

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JONAS GOLART DA SILVA



CLOPIRIFÓS DURANTE A GESTAÇÃO: RISCO AOS DESCENDENTES?

CURITIBA

2017

JONAS GOLART DA SILVA

CLOPIRIFÓS DURANTE A GESTAÇÃO: RISCO AOS DESCENDENTES?

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em farmacologia, no Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Silva, Jonas Golart da
Clorpirifós durante a gestação : risco aos descendentes?./ Jonas Golart
da Silva. – Curitiba, 2017.
110 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Paulo Roberto Dalsenter

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Clorpirifos 2. Gravidez 3. Tireoide 4. Ansiedade 5. Depressão mental
I. Título II. Dalsenter, Paulo Roberto III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.954



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **JONAS GOLART DA SILVA**, intitulada: "**CLORPIRIFÓS DURANTE A GESTAÇÃO: RISCO AOS DESCENDENTES?**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Junho de 2017.

PAULO ROBERTO DALSENTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Avaliador Interno (UFPR)

BRUNO JACSON MARTYNHAK
Avaliador Externo (UFPR)

GIULIANA GELBCKE KASECKER BOTELHO
Avaliador Externo (UNICENTRO)

CRISTINA APARECIDA JARK STERN
Avaliador Interno (UFPR)

NOTA EXPLICATIVA

Esta tese é apresentada na forma mista com materiais e métodos, resultados e mais os artigos científicos de acordo com as normas da Biblioteca Central e do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFPR. Neste formato constam: introdução; revisão da literatura; materiais e métodos; resultados e artigos publicados; discussão e conclusão gerais da tese. Os artigos foram colocados na sequência em que foram submetidos e apresentam-se com a formatação pedida pelos periódicos escolhidos.

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Gladis pela educação e criação recebidas; a minha esposa Alessandra, minha fortaleza e segurança; ao meu filho Luiz Guilherme, por ser de certa forma o ponto inicial desse trabalho; aos meus irmãos Vanessa e Elias, pela força que sempre me passaram e aos vários amigos que fiz ao longo do toda essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter**, pela orientação desempenhada e pela amizade criada ao longo de todo o período de convívio.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da UFPR, pelo apoio e colaboração recebidos. Em especial ao **Prof^a Dr. Janaína Zanoveli** pelo apoio na orientação dos experimentos e interpretação científica dos resultados e pela amizade criada ao longo do período.

A **Dra. Ana Cláudia Boareto**, pela enorme ajuda em vários momentos onde foi preciso o apoio de uma amiga cientista, pelos “cafés” de experimentos com suas receitas fitness e também pelas valiosas dicas de como escrever um artigo científico.

A todos os meus colegas do laboratório de toxicologia reprodutiva: Carol (chefinha), Lorena, Marcella, Sara, Samanta e Juliane. Os momentos entre nós sempre me mostraram ensinamentos muito ricos. A parceria criada irá durar por muitos anos ainda.

A todos aos alunos de iniciação científica que pude conviver no laboratório: Bruna, Nicole, Ana Luiza, Rottmans, Fernanda Argenton, Nathália, Anna Zilli, Noruê. Especial agradecimento a aluna Fernanda Vergara pelo companheirismo e dedicação em parte importante no trabalho.

Aos alunos dos outros laboratórios do departamento de farmacologia que sempre estavam lá para ajudar, conversas no café, almoços do RU e nos churrascos das sextas feiras.

A **Dra. Anne Karoline Schreiber** e a doutoranda **Daiany Darlly Bello Redivo** pelo imenso apoio e companheirismo no planejamento, na execução e discussão dos dados do projeto, pela amizade, pelas caronas regadas a muitas risadas.

Ao Prof. Dr. **Renato Sousa**, do departamento de patologia do hospital veterinário da UFPR pela grande ajuda na histologia e na análise morfológica.

Ao pessoal do laboratório de microscopia da UFPR, pois sem eles as lâminas histológicas não seriam possíveis.

Especial agradecimento aos animais que foram utilizados em todo o experimento, pois sem eles a pesquisa não teria sentido.

“Viva a vida enquanto há vida a ser vivida”
(JONAS GOLART)

RESUMO

Nos últimos anos cresceu o número de publicações científicas reforçando a hipótese de que substâncias químicas podem interferir no desenvolvimento normal do sistema nervoso central. Dentre essas substâncias, os agrotóxicos da classe dos organofosforados são suspeitos de induzirem alterações comportamentais como ansiedade e a depressão. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio do programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos, vem demonstrando que diversos compostos químicos são encontrados na forma de resíduos em índices maiores do que o permitido. O organofosforado clorpirifós, largamente utilizado na agricultura brasileira, é um dos principais agentes químicos com índice insatisfatório encontrado em alimentos. O objetivo desse trabalho foi investigar se a exposição ao clorpirifós durante a gestação de ratas Wistar poderia desenvolver alterações comportamentais dos tipos ansiedade e do tipo depressão na prole. As ratas foram expostas por via oral entre os dias 14 e 20 de gestação com doses de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg de clorpirifós/kg. As progenitoras foram avaliadas quanto: ao ganho de massa corporal durante a gestação e a lactação, ao número de filhotes, ao tempo de gestação, ao peso dos filhotes ao nascer e ao desmame. A prole foi avaliada quanto ao desenvolvimento corporal com medidas: de peso ao nascer, da distância anogenital, da descida dos testículos à bolsa escrotal e da abertura do canal vaginal; e as massas corporais e relativas dos órgãos foram avaliadas ao final da lactação e no início da fase adulta. Foram também avaliados na prole (dias 21 e 70 de vida) os comportamentos do tipo ansiedade pelo teste de labirinto em cruz elevado e do tipo depressão pelo teste de natação forçada modificado, assim como teste de campo aberto para avaliação da atividade motora. Na prole também foram realizadas a medição dos níveis de atividade da enzima acetilcolinesterase e a histologia morfológica das tireóides. Os principais resultados observados na prole mostraram que o clorpirifós pode induzir alterações comportamentais do tipo ansiedade e do tipo depressão. O comportamento tipo ansiedade foi observado aos 21 dias em ambos os sexos, porém não persistiu na avaliação aos 70 dias. O comportamento do tipo depressivo foi observado apenas aos 21 dias e apenas em fêmeas. Estas observações possivelmente estão relacionadas ao momento precoce da exposição e a neuroplasticidade que acontece durante a gestação e perdura ao longo da vida. Concluímos que a exposição gestacional a baixas doses do organofosforado clorpirifós é capaz de induzir alterações comportamentais na prole na fase inicial de vida.

Palavras-chave: gestação, tireoide, clorpirifós, ansiedade, depressão.

ABSTRACT

In recent years grew the number of scientific publications by reinforcing the hypothesis that chemicals can interfere with normal development of the central nervous system. Among these substances, the class of organophosphorus pesticides are suspected to induce behavioral changes such as anxiety and depression. In Brazil, the National Health Surveillance Agency, through the program of analysis of residues of pesticides in food, comes showing that several chemical compounds are found in the form of waste in indexes higher than allowed. The organophosphate chlorpyrifos, widely used in Brazilian agriculture, is one of the main chemical agents with unsatisfactory index found in food. The objective of this work was to investigate whether exposure to chlorpyrifos in Wistar rats during pregnancy could develop changes anxiety like and depressive like behavioral in the offspring. The rats were exposed orally between 14 and 20 of gestation at doses of 0.01; 0.1; 1 and 10 of chlorpyrifos mg/kg. Mothers were evaluated: the body mass gain during pregnancy and lactation, the number of pups, gestation time, the weight of the pups at birth and at weaning. The offspring was evaluated for development: measures body weight at birth, anogenital distance, the descent of the testes in the scrotum and the opening of the vaginal canal; and the body and relative organ masses were evaluated at the end of lactation and early adulthood. Were also assessed in the offspring (21 and 70 days of life) the anxiety like behavior by elevated plus-maze test and depression by forced swimming test modified, as well as open field test for assessment of motor activity. In the offspring were also performed the measurement of acetylcholinesterase enzyme activity levels and morphological histology of thyroid. The main results observed in the offspring showed that chlorpyrifos can induce behavioral changes of anxiety like and depression like behavior. The anxiety like behavior was observed to 21 days in both sexes, but not persisted in the evaluation to 70 days. The depressive like behavior was observed only for 21 days and only in females. These remarks possibly relate to the early time of the exhibition and the neuroplasticity that happens during pregnancy and continues throughout life. We conclude that gestational exposure to low doses of the organophosphate chlorpyrifos can induce behavioral changes in the offspring at early stage of life.

