh synthesis. In this regard, in rat brain synaptosomes, primary cultures from the basal forebrain, and mammalian cell lines transfected with Ch transporter, high levels of extracellular choline were shown to rapidly decrease cell surface Ch transporter expression by accelerating its internalization (Okuda *et al.*, 2011). Accordingly, the inverse response is likely to occur, so that the inhibition of AChE and consequent reduction of choline in the synaptic clefts could be responsible for the increase of Ch transporter at the cholinergic presynaptic terminal. Besides this possibility, it was recently shown, in sympathetic ganglia from mice with a disruption in the $\alpha 3$ nAChR subunit gene and rescued fast synaptic transmission by overexpressing $\alpha 3$ cDNA, that the Ch transporter is induced by retrograde signals downstream of postsynaptic activity (Krishnaswamy and Cooper, 2009). In mice exposed to OPs, high ACh levels in the synaptic cleft may hyperstimulate the postsynaptic cell. Accordingly, we suggest that the increased postsynaptic activity may also retrogradely induce the increase of the Ch transporter. Even though there is evidence that the increase in Ch transporter by the end of methamidophos exposure is directly linked to the inhibition of AChE, it is unlikely that this is the sole mechanism that mediate our results because, despite similar levels of AChE inhibition in the brainstem and cortex, Ch transporter binding results were restricted to the brainstem and to females.

Previous reports have shown that chlorpyrifos, parathion, and diazinon elicit general alterations in the serotonergic

system (Aldridge *et al.*, 2003; Slotkin *et al.*, 2006b), which is in accordance with previous findings that this system is especially sensitive to developmental disruption by OP exposure. In contrast, here we found that methamidophos was not able to affect the serotonergic system in the same way: There were no significant alterations in the serotonergic measures by the end of exposure. Despite methodological differences between previous studies and the present one (e.g., rats vs. mice; distinct length of postnatal exposure), differences between the effects of methamidophos compared with other OPs reinforce the conclusion that various OPs diverge in their effects on neurodevelopment.

Effects on the Cholinergic and Serotonergic Systems at Adulthood

At adulthood, long after the end of exposure and after recovery of AChE activity, the binding to the Ch transporter was decreased in the brainstem in both males and females, which is suggestive of a late-emergent decrease in cholinergic activity. Neonatal exposure to parathion and chlorpyrifos was also shown to evoke Ch transporter binding decrements in the brain; however, there were region- and sex-dependent effects distinct from those identified after methamidophos exposure (Slotkin *et al.*, 2001, 2008b). In addition, regarding ChAT activity, despite the lack of significant alterations by the end of methamidophos exposure, ChAT was decreased in the cortex at adulthood. This result suggests that methamidophos programs a reduction in the density of cholinergic terminals and corroborates Slotkin and collaborators' (2008a, b) findings associated to parathion or diazinon exposures but not to chlorpyrifos (Slotkin *et al.*, 2001) exposure.

Late-emergent effects in the serotonergic system included a decrease in 5HT_{1A} binding in the brainstem of females and an increase in 5HT₂ binding in the cortex (males and females) and in the brainstem (males). Despite the fact that the direction of the receptor alterations and the magnitude of the effects may be different among distinct OPs (Aldridge *et al.*, 2004; Slotkin and Seidler, 2008; Slotkin *et al.*, 2009), the increase in 5HT₂ binding is consistent with previous findings in postmortem studies of suicide victims (Pandey *et al.*, 2002). Additionally, previous findings of decreased expression of the mRNA encoding the 5HT_{1A} receptor in patients with major depression (López-Figueroa *et al.*, 2004) and of reduced 5HT_{1A} receptor binding in suicide victims (Savitz *et al.*, 2009) present similarities to the late-emergent decrease in 5HT_{1A} binding in mice exposed to methamidophos. However, our findings were identified only in females, which indicates that alterations found in our model do not completely parallel neurochemical alterations described in humans. It should be noted that receptor binding effects may not be the only alterations associated with OP exposure. In this regard, a previous study reported altered expression of genes that encode the enzymes of 5HT synthesis, storage, and degradation in undifferentiated and differentiating PC12 cells exposed to chlorpyrifos or diazinon (Slotkin and Seidler, 2008).