Key-words: pregnancy, thyroid, chlorpyrifos, anxiety, depression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PRINCIPAIS INGREDIENTES ATIVOS COM USO IRREGULAR DETECTADOS EM AMOSTRAS INSATISFATÓRIAS DE ALIMENTOS ANALISADOS PELO PARA (2015).....	24
FIGURA 2 – MOLÉCULA ESTRUTURAL DO CLORPIRIFÓS.....	25
FIGURA 3 - VIAS AMBIENTAIS DE DEGRADAÇÃO DO CLORPIRIFÓS.....	26
FIGURA 4 - VIAS FISIOLÓGICAS DE DEGRADAÇÃO DO CLORPIRIFÓS.....	27
FIGURA 5 - EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREOIDE.....	29
FIGURA 6 - POSSÍVEIS VIAS DE INTERVENÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS DA TIREOIDE.....	30
FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TIROXINA (T4) E DA TRIIODOTIRONINA (T3) 33	
FIGURA 8 - DESENHO EXPERIMENTAL PARA EXPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLORPIRIFÓS SOBRE A GESTAÇÃO.....	40
FIGURA 9 - DISTÂNCIA ANOGENITAL, FÊMEAS (ESQUERDA) E MACHOS (DIREITA).....	42
FIGURA 10 - RETRAÇÃO MANUAL DO PREPÚCIO DE UM RATO COM SEPARAÇÃO PREPUCIAL COMPLETA.....	43
FIGURA 11 – HISTOLOGIA DA TIREOIDE DE FILHOTES EM 21 DIAS.....	51
FIGURA 12 – HISTOLOGIA DA TIREOIDE DE FILHOTES EM 70 DIAS.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL.50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MASSA CORPORAL E DE ÓRGÃOS DAS MÃES NA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO E PARÂMETROS DE GESTAÇÃO.....	46
TABELA 2 – MASSAS CORPORAL E RELATIVA DE ÓRGÃOS DOS FILHOTES AO FINAL DAS FASES DE LACTAÇÃO (PND21) E INFANTO-JUVENIL (PND70) COMO PARÂMETROS DE TOXICIDADE	47
TABELA 3 – DISTÂNCIA ANOGENITAL DA PROLE AVALIADA DURANTE A LACTAÇÃO.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	- Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPF	- Clorpirifós/Chlorpyrifos
EPA	- Environmental Protection Agency
EDC	- Endocrine Disruptor Chemical
Gd0	- Gestational day 0
Gd14	- Gestational day 14
Gd21	- Gestational day 21
GMC	- Ganho de massa corporal
HPT	- Hipotálamo – Pituitária – Tireoide
OECD	- Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PTU	- Propiltiouracil/Propylthiouracil
PND21	- Post natal day 21
PND70	- Post natal day 70
TRH	- Thyrotrofine Release Hormone
TSH	- Thyroid Stimulating Hormone
TDAH	- Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDC	- Thyroid Disruptor Chemical

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA.....	19
1.2	HIPÓTESES E PREDIÇÕES.....	20
1.3	OBJETIVOS.....	21
1.3.1	Objetivo Geral.....	21
1.3.2	Objetivos Específicos.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	22
2.2	CLORPIRIFÓS	23
2.3	EIXO HPT E A TIREOIDE	28
2.4	DESENVOLVIMENTO CEREBRAL E NEUROPLASTICIDADE.....	34
2.5	TRANSTORNOS DE COMPORTAMENTO: ANSIEDADE E DEPRESSÃO...35	
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	ANIMAIS	37
3.2	ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS	37
3.3	ACASALAMENTOS	38
3.4	OS GRUPOS E SEUS TRATAMENTOS	39
3.5	PERÍODOS DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO	40
3.6	AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES	41
3.6.1	Peso ao nascer e massas corporal e relativa de órgãos	41
3.6.2	Distância anogenital	41
3.6.3	Descida dos testículos à bolsa escrotal	42
3.6.4	Abertura do canal vaginal	43
3.6.5	Atividade da acetilcolinesterase.....	43
3.6.6	Histologia da tireoide	44
3.6.7	Análise estatística	44
4	RESULTADOS	45
4.1	AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES	45
4.1.1	Peso ao nascer e massas corporal e relativa de órgãos	45
4.1.2	Distância anogenital	45
4.1.3	Descida dos testículos à bolsa escrotal	49
4.1.4	Abertura do canal vaginal	49

4.1.5	Atividade da acetilcolinesterase.....	49
4.1.6	Histologia da tireoide	50
4.2	ARTIGOS DA TESE	52
4.2.1	Artigo 1: Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy.....	52
4.2.2	Artigo 2: Anxiety and depressive-like behavior in females offsprings rats induced by chlorpyrifos.....	74
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÕES	99
7	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

Cresce ao longo dos anos a conscientização sobre o fato de que várias moléculas naturais ou sintéticas lançadas no ambiente pela atividade humana estão de alguma forma interferindo no funcionamento normal dos organismos. A partir do século XIX, o início da segunda Revolução Industrial se caracterizou pelo avanço tecnológico na atividade fabril, o aumento do consumo de recursos naturais e o conseqüente lançamento no ambiente de substâncias químicas que antes não faziam parte dos ciclos biogeoquímicos naturais (Hobsbawm, 2015).

Entre as milhares de substâncias químicas que hoje são lançadas no meio ambiente, seja no ar, no solo ou na água, os organofosforados são de grande interesse científico por influenciarem o funcionamento dos organismos nas suas diversas fases da vida (Umbuzeiro *et al.*, 2010). Tais substâncias são descritas como *endocrine disrupting chemicals* (EDC's) ou em uma tradução livre desreguladores endócrinos, por serem capazes de influenciar o desenvolvimento e/ou funcionamento orgânico tanto de seres humanos quanto de outros seres vivos.

O termo “desreguladores endócrinos” ou simplesmente EDC's é usado para descrever atualmente substâncias que tenham potencial para interferir com o sistema endócrino em baixas doses de exposição, seja modificando a capacidade das glândulas em produzir ou liberar seus hormônios, interferir na ligação dos hormônios com seus receptores (Vandenberg *et al.*, 2012); ou ainda influenciar no funcionamento interno das células alvo destes hormônios (Jugan *et al.*, 2010).

Diversos autores demonstram a necessidade de caracterização dos riscos potenciais dos organofosforados como desreguladores endócrinos (Daston *et al.*, 2003; Guillette, 2006). Dentre os desreguladores químicos endócrinos (EDC's), os desreguladores químicos da tireoide são vistos como importantes na pesquisa farmacológica devido ao papel que a tireoide e seus hormônios desenvolvem sobre vários mecanismos orgânicos (Crofton *et al.*, 2000; Glinoe, 2001; Ishihara, A. *et al.*, 2003; Zoeller e Tan, 2007; Waung *et al.*, 2012).

Dentre as glândulas passíveis de influência pelos desreguladores endócrinos, a tireoide é uma das mais importantes, no que diz respeito aos males que advêm ao organismo como um todo (Jugan *et al.*, 2010), principalmente sobre o metabolismo energético, neurodesenvolvimento (Gharami e Das, 2000; Feldt-Rasmussen e Mathiesen, 2011) e a gestação (Klein, 2011).

A tireoide desenvolve um importante papel tanto no desenvolvimento embrionário quanto na gestação, por influenciar diretamente no período de organogênese de áreas importantes como o sistema nervoso central (Hartoft-Nielsen *et al.*, 2011) e os órgãos sexuais (Gilbert *et al.*, 2012). Uma alteração no funcionamento da tireoide pode ter consequências em longo prazo (Eaton *et al.*, 2008a), visto que sua ação se dá sobre a ativação e/ou desativação da expressão genética da célula alvo (Estevan *et al.*, 2013).

A grande dificuldade em estudar a desregulação da tireoide é a complexidade dos mecanismos de ação envolvidos. A via de ação dos hormônios da tireoide é bastante complexa, e os produtos químicos tidos como desreguladores endócrinos podem agir em vários níveis de uma cascata de eventos, incluindo na síntese dos hormônios da tireoide e na sua regulação pelo eixo Hipotálamo-Pituitária-Tireoide (HPT) (Davis *et al.*, 2008), no catabolismo dos hormônios pelo fígado e rins, na capacidade de ligação a proteínas de transporte, na captação celular e acoplamento aos receptores e na ativação celular pela via gênica (Jugan *et al.*, 2010). Desta forma, alterações que venham a comprometer o fluxo adequado de hormônios tireoidianos podem afetar o desenvolvimento embrionário e gerar consequências tardias na fase pós-natal.

O clorpirifós é um dos mais comuns inseticidas usados em todo o mundo (Eaton *et al.*, 2008a). Sua toxicidade é relacionada com a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase desregulando funções colinérgicas do sistema nervoso (Rosario e Purisch, 2011). Na última década, o aumento dos riscos associados às doses não tóxicas ao sistema colinérgico tem sido observado e mesmo com restrições de uso impostas pela *Environmental Protection Agency* (EPA) em 2000, o clorpirifós ainda é um dos organofosforados mais usados no mundo (Buratti *et al.*, 2011).

Em doses não tóxicas ao sistema colinérgico o clorpirifós é capaz de se ligar a resíduos de tirosina de proteínas (Jiang *et al.*, 2012). Desta forma, poderia ser capaz de intervir sobre o transporte de hormônios da tireoide já que os mesmos são transportados até a célula alvo por proteínas sanguíneas como a tireoglobulina, a transtiretina e a albumina (Boas *et al.*, 2012).

De acordo com Eaton *et al.* (2008) há informações contraditórias sobre a capacidade do clorpirifós em provocar toxicidade sobre o neurodesenvolvimento em baixas doses. Estudos *in vivo* indicam efeitos do clorpirifós em baixas exposições (Boas *et al.*, 2006), causando diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

cerebral. Slotkin *et al.* (2006) sugere que exista uma dicotomia entre a completa toxicidade sistêmica dos organofosforados e a sua capacidade de causar neurotoxicidade durante o desenvolvimento.

O clorpirifós é indicado tanto em ratos quanto em humanos como interferente do neurodesenvolvimento fetal na gestação (Zhao *et al.*, 2005). O desenvolvimento normal do sistema nervoso central depende de um complexo mecanismo, com componentes espaciais e temporais durante a gestação. O desenvolvimento das funções cognitivas requer a formação e o refinamento das redes sinápticas dos neurônios no cérebro (Meredith *et al.*, 2012). O neurodesenvolvimento fetal é dependente de programação celular, do desenvolvimento de trajetórias de crescimento celular, da plasticidade sináptica e da maturação de oligodendrócitos.