Altogether both cholinergic and serotonergic results indicate that despite restricted similarities, distinct OPs are able to elicit dissimilar effects. These may be associated to OP selective interference with cell functioning. In this regard, targets for OPs such as cell signaling mediated by adenylyl cyclase (Meyer *et al.*, 2003; Song *et al.*, 1997), the m₂ muscarinic receptor (Slotkin *et al.*, 2006a), lipases (Casida *et al.*, 2008), and microtubule proteins (Jiang *et al.*, 2010) have been identified.

Behavioral Effects

Cholinergic and serotonergic alterations in methamidophos-exposed mice were accompanied by an increase in immobility time in the forced swimming test, indicative of depressive-like behavior at adulthood. This result shows similarities to those of other OPs (Aldridge *et al.*, 2005a; Roegge *et al.*, 2008); however, methamidophos effects in behavior were specific; there were no anxiety and memory/learning alterations. Considering that there is evidence that serotonergic and cholinergic alterations could underlie disturbances observed in depression (for review: Carr and Lucki, 2011; Dągtyć *et al.*, 2011; Graef *et al.*, 2011), the increased immobility time long after the end of methamidophos exposure may, in part, be explained by the neurotransmitter system alterations described here. In this regard, because the depressive-like behavior was significant in both males and females, while several neurochemical findings were sex dependent, it is likely that other effects of methamidophos exposure also play a role in the behavioral findings. Future investigation of serotonergic and other alterations elicited by methamidophos exposure may provide a more complete picture of the consequences of early methamidophos exposure.

Methamidophos was also able to elicit a decrease in the time spent in the center of the EPM. Even though there is no consensus regarding the meaning of this measure (Wall and Messier, 2001), considering that anxiolytics reduce time spent in the center of the maze (Cruz *et al.*, 1994), our results could indicate reduced anxiety levels due to methamidophos exposure. However, this possibility should be considered with caution because it was not supported by the classic and most frequently used measures to evaluate anxiety in this test. There is also evidence that time in the center of the maze reflects decision making, perhaps related to approach/avoid conflict (Rodgers and Johnson, 1995; Rodgers *et al.*, 1997). The choice between two alternatives (in this case the open and closed arms of the maze) was described as a cognitive function based on information collected from the environment, so that a decision is made when a threshold of neuronal activity is reached (for review: Gold and Shadlen, 2007). If this is the case, the reduced time spent in the center of the maze seems to indicate that, in methamidophos-exposed mice, a decision is made without sufficient data from the environment. Interestingly, there is a clear link between altered decision making in humans and neuropsychiatric disorders including major depression (Cella *et al.*, 2010), as well as suicidal behavior (Jollant *et al.*, 2005).

In addition, both depression and decision making seem to be modulated by the serotonergic function (Carr and Lucki, 2011; Rogers *et al.*, 2003).

CONCLUSIONS

We investigated in mice the effects of methamidophos on the “brain growth spurt” period of brain development. The present results lead to several inferences. The first one is that despite the presence of cholinergic alterations due to early postnatal methamidophos exposure, these changes do not necessarily imply on similar alterations at adulthood. That is, the effects of OP exposure on the cholinergic system during the neonatal period may occur through pathways other than those that culminate on later alterations both in the cholinergic and serotonergic systems. The second one is the reinforcement of evidence that the pattern of effects elicited by an OP is highly dependent on the developmental stage. Interestingly, in a previous study we observed an overall decrease of the 5HT markers analyzed here after a subchronic exposure to methamidophos at adulthood (Lima *et al.*, 2011). These alterations were observed even at doses of exposure that caused only 15% of brain AChE inhibition. Finally, the third inference is that early methamidophos exposure is able to elicit delayed, mood-related effects, suggestive of depressive-like behavior and impaired decision making, a cognitive task, at adulthood. Overall these results indicate that, as previously described for other OPs, methamidophos exposure during the early postnatal period may be deleterious to the developing brain. Finally, neurochemical effects and evidence of mood and cognitive alterations at adulthood further indicate harmful effects throughout life.