A exposição ao clorpirifós durante a gestação leva ao maior risco de atraso no desenvolvimento mental e motor e a maior incidência de transtornos como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (Rauch *et al.*, 2012). Com essa variedade de influências, a exposição durante a fase gestacional aos pesticidas como clorpirifós é um importante ponto a ser considerado (Connors *et al.*, 2008).

1.1 JUSTIFICATIVA

A neurotoxicidade provocada pelo clorpirifós é associada com a interferência, comum a todos os organofosforados, aos níveis de AChE cerebral. Porém, o clorpirifós interfere sobre a maturação de vias neuroendócrinas, e desta forma, suporta a hipótese de que ele aja como um neurodesregulador endócrino por alterar a atividade modulatória de hormônios em doses que não alteram a atividade e/ou níveis da AChE (Haviland *et al.*, 2010). Assim, um novo conjunto de mecanismos relevantes a neurotoxicidade do clorpirifós, diferentes da ação sobre a AChE cerebral, mostra-se evidente e promove grande interesse na questão do uso de organofosforados em baixas doses (Slotkin, 2004b).

Na gestação, o desenvolvimento do sistema nervoso central fetal é um fenômeno complexo envolvido com a participação de vários mecanismos que obedecem a uma lógica de construção peculiar. O desenvolvimento rápido da arquitetura e da circuitaria cerebral fetal e infantil é considerado um evento susceptível a exposição por pesticidas (Garcia *et al.*, 2005), ainda mais considerando-se a habilidade que os pesticidas possuem em atravessar a barreira placentária e de serem

encontrados no líquido amniótico (Bradman *et al.*, 2003), especificamente o clorpirifós (Lassiter *et al.*, 1997; Lassiter *et al.*, 1998). Eventos de diferenciação celular, plasticidade e sinapses são passíveis de modificações pela exposição a pesticidas como o clorpirifós (Connors *et al.*, 2008).

O período perinatal apresenta intensa atividade da circuitaria cerebral envolvida com o desenvolvimento e a manutenção adequados do comportamento social ao longo da vida (Garcia *et al.*, 2005). Estudos com exposição ao clorpirifós durante o período pós-natal demonstram que ele apresenta capacidade de influenciar os sistemas serotoninérgico (Slotkin *et al.*, 2006; Timofeeva *et al.*, 2008) e colinérgico (Slotkin e Seidler, 2015). Assim, o clorpirifós é capaz de induzir modificações relacionadas ao comportamento tipo-ansiedade nos filhotes (Venerosi *et al.*, 2015).

Estudos epidemiológicos mostram que baixos níveis de tiroxina em gestantes podem aumentar os riscos de perturbação do desenvolvimento das funções cognitivas fetais (Berbel *et al.*, 2009).

No entanto, pouco se sabe sobre a influência do clorpirifós frente a exposição pré-natal em doses baixas e em período crítico para o funcionamento da tireoide e se tal exposição seria capaz de promover alterações na circuitaria relacionada ao neurodesenvolvimento sendo perceptivo em testes comportamentais que identificassem transtornos de ansiedade e/ou depressão.

1.2 HIPÓTESES E PREDIÇÕES

Alterações comportamentais geradas durante o neurodesenvolvimento fetal deficitário de hormônios da tiroide devido à ação do pesticida clorpirifós nos parece ser plausível e carente de estudos.

A interferência química gerada pelo pesticida clorpirifós em baixas doses sobre o desenvolvimento da tiroide durante a fase gestacional pode ser capaz de alterar os padrões comportamentais de ansiedade e depressão. A demonstração de tais comportamentos deve ocorrer durante a fase infantil e/ou persistindo até a fase adulta.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Determinar a capacidade de intervenção do pesticida clorpirifós frente a exposição pré-natal com posterior avaliação sobre os parâmetros de desenvolvimento corporal de progenitoras e da prole e sobre os distúrbios de comportamento do tipo ansiedade e do tipo depressão da prole ao final das fases de lactação e jovem-adulto.

1.3.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- a) Avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento corporal das progenitoras expostas ao clorpirifós ao final da gestação e da lactação.
- b) Avaliar os parâmetros de gestação das progenitoras para obter o grau de qualidade da gestação.
- c) Avaliar as possíveis alterações no desenvolvimento corporal da prole ao final da lactação e ao final da fase de jovem-adulto.
- d) Avaliar os níveis de atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral.
- e) Avaliar o parâmetro histológico da tireoide para identificar possíveis modificações estruturais e/ou funcionais.
- f) Avaliar a distância anogenital dos filhotes durante a lactação.
- g) Identificar alterações comportamentais relacionadas aos transtornos de ansiedade e/ou depressão na prole exposta ao clorpirifós durante a gestação nos momentos PND21 e PND70.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Durante a última década, a lista de produtos químicos com potencial de desregulador endócrino tem aumentado drasticamente. Há evidências de que eles podem comprometer o sistema reprodutivo, o mecanismo de sinalização da tireoide, bem como tecidos e órgãos ligados ao metabolismo energético, controle da glicose, desenvolvimento de células adiposas e saciedade (McClellan, 2012).

O aumento na incidência de infertilidade, neoplasias testiculares, anormalidades estruturais do sistema reprodutivo e de alterações neurológicas (motoras e comportamentais), podem ser relacionadas com a exposição aos pesticidas e a outros contaminantes químicos ambientais capazes de interferir no sistema endócrino e nervoso (Colborn *et al.*, 1993). Estas hipóteses foram discutidas pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, em 1995 (EPA, 2000) e pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), em 2000. Em 2003 a OECD propôs o guia para avaliação de substâncias com potencial neurotóxico (OECD, 2003).

Os químicos chamados de desreguladores endócrinos possuem habilidade para reagir direta ou indiretamente com a estrutura do hormônio para alterar suas funções, modificar as suas vias de síntese, ou modular a expressão de receptores e suas afinidades por moléculas específicas (Chapin *et al.*, 1997). A desregulação endócrina está relacionada com a origem do tóxico, a fonte, o local de exposição, o mecanismo de ação e/ou tempo de exposição (Evans, 2007; Evans, 2011).

Desreguladores químicos da tireoide (TDC's) são xenobióticos que alteram a estrutura ou o funcionamento da glândula tireoide, alteram enzimas que estão envolvidas com a homeostasia da tireoide ou alteram a concentração dos hormônios tireoidianos nos tecidos (Ishihara, Akinori *et al.*, 2003). Os TDC's incluem uma grande variedade de estruturas químicas que podem agir por uma variedade de mecanismos (Crofton, 2008).

2.2 CLORPIRIFÓS

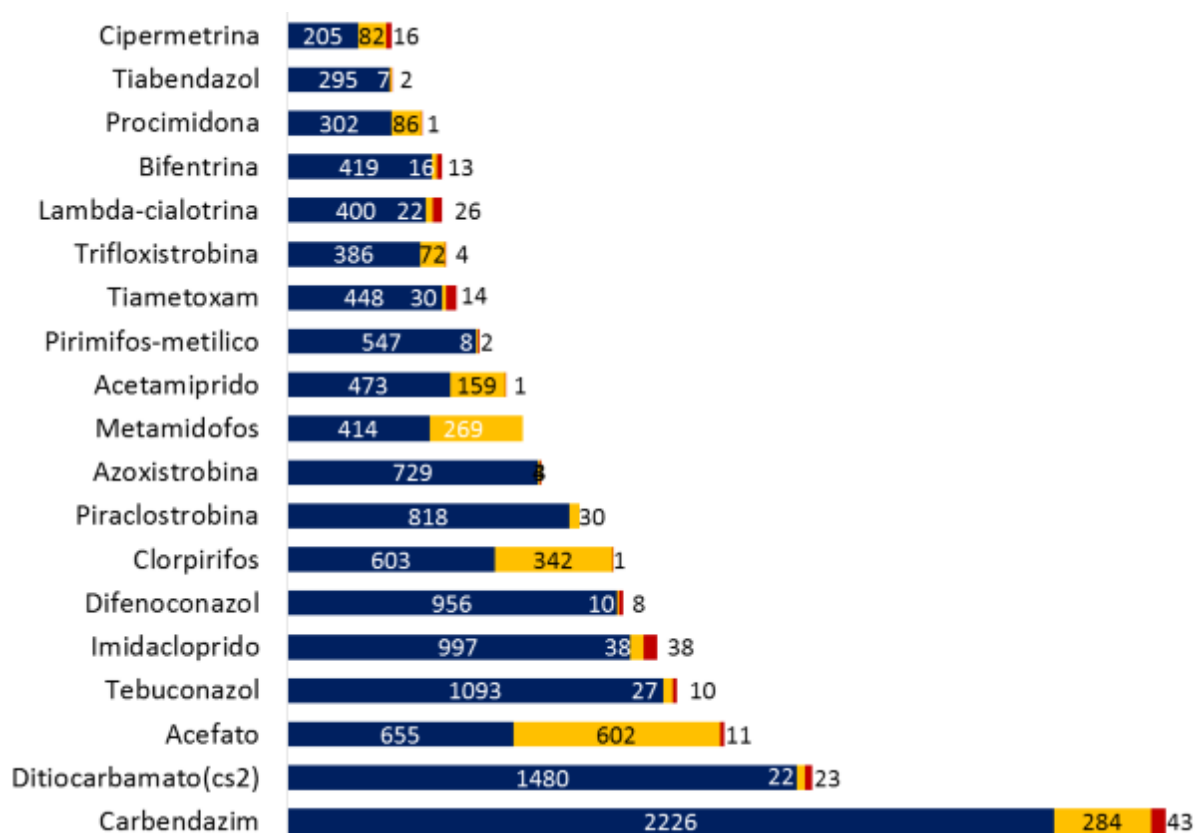
Os pesticidas da classe dos organofosforados incluem uma grande variedade de compostos capazes de alterar o funcionamento fisiológico, dentre eles o com maior incidência de casos é o clorpirifós (Wang *et al.*, 2013).

O clorpirifós foi introduzido no mercado em 1965. Usado primeiramente para o controle de pragas na agricultura, seu uso como controle de pragas domésticas foi abolido em 2001 nos Estados Unidos e está em fase de término desde 2006 na Europa (Eaton *et al.*, 2008a). No Brasil de acordo com a Resolução-RDC nº 206 de 23/08/04, DOU de 24/08/04, determinou-se a suspensão do registro, bem como a não concessão de novos registros, de produtos saneantes domiciliares à base do ingrediente ativo clorpirifós, excluindo-se desta determinação somente aqueles registros destinados ao uso em iscas para combate de baratas, em embalagens porta iscas dotadas de dispositivo de segurança para evitar a exposição de crianças (ANVISA, PARA 2010).

O levantamento sobre o uso de clorpirifós no Brasil é feito com base no Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com o objetivo de avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. O PARA integra medidas de controle pós-registro que promovem mudanças na organização dos serviços de saúde para prevenção de agravos relacionados aos agrotóxicos.

De acordo com o relatório PARA de 2015 (figura1) foram encontradas 603 amostras de alimentos com a detecção positiva para o clorpirifós, sendo que destas, 342 foram consideradas detecções irregulares apresentando alto índice do pesticida ou presença em amostras não permitidas.

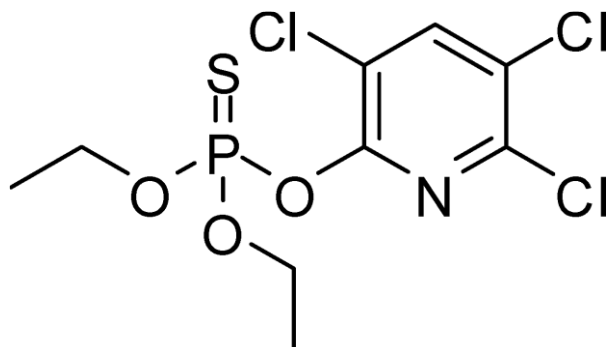
FIGURA 1 – PRINCIPAIS INGREDIENTES ATIVOS COM USO IRREGULAR DETECTADOS EM AMOSTRAS INSATISFATÓRIAS DE ALIMENTOS ANALISADOS PELO PARA (2015).



FONTE: Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) 2015. Adaptado.

O clorpirifós, quimicamente, é um éster do ácido fosfórico ou de ácidos derivados desse (figura 2). Possui a nomenclatura IUPAC de O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridina-2- fosforotioato, pertence ao grupo químico dos organofosforados, na classe dos inseticidas, formicidas e acaricidas, enquadra-se na classificação toxicológica classe II (muito tóxico), fisicamente é apresentado com aspecto cristalino e com pouca solubilidade em água. Sua função prioritária é atuar sobre o sistema nervoso bloqueando de forma irreversível a hidrólise por parte da enzima acetilcolinesterase ao seu substrato a acetilcolina.

FIGURA 2 – MOLÉCULA ESTRUTURAL DO CLORPIRIFÓS

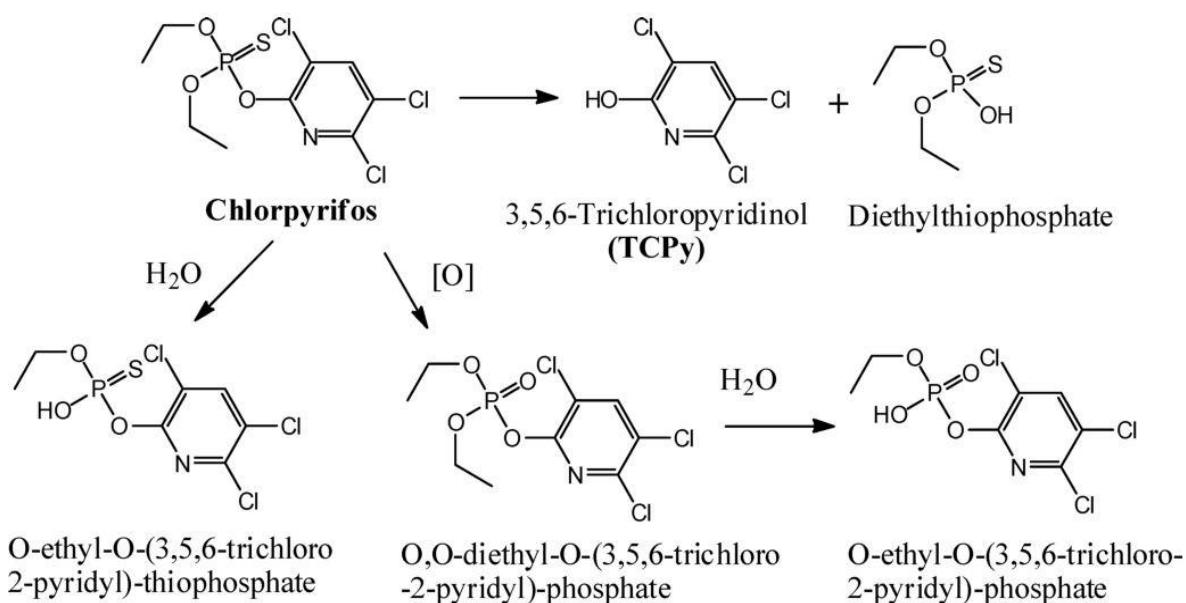


FONTE: Adaptado de Eaton (2010)

Apresentando alta lipossolubilidade, o clorpirifós é absorvido pelo organismo humano, especialmente pela pele, além de membranas mucosas e pela via respiratória. A absorção pelo trato gastrointestinal, normalmente, ocorre em intoxicações acidentais. Também pode ocorrer pelo consumo de frutas e verduras *in natura* contaminadas e destinadas ao consumo sem que o período de carência do agrotóxico seja observado.

Em 2000, a EPA conclui que o efeito de ação sobre a AChE foi o efeito mais visível em todas as espécies animais, independente da duração da exposição. Com base em dados disponíveis, a inibição de AChE, particularmente no sangue, ainda fornece as mais sensíveis amostras de dose-resposta para a avaliação de risco à saúde.

FIGURA 3 - VIAS AMBIENTAIS DE DEGRADAÇÃO DO CLORPIRIFÓS

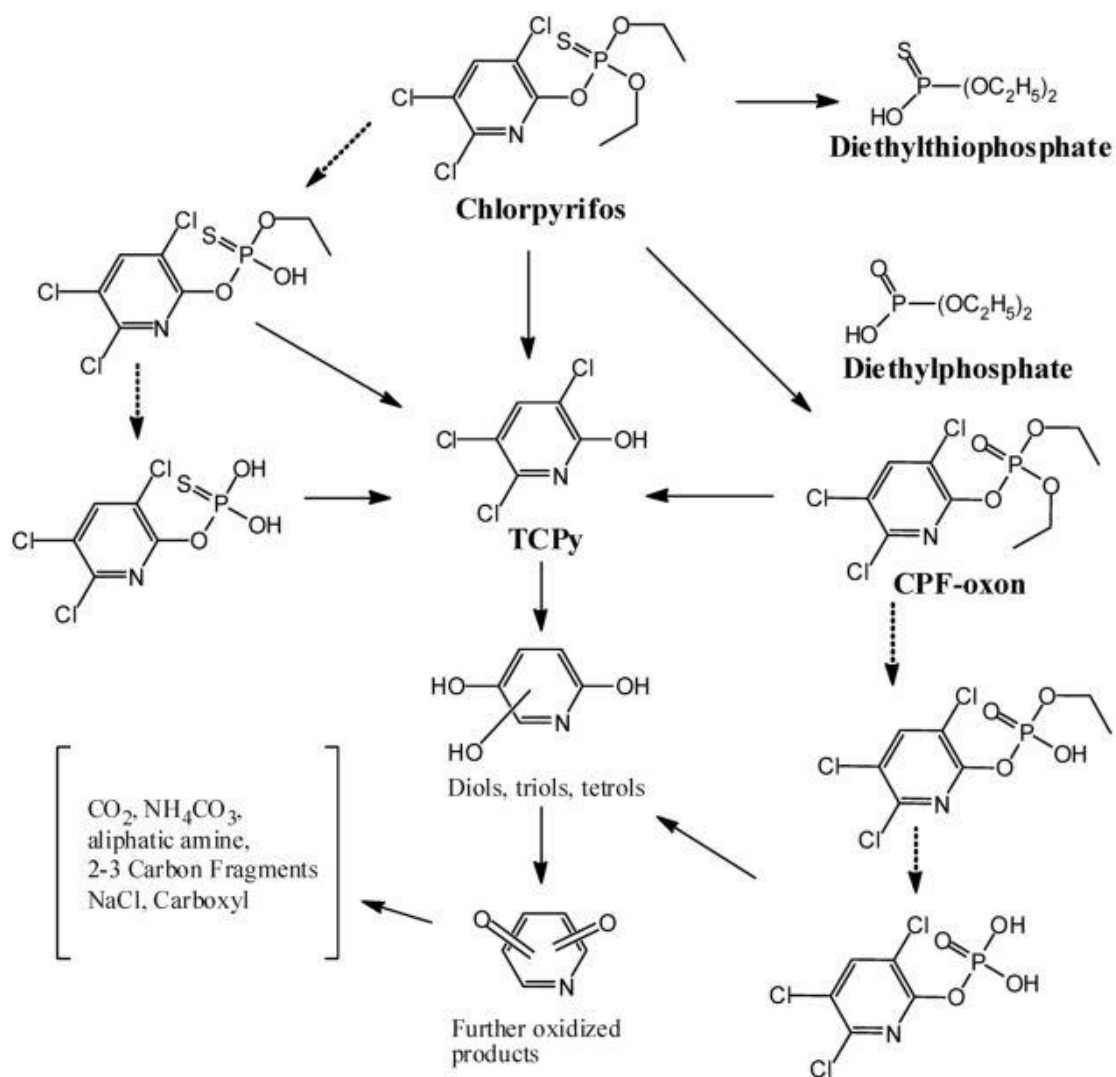


FONTE: Adaptado de Eaton (2008)

Na natureza, o clorpirifós apresenta um alto grau de volatilidade (1.9×10^{-5} mmHg/ 25°C) o que o faz altamente dispersível pelo ambiente. Sua degradação e de seus metabólitos no solo se dá principalmente por fotocatalise, com meia vida que pode variar de 60 – 120 dias (White, 1992), e em presença de radicais hidroxila atmosféricos sua meia vida cai para seis horas (Dixon *et al.*, 2002). Como mostrado na figura 3, existem diversas vias de degradação no meio ambiente.