FUNDING

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ (E26/111.160/2011, E26/103.029/2008 to Y.A.-V., C.C.F., and A.C.M.); and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq and FAPERJ (C.S.L.); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES (F.N., A.L.N.-F.). Y.A.-V. and A.M. are Irving J. Selikoff International Scholars of the Mount Sinai School of Medicine. Their work was supported in part by an Award Number D43TW000640 from the Fogarty International Center.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful to Ulisses Risso for animal care. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the Fogarty International Center or the National Institutes of Health. C.S.L., A.C.D.-T., F.N., A.L.N.-F., A.R.-C., C.C.F., A.C.M., A.M., and Y.A.-V. report no potential conflicts of interest related to this report.

REFERENCES

- Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C., and Manhães, A. C. (2011). Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* **221**, 367–378.
- Abreu-Villaça, Y., Graça, A. C. C., Ribeiro-Carvalho, A., Naiff, V. F., Manhães, A. C., Filgueiras, C. C. (2013). Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. *Nic. Tob. Res.* In press.
- Abreu-Villaça, Y., Nunes, F., do E Queiroz-Gomes, F., Manhães, A. C., and Filgueiras, C. C. (2008). Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short-term, and long-term withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **33**, 599–610.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F. J., Qiao, D., Tate, C. A., Cousins, M. M., Thillai, I., and Slotkin, T. A. (2003). Short-term adolescent nicotine exposure has immediate and persistent effects on cholinergic systems: Critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Neuropsychopharmacology* **28**, 1935–1949.
- Abreu-Villaça, Y., Seidler, F. J., Tate, C. A., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2004). Prenatal nicotine exposure alters the response to nicotine administration in adolescence: Effects on cholinergic systems during exposure and withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **29**, 879–890.
- Ahlbom, J., Fredriksson, A., and Eriksson, P. (1995). Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Res.* **677**, 13–19.
- Aldridge, J. E., Levin, E. D., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005a). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ. Health Perspect.* **113**, 527–531.
- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2005b). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environ. Health Perspect.* **113**, 1027–1031.
- Aldridge, J. E., Seidler, F. J., Meyer, A., Thillai, I., and Slotkin, T. A. (2003). Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1736–1743.
- Aldridge, J. E., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: Critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environ. Health Perspect.* **112**, 148–155.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2004). *Suspensos inseticidas que trazem risco à saúde*. ANVISA, Brasília, Brazil.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União (ANVISA) (2011). *Resolução-RDC Nº1*. ANVISA, Brasília, Brazil.
- Arango, V., Underwood, M. D., Boldrini, M., Tamir, H., Kassir, S. A., Hsiung, S., Chen, J. J., and Mann, J. J. (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology* **25**, 892–903.
- Aubert, I., Cécyle, D., Gauthier, S., and Quirion, R. (1996). Comparative ontogenic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **369**, 31–55.
- Authier, N., Dupuis, E., Kwasiborski, A., Eschalié, A., and Coudoré, F. (2002). Behavioural assessment of dimethylsulfoxide neurotoxicity in rats. *Toxicol. Lett.* **132**, 117–121.
- Azmitia, E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* **56**, 413–424.
- Bandeira, F., Lent, R., and Herculano-Houzel, S. (2009). Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14108–14113.

- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., and Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* **14**, 83–144.
- Berninger, B., Marty, S., Zafra, F., da Penha Berzaghi, M., Thoenen, H., and Lindholm, D. (1995). GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expression in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development* **121**, 2327–2335.
- Bignami, G., Rosi 'c, N., Michalek, H., Milos'evic', M., and Gatti, G. L. (1975). Behavioral toxicity of anticholinesterase agents: Methodological, neurochemical, and neuropsychological aspects. In *Behavioral Toxicology* (B. Weiss and V. G. Laties, Eds.), pp. 155–216. Plenum Press, New York, NY.
- Buratti, F. M., De Angelis, G., Ricceri, L., Venerosi, A., Calamandrei, G., and Testai, E. (2011). Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: Biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. *Toxicology* **280**, 98–108.
- Carr, G. V., and Lucki, I. (2011). The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: A review of animal studies. *Psychopharmacology (Berl)*. **213**, 265–287.
- Casida, J. E., Nomura, D. K., Vose, S. C., and Fujioka, K. (2008). Organophosphate-sensitive lipases modulate brain lysophospholipids, ether lipids and endocannabinoids. *Chem. Biol. Interact.* **175**, 355–364.
- Cella, M., Dymond, S., and Cooper, A. (2010). Impaired flexible decision-making in Major Depressive Disorder. *J. Affect. Disord.* **124**, 207–210.
- Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., and Anand, K. J. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* **28**, 931–937.
- Cruz, A. P., Frei, F., and Graeff, F. G. (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**, 171–176.
- Dagy't, G., Den Boer, J. A., and Trentani, A. (2011). The cholinergic system and depression. *Behav. Brain Res.* **221**, 574–582.
- Dam, K., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **121**, 179–187.
- Dobbing, J., and Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* **3**, 79–83.
- Dribben, W. H., Creeley, C. E., and Farber, N. (2011). Low-level lead exposure triggers neuronal apoptosis in the developing mouse brain. *Neurotoxicol. Teratol.* **33**, 473–480.
- Dwyer, J. B., Broide, R. S., and Leslie, F. M. (2008). Nicotine and brain development. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* **84**, 30–44.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr, and Feather-Stone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) (2010). Available at: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>. Accessed March 15, 2013.
- Filgueiras, C. C., Abreu-Villaça, Y., Krahe, T. E., and Manhães, A. C. (2006). Unilateral hemispherectomy at adulthood asymmetrically affects immobile behavior of male Swiss mice. *Behav. Brain Res.* **172**, 33–38.
- Filgueiras, C. C., Ribeiro-Carvalho, A., Nunes, F., Abreu-Villaça, Y., and Manhães, A. C. (2009). Early ethanol exposure in mice increases laterality of rotational side preference in the free-swimming test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **93**, 148–154.
- Flaskos, J. (2012). The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxon metabolites. *Toxicol. Lett.* **209**, 86–93.
- Fraga, M. C., Moura, E. G., Silva, J. O., Bonomo, I. T., Filgueiras, C. C., Abreu-Villaça, Y., Passos, M. C., Lisboa, P. C., and Manhães, A. C. (2011). Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **100**, 165–173.
- Fujita, M., Charney, D. S., and Innis, R. B. (2000). Imaging serotonergic neurotransmission in depression: Hippocampal pathophysiology may mirror global brain alterations. *Biol. Psychiatry* **48**, 801–812.
- Gold, J. I., and Shadlen, M. N. (2007). The neural basis of decision making. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 535–574.
- Graef, S., Schönknecht, P., Sabri, O., and Hegerl, U. (2011). Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: An overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology (Berl)*. **215**, 205–229.
- Gupta, R. C. (2004). Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. *Toxicol. Mech. Methods* **14**, 103–143.
- Happe, H. K., and Murrin, L. C. (1992). High-affinity choline transport regulation by drug administration during postnatal development. *J. Neurochem.* **58**, 2053–2059.
- Jiang, W., Duysen, E. G., Hansen, H., Shlyakhtenko, L., Schopfer, L. M., and Lockridge, O. (2010). Mice treated with chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon have organophosphorylated tubulin in the brain and disrupted microtubule structures, suggesting a role for tubulin in neurotoxicity associated with exposure to organophosphorus agents. *Toxicol. Sci.* **115**, 183–193.
- Johnson, F. O., Chambers, J. E., Nail, C. A., Givaruangswat, S., and Carr, R. L. (2009). Developmental chlorpyrifos and methyl parathion exposure alters radial-arm maze performance in juvenile and adult rats. *Toxicol. Sci.* **109**, 132–142.
- Jollant, F., Bellivier, F., Leboyer, M., Astruc, B., Torres, S., Verdier, R., Castelnaud, D., Malafosse, A., and Courtet, P. (2005). Impaired decision making in suicide attempters. *Am. J. Psychiatry* **162**, 304–310.
- Kaye, T. S., Egorin, M. J., Riggs, C. E., Jr, Olman, E. A., Chou, F. T., and Salzman, M. (1983). The plasma pharmacokinetics and tissue distribution of dimethyl sulfoxide in mice. *Life Sci.* **33**, 1223–1230.
- Klemm, N., and Kuhar, M. J. (1979). Post-mortem changes in high affinity choline uptake. *J. Neurochem.* **32**, 1487–1494.
- Krishnaswamy, A., and Cooper, E. (2009). An activity-dependent retrograde signal induces the expression of the high-affinity choline transporter in cholinergic neurons. *Neuron* **61**, 272–286.
- Levin, E. D., Timofeeva, O. A., Yang, L., Petro, A., Ryde, I. T., Wrench, N., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. (2010). Early postnatal parathion exposure in rats causes sex-selective cognitive impairment and neurotransmitter defects which emerge in aging. *Behav. Brain Res.* **208**, 319–327.
- Lima, C. S., Nunes-Freitas, A. L., Ribeiro-Carvalho, A., Filgueiras, C. C., Manhães, A. C., Meyer, A., and Abreu-Villaça, Y. (2011). Exposure to methamidophos at adulthood adversely affects serotonergic biomarkers in the mouse brain. *Neurotoxicology* **32**, 718–724.
- Lima, C. S., Ribeiro-Carvalho, A., Filgueiras, C. C., Manhães, A. C., Meyer, A., and Abreu-Villaça, Y. (2009). Exposure to methamidophos at adulthood elicits depressive-like behavior in mice. *Neurotoxicology* **30**, 471–478.
- Liu, Z., Neff, R. A., and Berg, D. K. (2006). Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development. *Science* **314**, 1610–1613.
- López-Figueroa, A. L., Norton, C. S., López-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., López, J. F., and Watson, S. J. (2004). Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* **55**, 225–233.
- Maes, M., and Meltzer, H. (1995). The serotonin hypothesis of major depression. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress* (F. E. Bloom, D. J. Kupfer, B. S. Bunney, R. D. Ciaranello, K. L. Davis, G. F. Koob, H. Y. Meltzer, C. R. Schuster, R. I. Shader, and S. J. Watson, Eds.), pp. 933–944. Raven Press, New York, NY.