Sua metabolização ocorre por dessulfurização oxidativa do grupo $P=S$ e assim oxidando para a forma de clorpirifós-oxon, o qual no geral é considerado como o principal metabólito tóxico. Esta reação é catalisada pelas enzimas do grupo citocromo P450, principalmente no fígado (Estevan *et al.*, 2013). O clorpirifós-oxon também pode sofrer processo de oxidação e, neste caso, será formado o dietilfosfato e o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy) (figura 4). Esses metabólitos são indicadores de toxicidade por clorpirifós e são passíveis de serem avaliados por exames de urina (figura 4).

FIGURA 4 - VIAS FISIOLÓGICAS DE DEGRADAÇÃO DO CLORPIRIFÓS



FONTE: Adaptado de Eaton (2008)

Considerando relevante a farmacocinética e os estudos de metabolismo, alguns aspectos são importantes: a rota da exposição, a dose de exposição, a forma da exposição e a metodologia empregada. Majoritariamente os estudos crônicos têm sido conduzidos com administração oral em tratamentos crônicos com doses entre 0,05 – 25 mg/Kg/dia (Medina-Díaz *et al.*, 2011). O valor de Índice Diário Aceitável (IDA) de acordo com o relatório monográfico C20 da ANVISA é de 0,01 mg/Kg/dia (ANVISA 2010).

Os experimentos em baixas doses têm comumente refletido as condições de exposição humana (Fliers *et al.*, 2006; Evans, 2007). No entanto, acredita-se ser possível, que o desenvolvimento do sistema nervoso no período gestacional pode ser

relativamente mais susceptível ao clorpirifós do que o sistema nervoso mais desenvolvido encontrado em lactentes e crianças. Assim, é razoável considerar mulheres grávidas como uma subpopulação potencialmente suscetível (Eaton *et al.*, 2008a; Gilbert *et al.*, 2012).

De acordo com Slotkin *et al.* (2013) após feito um levantamento sobre o seu potencial de contribuição como desregulador endócrino no neurodesenvolvimento pouco tem sido estudado (Slotkin *et al.*, 2013). Um estudo recente aponta um potencial efeito do clorpirifós sobre a função tireoidiana em concentrações não tóxicas ao sistema colinérgico onde ratos expostos ao clorpirifós no momento pós-natal (4^o - 11^o dias) em doses que não causaram a inibição da acetilcolinesterase mostraram uma pequena, mas significativa redução nas concentrações séricas de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) (Simona *et al.*, 2009). A exposição pré-natal em modelos animais com roedores ao clorpirifós induziu a longo prazo mudanças na performance cognitiva sem distinção do sexo (Levin *et al.*, 2002).

Em experimentos com ratos adultos a toxicidade gestacional do clorpirifós foi demonstrada apenas em doses superiores a 2,5 mg/kg (Jeong *et al.*, 2006), por isso os estudos sobre o desenvolvimento gestacional sugerem que uma maior sensibilidade à toxicidade pela tiroide de um organismo imaturo pode gerar deficiências endócrinas, ainda que não afete os níveis de T3 e T4 a ponto de causar hipotireoidismo (Slotkin, 2004a).

2.3 EIXO HPT E A TIREOIDE

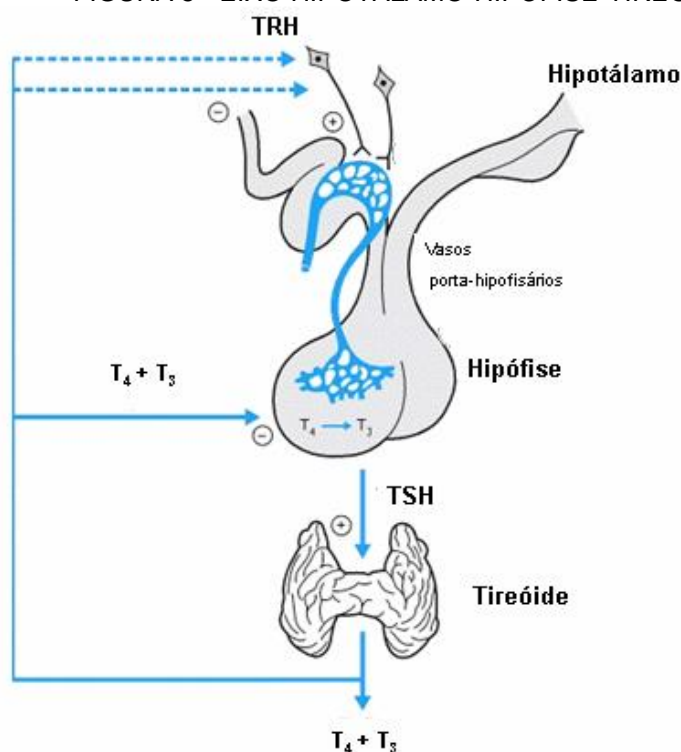
O eixo Hipotálamo – Pituitária – Tireoide (HPT) é o principal meio de comunicação entre os sistemas nervoso e endócrino e por esta característica de integração torna-se fundamental na manutenção de toda a homeostase do organismo.

O Hipotálamo, uma pequena região do encéfalo localizada abaixo do tálamo, é o principal integrador entre os sistemas nervoso e endócrino por receber estimulação de diversas áreas tanto do encéfalo (sistema límbico, córtex cerebral e tálamo) quanto dos órgãos internos e da retina (Guyton e Hall, 2006). Além de ser um centro regulador, o hipotálamo ainda produz hormônios que atuam sobre a hipófise. Neurônios hipotalâmicos dos núcleos para-ventriculares produzem o hormônio liberador de tirotrófina (TRH), derivado de um grande precursor, o pré-pró-TRH (Khadem *et al.*, 2012) e cuja principal função é estimular a síntese e secreção do

hormônio estimulador da tireoide (TSH) através da sua ligação a receptores presentes na membrana plasmática dos tireotrófos da adeno-hipófise (Crofton, 2008).

Em humanos, a hipófise é uma estrutura que mede cerca de 1,5 cm de diâmetro, situada na cela túrcica do osso esfenóide, divide-se em duas porções (hipófise anterior e posterior) (Feldt–Rasmussen e Mathiesen, 2011). A partir dela são gerados hormônios que vão controlar virtualmente todos os aspectos do crescimento, do desenvolvimento, do metabolismo e da homeostasia (Tortora e Grabowski, 2003). O hormônio estimulador da tireoide ou tiotropina (TSH, do inglês *thyroid stimulating hormone*) é liberado pelos tireotrofos e atua controlando a secreção e outras atividades da tireoide.

FIGURA 5 - EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREOIDE



Principais vias de *feedback* entre a tireoide e o sistema nervoso.

FONTE: Adaptado de Rodin (2001)

Quase toda a secreção da hipófise é controlada por sinais hormonais ou nervosos do hipotálamo. Os hormônios hipotalâmicos que estimulam a hipófise anterior, são denominados de hormônios de liberação ou inibição hipotalâmicos e são transportados via vasos sanguíneos, denominados, *vasos porta hipotalâmico – hipofisários*.

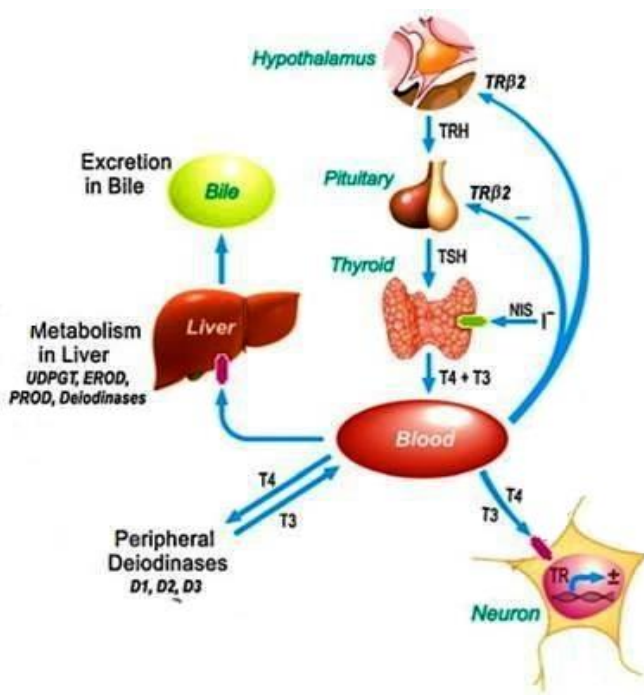
Dentre os vários hormônios produzidos pela base neuronal do hipotálamo existe um de grande importância para a tireoide, o hormônio de liberação da

tireotropina (TRH, do inglês *thyrotropin releasing hormone*), que causa a liberação do hormônio tireoestimulante ou TSH. Na membrana plasmática dos tireotrófos, o TRH interage com seus receptores específicos, membros de uma família de receptores com sete domínios transmembranares e acoplados à proteína Gq (Yen, 2001; 2003).