- Maia, L. O., Júnior, W. D., Carvalho, L. S., Jesus, L. R., Paiva, G. D., Araujo, P., Costa, M. F., Andersen, M. L., Tufik, S., and Mazarro-Costa, R. (2011). Association of methamidophos and sleep loss on reproductive toxicity of male mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 155–161.
- Meyer, A., Seidler, F. J., Cousins, M. M., and Slotkin, T. A. (2003). Developmental neurotoxicity elicited by gestational exposure to chlorpyrifos: When is adenylyl cyclase a target? *Environ. Health Perspect.* **111**, 1871–1876.
- Milesion, B. E., Chambers, J. E., Chen, W. L., Dettbarn, W., Ehrich, M., Eldefrawi, A. T., Gaylor, D. W., Hamernik, K., Hodgson, E., Karczmar, A. G., et al. (1998). Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci.* **41**, 8–20.
- Moser, V. C. (1999). Comparison of aldicarb and methamidophos neurotoxicity at different ages in the rat: Behavioral and biochemical parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **157**, 94–106.
- Nemeroff, C. B. (1998). The neurobiology of depression. *Sci. Am.* **278**, 42–49.
- Nunes, F., Ferreira-Rosa, K., Pereira, Mdos. S., Kubrusly, R. C., Manhães, A. C., Abreu-Villaça, Y., and Filgueiras, C. C. (2011). Acute administration of vinyopocetine, a phosphodiesterase type 1 inhibitor, ameliorates hyperactivity in a mice model of fetal alcohol spectrum disorder. *Drug Alcohol Depend.* **119**, 81–87.
- Nunes-Freitas, A. L., Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C. S., Dutra-Tavares, A. C., Manhães, A. C., Lisboa, P. C., Oliveira, E., Gaspar de Moura, E., Filgueiras, C. C., and Abreu-Villaça, Y. (2011). Nicotine exposure during the third trimester equivalent of human gestation: Time course of effects on the central cholinergic system of rats. *Toxicol. Sci.* **123**, 144–154.
- Núñez, J. L., and McCarthy, M. M. (2007). Evidence for an extended duration of GABA-mediated excitation in the developing male versus female hippocampus. *Dev. Neurobiol.* **67**, 1879–1890.
- Nutt, D. J. (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **17** Suppl 1, S1–12.
- Okuda, T., Konishi, A., Misawa, H., and Haga, T. (2011). Substrate-induced internalization of the high-affinity choline transporter. *J. Neurosci.* **31**, 14989–14997.
- Pandey, G. N., Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Ren, X., Pandey, S. C., Pesold, C., Roberts, R. C., Conley, R. R., and Tamminga, C. A. (2002). Higher expression of serotonin 5-HT_{2A} receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am. J. Psychiatry* **159**, 419–429.
- Pohl-Guimaraes, F., Krahe, T. E., and Medina, A. E. (2011). Early valproic acid exposure alters functional organization in the primary visual cortex. *Exp. Neurol.* **228**, 138–148.
- Pope, C. N. (1999). Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* **2**, 161–181.
- Pрут, L., and Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.* **463**, 3–33.
- Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* **21**, 775–777.
- Represa, A., and Ben-Ari, Y. (2005). Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci.* **28**, 278–283.
- Ribeiro, F. M., Black, S. A., Prado, V. F., Rylett, R. J., Ferguson, S. S., and Prado, M. A. (2006). The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1. *J. Neurochem.* **97**, 1–12.
- Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C. S., Filgueiras, C. C., Manhães, A. C., and Abreu-Villaça, Y. (2008). Nicotine and ethanol interact during adolescence: Effects on the central cholinergic systems. *Brain Res.* **1232**, 48–60.
- Ribeiro-Carvalho, A., Lima, C. S., Medeiros, A. H., Siqueira, N. R., Filgueiras, C. C., Manhães, A. C., and Abreu-Villaça, Y. (2009). Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice: Effects on the central cholinergic systems during short and long term withdrawal. *Neuroscience* **162**, 1174–1186.
- Rodier, P. M. (1988). Structural–functional relationships in experimentally induced brain damage. *Prog. Brain Res.* **73**, 335–348.
- Rodgers, R. J., Cao, B. J., Dalvi, A., and Holmes, A. (1997). Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**, 289–304.