A regulação da secreção de TSH é dada por um sistema de retroalimentação negativo associado ao balanço dos níveis séricos de T3 e T4 (figura 5) e pelo controle hipotalâmico exercido pelo TRH (Bano *et al.*, 2001; Nejaty *et al.*, 2001; Boelen *et al.*, 2006; Fliers *et al.*, 2006). Quando ocorre uma diminuição das concentrações séricas de hormônios tireoidianos há um estímulo para o aumento do número de receptores de TRH nos tireotrófos, assim como estímulo da síntese de TSH formando a alça de retroalimentação negativa do eixo HPT (Fliers *et al.*, 2006; Chiamolera *et al.*, 2010).

Descritas na figura 6, estão as possíveis vias de intervenção dos desreguladores endócrinos sobre o eixo HPT, agindo tanto na síntese, nas proteínas de transporte, nos mecanismos celulares de sinalização quanto em receptores dos hormônios tireoidianos e no metabolismo no fígado (Boas *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2012).

FIGURA 6 - POSSÍVEIS VIAS DE INTERVENÇÃO DOS DESREGULADORES ENDÓCRINOS DA TÍREOIDE



Principais vias de ação dos desreguladores endócrinos sobre a atividade dos hormônios tireoidianos.

FONTE: Adaptado de Gilbert *et al.* (2012)

A tireoide é uma glândula em forma de borboleta situada logo abaixo da laringe e aos lados da traqueia, considerada como sendo uma das maiores glândulas endócrinas do corpo humano com cerca de 20 gramas. É formada por folículos cuja parede é constituída por camada única de células epiteliais cúbicas. No lúmen do folículo encontra-se o coloide, cujo principal componente, a tireoglobulina (Tg), molécula que dá suporte à biogênese dos hormônios tireoidianos, é sintetizada pelas células foliculares.

As funções tireoidianas são finamente alinhadas com um feed-back negativo entre os hormônios tireoidianos circulantes e os níveis hipotalâmicos e pituitários. Alterações na glândula tireoide, em proteínas de ligação (tireoglobinas), no metabolismo periférico e sobre o clearance também afetam a função tireoidiana.

Hormônios tireoidianos estão envolvidos em um grande número de atividades fisiológicas como processos de regulação do metabolismo, remodelagem óssea, funções cardíacas (Boas *et al.*, 2012). Estes hormônios apresentam função importante na homeostase energética do organismo, no crescimento e diferenciação de tecidos, em muitas vias metabólicas e também na formação neuronal do feto durante o período de gestação (Jugan *et al.*, 2010).

Os hormônios 3,5,3 – triiodotironina (T3) e a 3,5,3',5' – tetraiodotironina ou Tiroxina (T4) identificados na figura 7, são ativamente transportados pela corrente sanguínea mediante as proteínas transportadoras, proteína ligadora de tiroxina (TBG), transtiretina (TTR) e a albumina. A taxa de afinidade é diferente entre elas, sendo que a TBG é a principal transportadora no humano com uma taxa de 75% dos hormônios ligados a ela. A transtiretina é a principal transportadora em ratos, visto que a tireoglobulina é encontrada em porcentagem muito reduzida (Boas *et al.*, 2012).

A concentração intra-tecidual de T3 pode não refletir sua concentração plasmática, pois depende da captação dos hormônios tireoidianos pelas células e da desiodação de T4 para T3. A desiodação do anel externo de T4 é catalizada por ação das enzimas iodotironina desiodases teciduais, sendo a principal via para a produção de T₃ circulante. A desiodase tipo I (D₁) é encontrada em tecidos como fígado e rim e é responsável pela maioria do T₃ plasmático. A desiodase do tipo II (D₂) encontrada no cérebro, hipófise e tecido adiposo marrom fornece T₃ principalmente para uso intracelular. Existe ainda a desiodase do tipo III (D₃), encontrada na placenta, cérebro

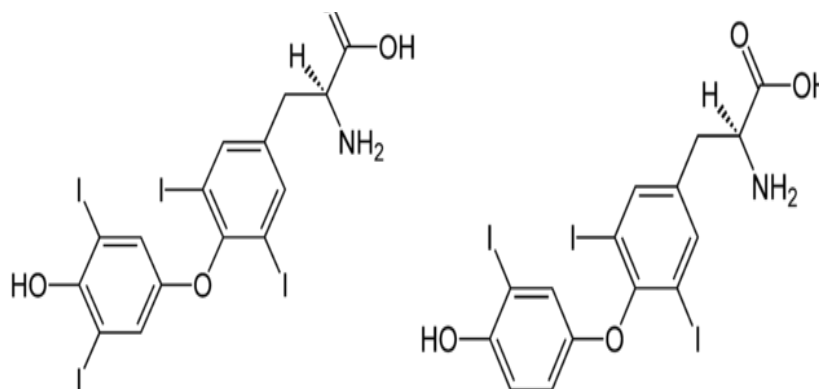
e pele, que é uma via de inativação dos hormônios da tireoide por gerar T3 reverso (Rt3) e a di-iodo tironina (T2) (Yen, 2001).

Durante o desenvolvimento embrionário, proteínas envolvidas na síntese dos hormônios tireoidianos, como TPO, Na⁺/I⁻ Transportador (NIS), Tg, TSH e TSHr, são expressados após células precursoras da tireoide tenham completado a sua migração até a sua localização final ao redor da traqueia (Milenkovic *et al.*, 2007). Em ratos essa maturação morfo-funcional terminal começa com a expressão de Tg no 14^o dia embrionário, seguido dos outros marcadores da diferenciação tireoidiana (TSHr, NIS e TPO) no 15^o dia; em modelos de roedores, a glândula tireoide fetal não é funcional até o dia 17^o de gestação. (Parlato *et al.*, 2004).

Quase a totalidade dos efeitos conhecidos dos hormônios tireoidianos é executada através dos seus receptores nucleares, por esta forma, modulando a taxa de transcrição de genes alvo (Yen, 2001). A ativação de proteínas cinases, a alteração no fluxo de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ e glicose, a regulação do metabolismo de fosfolípidios por ativação de fosfolipase C e D e presença de receptores de membrana acoplados à proteína G são alguns dos mecanismos propostos para a ação não-genômica dos hormônios tireoidianos (Bassett *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2008).

A metabolização dos hormônios tireoidianos se dá nos tecidos periféricos pela iodotironina deiodinase, assim regulando os níveis de atividade biológica de T₃ e T₄. Ainda mais, esses hormônios podem ser metabolizados no fígado por sulfatação e conjugação pela uridina difosfato gliconiltransferase (Habibi *et al.*, 2012; Waung *et al.*, 2012). Nos seres humanos, graves deficiências de hormônios da tireoide durante o desenvolvimento estão associadas a danos irreversíveis aos sistemas de praticamente todos os órgãos (Glinoer, 2001).

FIGURA 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TIROXINA (T4) E DA TRIIODOTIRONINA (T3)



Conformação estrutural dos hormônios da tireoide.
FONTE: Chemistrylab (2017)

Hormônios tireoidianos são conhecidos por desempenhar um papel importante no desenvolvimento perinatal no sistema nervoso central, isso significa que uma alteração na funcionalidade dos hormônios da tireoide para gerar graves alterações, particularmente na maturação do cérebro dos mamíferos, resultando em retardo mental e defeitos neurológicos (Bernal, 2009).

No cérebro, hormônios tireoidianos estão envolvidos com o desenvolvimento de oligodendrócitos e mielinização, bem como a extensão das células de Purkinje, assim, são essenciais para a formação normal do circuito neuronal (sinaptogênese) e subsequentes funções comportamentais. Alterações na expressão de receptores ou na ligação a receptores de hormônios da tireoide pode atrapalhar o desenvolvimento do sistema nervoso central (Purkey *et al.*, 2004).

A manutenção da função tireoidiana materna é fundamental para o desenvolvimento embriológico do feto, particularmente durante a formação neurológica (Motonaga *et al.*, 2016). Durante a primeira parte da gestação existe uma dependência hormonal por parte do feto pelo hormônio materno e assim a normalidade hormonal da mãe é de suma importância para o bom desenvolvimento gestacional. A falha na sinalização destes hormônios no cérebro humano em desenvolvimento já foi observada, e está ligada a déficits cognitivos (Schell e Gallo, 2010; Feldt–Rasmussen e Mathiesen, 2011).

No entanto, sobre os riscos a longo prazo à exposição precoce a substâncias tóxicas ambientais. Em particular, a caracterização dos efeitos sobre a tireoide e a

regulação da mesma sobre os tecidos nos diversos estágios da vida em níveis compatíveis a exposição humana ainda precisa ser estudada (Makris *et al.*, 2008).

2.4 DESENVOLVIMENTO CEREBRAL E NEUROPLASTICIDADE

Neuroplasticidade é definida como a capacidade do cérebro em ser moldado pela experiência, é a capacidade de aprender e lembrar bem como de esquecer algumas memórias, é a habilidade de reorganizar e recuperar-se após algum trauma. Cérebros jovens estão em constante construção e deste modo são diferentes de cérebros adultos. Por exemplo, as habilidades de reorganizar e reordenar funções é muito mais evidente em crianças quando comparada com adultos (Gharami e Das, 2000).