- Rodgers, R. J., and Dalvi, A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **21**, 801–810.
- Rodgers, R. J., and Johnson, N. J. (1995). Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**, 297–303.
- Roegge, C. S., Timofeeva, O. A., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., and Levin, E. D. (2008). Developmental diazinon neurotoxicity in rats: Later effects on emotional response. *Brain Res. Bull.* **75**, 166–172.
- Rogers, R. D., Tunbridge, E. M., Bhagwagar, Z., Drevets, W. C., Sahakian, B. J., and Carter, C. S. (2003). Tryptophan depletion alters the decision-making of healthy volunteers through altered processing of reward cues. *Neuropsychopharmacology* **28**, 153–162.
- Rotterdam Convention (2010a). Database of Notifications of Final Regulatory Action. Available at: <http://www.pic.int/Procedures/NotificationsofFinalRegulatoryActions/Database/tabid/1368/language/es-CO/Default.aspx>. Accessed December 14, 2012.
- Rotterdam Convention (2010b). Productos Químicos del Anexo III. Available at: <http://www.pic.int/EIConvenio/ProductosQu%C3%ADmicos/AnexoIII/tabid/2031/language/es-CO/Default.aspx>. Accessed January 23, 2013.
- Savitz, J., Lucki, I., and Drevets, W. C. (2009). 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog. Neurobiol.* **88**, 17–31.
- Simon, J. R., Atweh, S., and Kuhar, M. J. (1976). Sodium-dependent high affinity choline uptake: A regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J. Neurochem.* **26**, 909–922.
- Slotkin, T. A. (2004). Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: Nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **198**, 132–151.
- Slotkin, T. A., Bodwell, B. E., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008a). Neonatal exposure to low doses of diazinon: Long-term effects on neural cell development and acetylcholine systems. *Environ. Health Perspect.* **116**, 340–348.
- Slotkin, T. A., Bodwell, B. E., Ryde, I. T., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008b). Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective impairment of acetylcholine systems in brain regions during adolescence and adulthood. *Environ. Health Perspect.* **116**, 1308–1314.
- Slotkin, T. A., Cousins, M. M., Tate, C. A., and Seidler, F. J. (2001). Persistent cholinergic presynaptic deficits after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Res.* **902**, 229–243.
- Slotkin, T. A., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2006a). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: Effects on brain development are separable from systemic toxicity. *Environ. Health Perspect.* **114**, 746–751.
- Slotkin, T. A., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2009). Developmental neurotoxicity of parathion: Progressive effects on serotonergic systems in adolescence and adulthood. *Neurotoxicol. Teratol.* **31**, 11–17.
- Slotkin, T. A., Ryde, I. T., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2008c). Developmental neurotoxicity of low dose diazinon exposure of neonatal rats: Effects on serotonin systems in adolescence and adulthood. *Brain Res. Bull.* **75**, 640–647.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2007). Comparative developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo: Transcriptional responses of pathways for brain cell development, cell signaling, cytotoxicity and neurotransmitter systems. *Brain Res. Bull.* **72**, 232–274.
- Slotkin, T. A., and Seidler, F. J. (2008). Developmental neurotoxicants target neurodifferentiation into the serotonin phenotype: Chlorpyrifos, diazinon, dieldrin and divalent nickel. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **233**, 211–219.
- Slotkin, T. A., Tate, C. A., Ryde, I. T., Levin, E. D., and Seidler, F. J. (2006b). Organophosphate insecticides target the serotonergic system in developing rat brain regions: Disparate effects of diazinon and parathion at doses spanning the threshold for cholinesterase inhibition. *Environ. Health Perspect.* **114**, 1542–1546.

- Snedecor, G. W., and Cochran, W. G. (1967). *Statistical Methods*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Song, X., Seidler, F. J., Saleh, J. L., Zhang, J., Padilla, S., and Slotkin, T. A. (1997). Cellular mechanisms for developmental toxicity of chlorpyrifos: Targeting the adenylyl cyclase signaling cascade. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 158–174.
- Spassova, D., White, T., and Singh, A. K. (2000). Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* **126**, 79–89.
- Terry, A. V., Jr. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol. Ther.* **134**, 355–365.
- Timofeeva, O. A., Sanders, D., Seemann, K., Yang, L., Hermanson, D., Regenbogen, S., Agoos, S., Kallepalli, A., Rastogi, A., Braddy, D., *et al.* (2008). Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. *Brain Res. Bull.* **77**, 404–411.
- U.S. EPA (2002). Chlorpyrifos: End-Use Products Cancellation Order. Fed Reg 67:3698–3700. Available at: <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2002/January/Day-25/p1764.htm>. Accessed January 23, 2013.
- Wall, P. M., and Messier, C. (2001). Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **25**, 275–286.
- Zahalka, E. A., Seidler, F. J., Lappi, S. E., McCook, E. C., Yanai, J., and Slotkin, T. A. (1992). Deficits in development of central cholinergic pathways caused by fetal nicotine exposure: Differential effects on choline acetyltransferase activity and [3H]hemicholinium-3 binding. *Neurotoxicol. Teratol.* **14**, 375–382.