O estudo do desenvolvimento do cérebro humano envolve a compreensão de trajetórias neuronais, e investigação do que acontece quando perturbações ocorrem sobre os processos de desenvolvimento. A ordem dos eventos que constroem o sistema nervoso central, tais como a neurogênese, migração celular para alcançar o posicionamento final, especificação celular, mielinização e sinaptogênese, é altamente especializada em todos os vertebrados.

Entender o momento ideal do desenvolvimento neurológico é fundamental para o entendimento de como o fator genético e os ambientais podem influenciar seletivamente certas funções (Rakic, 2002).

O processo de mielinização de regiões cerebrais sofre maturações em tempos diferentes de acordo com as regiões cerebrais. A velocidade varia de acordo também, com a área. Por exemplo, muitas partes dos hemisférios cerebrais mielinizam-se rapidamente, com intensiva mielinização entre o primeiro e o nono mês (Paus *et al.*, 2001) outros como lobos frontais tem sua mielinização terminada após a quinta década (Bartzokis *et al.*, 2001).

Para codificação de memória de longo prazo, sinapses são necessárias para a ativação de fatores de transcrição de proteínas para novas redes de sinapses serem geradas. Um exemplo da importância dos fatores de transcrição são os receptores de hormônios tireoidianos, que atuam como supressores transcricionais quando ocupados pelo hormônio. Este fator é fundamental para a plasticidade neuronal e a deficiência deste hormônio pode causar sérios problemas de desenvolvimento (Gharami e Das, 2000).

Muitos dos efeitos sobre as condições comportamentais feitos por neurotóxicos ambientais podem ser explicados por mudanças nos mecanismos neuroendócrinos e/ou em seus processos (Frye *et al.*, 2012). As modificações comportamentais tem um papel importante nas avaliações das ameaças à saúde por exposição a produtos químicos ambientais, como citado numa revisão recente por Bernard Weiss em (Weiss, 2011) onde afirma que estudos comportamentais em muitos casos são colocados como secundário nos estudos neurotoxicológicos.

2.5 TRANSTORNOS DE COMPORTAMENTO: ANSIEDADE E DEPRESSÃO

Variações do humor ao longo da vida podem acontecer, mas a persistência de condições estressantes pode desenvolver os transtornos de comportamento. A maioria dos transtornos psiquiátricos diagnosticados deriva dos transtornos de ansiedade e depressão (Erdemir *et al.*, 2014).

A depressão ou transtorno depressivo é caracterizada pelo DSM-V (Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais) como sendo um transtorno de humor (Association, 2013). A depressão é definida como sendo um modo de transtorno psiquiátrico com ramificações em diversos níveis de manifestação (social, fisiológico e comportamental), heterogênea então por definição. Com os estudos da conformação neuronal foi possível entender que a etiologia da depressão e da ansiedade não estão associadas apenas a uma área cerebral (Jung *et al.*, 2014; Manning *et al.*, 2017; Park e Moghaddam, 2017) mas a diversas áreas como córtex pré frontal (Nashed *et al.*, 2015; Ironside *et al.*, 2016), amígdala (Doerig *et al.*, 2016), hipocampo (Khan *et al.*, 2015) e o tálamo (Kasahara *et al.*, 2016).

A ansiedade é tida como uma resposta emocional inerente ao repertório de defesa do indivíduo, que pode ser alterada de acordo com estimulação extrínseca ou intrínseca. Ou seja, é normal estar em estado ansioso por um curto momento, porém é patológico a ansiedade persistente. De acordo com o DSM-V os transtornos primários de ansiedade são diferenciados em: transtorno de ansiedade generalizada (TAG); transtorno de fobia social; fobia específica e agorafobia.

A síntese e a liberação aminas biogênicas como a serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e também a dopamina (DA) é de fundamental importância para o processo de sinapse de neurônios de regiões envolvidas com humor (hipocampo, amígdala, córtex pré-frontal e tálamo). Assim, tanto a produção quanto o transporte

dessas aminas são alvos em potencial para a ação de diversas substâncias exógenas (ex. pesticidas). De fato, a partir da década de 1960 com o desenvolvimento de drogas que bloqueavam a recaptação de serotonina e noradrenalina, e outras que inibiam a enzima monoamina oxidase (MAO) foi que o tratamento da depressão teve avanço.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos gestacionais e comportamentais realizados neste projeto foram aplicados seguindo os fundamentos do conjunto de testes para substâncias químicas proposto pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (Oecd, 1994).

Tais protocolos de pesquisa nos auxiliaram na formulação de procedimentos racionais quanto ao uso de animais, além de possibilitar estudos multidisciplinares corroborando com a fundamentação dos dados.

O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê Setorial de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA #758/14).

A seguir estão descritos os materiais e métodos relacionados a parte do estudo com o desenvolvimento da gestação e o desenvolvimento corporal da prole. A parte do estudo relacionada ao desenvolvimento comportamental da prole é descrita nos dois artigos que compõem essa tese. As avaliações comportamentais aqui descritas foram realizadas com grupo independentes de animais.

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nos procedimentos experimentais foram ratos da variedade Wistar. Machos (n=30, com 300 ± 50 gramas de massa corporal e 100 ± 20 dias de vida) e fêmeas (n=90, com 250 ± 50 gramas de massa corporal e 100 ± 20 dias de vida) foram requisitados ao biotério da UFPR. Os filhotes advindos dos acasalamentos foram mantidos junto a mãe até o final do período de lactação (21º dia pós-natal). Após o período de lactação dos filhotes as mães foram sacrificadas. Os animais foram mantidos em salas com temperatura constante (22 ± 3 °C), em ciclo de claro e escuro de 12 horas. A alimentação e a água foram os padrões fornecidos pelo biotério.

3.2 ESCOLHA DAS SUBSTÂNCIAS

O clorpirifós (Sigma-Germany, CAS 2921-88-2) utilizado foi adquirido na sua formulação íntegra para que não tivesse interferências de excipientes e/ou outros contaminantes encontrados em formulações comerciais. Suas doses foram baseadas na Ingestão Diária Aceitável (IDA) que é definida pela portaria 3/06 da Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como sendo: "... a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais.". É expressa em mg do agrotóxico por kg de peso corpóreo (mg/kg).

O composto 6-propil-2-tiouracil (PTU) (Sigma-Germany, CAS 51-52-5) foi utilizado para compor o grupo de controle positivo. Esse composto apresenta a capacidade de bloquear a enzima tireoide peroxidase (TPO) uma conversora de iodo iônico em iodo monovalente, localizada no citoplasma dos tireócitos e assim impede a formação de T4 diminuindo os níveis séricos do hormônio. A dose de exposição (10 mg/kg) foi definida como sendo a menor capaz de gerar diminuição dos níveis de hormônios da tireoide sem apresentar toxicidade sistêmica com base no estudo prévio de Cho e colaboradores (2003) em (Cho *et al.*, 2003).

3.3 ACASALAMENTOS

Para a formação dos grupos, ratas Wistar (n=15 por grupo) foram acasaladas com ratos machos adultos sexualmente ativos (n=50 no total) e com paternidade comprovada de maneira a não promover o acasalamento entre irmãos. Os acasalamentos se deram durante a fase escura (3 horas finais do ciclo escuro), na proporção de um macho para três fêmeas.

Para a comprovação da gestação foram realizados esfregaços vaginais, em cada fêmea, para verificar a presença de espermatozoides e confirmar a prenhez, sendo que o dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia zero da gestação (Gd0). O esfregaço foi realizado com o auxílio de uma micropipeta, através da lavagem vaginal com 50 µL de água destilada e posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica (aumento 200x). As ratas em que foi confirmada a prenhez foram separadas e distribuídas entre os grupos de tratamento buscando equaliza-los de acordo com a massa corporal inicial de cada rata.

Os acasalamentos foram repetidos diariamente até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização dos experimentos (15 fêmeas por grupo). As fêmeas prenhas foram mantidas em caixas coletivas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm), em número de no máximo três por caixa, e postas individualmente no 20º dia de gestação quando foi finalizado o período de exposição ao clorpirifós.

3.4 OS GRUPOS E SEUS TRATAMENTOS

Todos os tratamentos foram feitos por via oral (gavagem). As administrações foram preparadas diariamente, sempre feitas no mesmo período da manhã. As doses eram compostas pela droga de exposição (clorpirifós ou PTU) diluídos em uma solução de salina a 0,9% mais Tween20 (1mg/ml). A dose foi calculada previamente para cada grupo com concentração adequada onde o volume utilizado não ultrapassasse 3 ml/kg a ser ingerido por gavagem.

As doses dos tratamentos deste projeto foram assim definidas:

Grupo A (dose 0,01): clorpirifós 0,01 mg/kg/dia – IDA para humanos

Grupo B (dose 0,1): clorpirifós 0,1 mg/kg/dia – IDA x 10

Grupo C (dose 1): clorpirifós 1,0 mg/kg/dia – IDA X 100

Grupo D (dose 10): clorpirifós 10 mg/kg/dia – IDA X1000

Grupo E (controle veículo): salina + Tween20

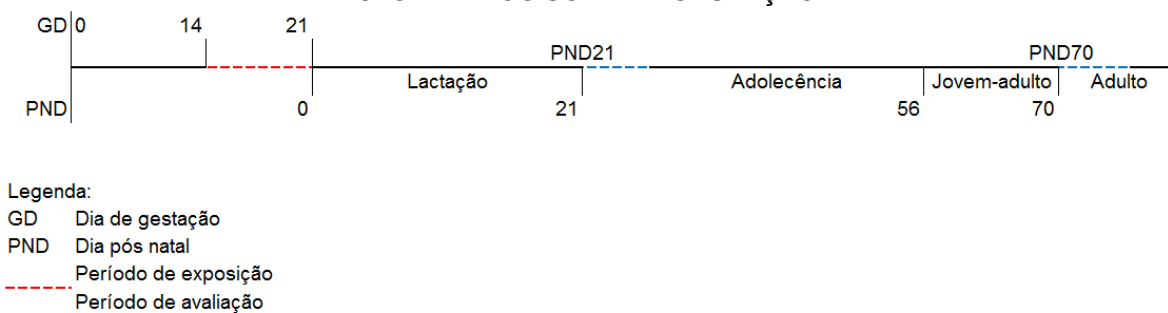
Grupo F (controle positivo): PTU 10 mg/kg/dia

A medida que a prenhez foi confirmada, as ratas foram separadas em no máximo três animais por caixa com equalização das massas corporais iniciais e permaneceram juntas até o fim do tratamento (Gd20).

Os tratamentos foram realizados entre o 14^o e o 20^o dia de gestação (figura 8), por via oral (gavagem), uma vez ao dia e sempre no período da manhã. Tal período de exposição foi estipulado devido ao fato da atividade tireoidiana, dos filhotes em gestação, ter início no 16^o dia (Parlato *et al.*, 2004; Fagman e Nilsson, 2010).

O dia do parto foi considerado como primeiro dia pós-natal (PND0), e os filhotes permaneceram com a mãe durante todo o período de lactação e foram desmamados no 21^o dia pós-natal (PND21). Após o nascimento a diferenciação dos filhotes nas caixas foi feita através de marcas coloridas na base da cauda.

FIGURA 8 - DESENHO EXPERIMENTAL PARA EXPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CLORPIRIFÓS SOBRE A GESTAÇÃO



Desenho experimental para formação dos grupos. Período de exposição de 14-21 dias de gestação para enquadrar os períodos críticos para o desenvolvimento do sistema nervoso central e a maturação da tireoide fetal. Avaliações (PND21 e PND70) escolhidas por representarem momentos críticos no desenvolvimento sócio/afetivo do filhote.

3.5 PERÍODOS DE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

A toxicidade sistêmica causada por uma substância pode ser avaliada por meio da determinação das massas relativas de órgãos, que por sua vez estão relacionadas aos efeitos na massa corporal animal. Alterações na massa absoluta dos órgãos indicam possíveis efeitos tóxicos morfofuncionais.

A massa corporal de cada progenitora foi registrada a cada dia desde o início da gestação (GD1) até o fim da lactação (PND21). Durante esse período foi anotada a presença de sinais que indicassem toxicidade (perda de peso, piloereção, tremores, salivação, diarreia, convulsões, etc.). A partir do 18º dia de gestação (GD18) cada fêmea foi examinada diariamente (início da manhã) para averiguar o nascimento dos filhotes, registrando o tempo de gestação.

Para obtenção de dados da gestação e da lactação, vide tabela 2 abaixo, foram registrados: o número de gestantes por grupo, dias de gestação, número de implantações, perdas pós implante, peso médio dos filhotes, relação mães/filhotes, total de filhotes nascidos por grupo, natimortos, relação filhotes machos/fêmeas (razão sexual) e eventos de canibalismo.

No sexto dia pós-natal (PND6) foi feita a sexagem dos filhotes e foram mantidos todos na mesma caixa com a progenitora. A sexagem foi feita pela visualização da distância anogenital.

No dia do desmame, as progenitoras foram sacrificadas por decapitação e então extraídos e pesados dos órgãos: fígado, baço, rins e útero para avaliação da massa e o útero foi extraído para a contagem do número de implantações uterinas e registro de perdas pós-implantação.

As progenitoras que não pariram até o 26º dia de gestação foram sacrificadas e feita a avaliação do útero para a presença de implantações uterinas.

3.6 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

3.6.1 Peso ao nascer e massas corporal e relativa de órgãos

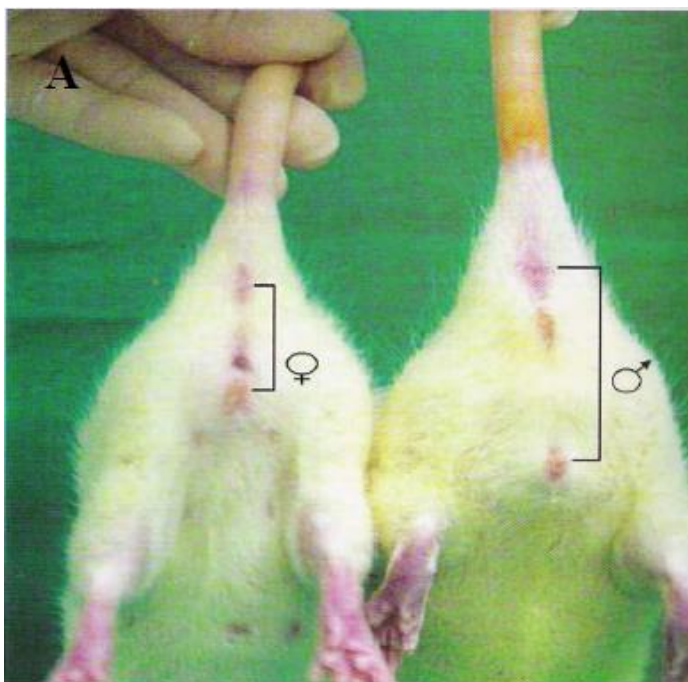
No dia do nascimento (PND0), os animais foram pesados e a prole foi contada. O acompanhamento da massa corporal dos filhotes machos e fêmeas foi realizado nos dias 0, 7, 14, 21, para o período de lactação e nos dias 28, 42, 56 e 70 para o período infante-juvenil. Este parâmetro serviu para avaliar o desenvolvimento corporal da prole e também identificar diferenças de taxa de crescimento entre machos e fêmeas.

Uma metade da parte da progênie foi sacrificada nos dias PND 21 e a outra metade em PND70, e em cada momento foram feitas a retirada e pesagem dos órgãos: cérebro, fígado, rins, baço, testículos e útero após a eutanásia. Para esses órgãos foram calculadas as massas absolutas e relativas (expressos percentualmente em relação à massa corporal) (tabela 3). Nestes períodos foi coletado material biológico para a dosagem da atividade da enzima acetilcolinesterase e para histologia da tireoide.

3.6.2 Distância anogenital

A distância anogenital (figura 9) é uma medida antropométrica muito útil para avaliar a influência de substâncias androgênicas ou estrogênicas, tanto em animais quanto em humanos (Liu *et al.*, 2014). As medidas foram realizadas com o auxílio de um paquímetro a partir do PND3 até o PND20 sempre com a medida sendo feita em triplicata para cada filhote e anotada a média dos valores.

FIGURA 9 - DISTÂNCIA ANOGENITAL, FÊMEAS (ESQUERDA) E MACHOS (DIREITA).



Representação sobre as diferenças entre as distâncias anogenitais entre fêmeas e machos de ratos Wistar. Machos apresentam a distância anogenital maior quando comparados as fêmeas.

3.6.3 Descida dos testículos à bolsa escrotal

A descida dos testículos à bolsa escrotal é um fenômeno relacionado ao sexo e regulado pela ação de hormônios androgênicos. A partir do PND14 os machos foram avaliados quanto ao momento da descida bilateral dos testículos à bolsa escrotal, sendo feito o levantamento através da palpação diária. A separação prepucial completa (figura 10) foi observada a partir do PND33. A variação nos dias para a ocorrência da separação prepucial pode indicar alteração nas vias hormonais relacionadas a androgenicidade do animal.

FIGURA 10 - RETRAÇÃO MANUAL DO PREPÚCIO DE UM RATO COM SEPARAÇÃO PREPUCIAL COMPLETA



Figura ilustrativa demonstrando a retração completa do prepúcio em ratos Wistar.

3.6.4 Abertura do canal vaginal

A abertura do canal vaginal é um fenômeno relacionado ao sexo e dependente da ação hormonal estrogênica durante o período fetal. As fêmeas foram observadas diariamente a partir do 30º dia sobre a abertura do canal vaginal. O atraso da abertura poderia indicar deficiência de hormônios estrogênicos, bem como, o adiantamento mostraria uma sobre alimentação das vias hormonais.

3.6.5 Atividade da acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase é uma glicoproteína que faz parte de uma família bioquímica denominada de colinesterases cuja função é atuar na degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) finalizando o impulso gerado pela liberação de acetilcolina na fenda sináptica em conexões do sistema nervoso central (SNC). A acetilcolina é um neurotransmissor pré-sináptico encontrado no SNC e também em junções neuromusculares no sistema nervoso periférico.

A análise da acetilcolinesterase foi baseada na literatura no método de Ellman et al. (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Os cérebros dos animais foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄, K₂HPO₄) 0,1M, pH 7,5, diluição 1:10 peso/volume, centrifugados a 10.100 x g a 4 °C

por 20 minutos. As alíquotas de sobrenadante foram utilizadas para realização da análise.

Em microplaca foi adicionado 50 uL do sobrenadante diluído 1:5, 200 uL de DTNB 0,75 mM, 50 ul de ATC 10 mM. A seguir foi medida a absorbância a 405 nm durante 4 minutos a cada 30 segundos em espectrofotômetro Synergi HT. A atividade da acetilcolinesterase foi expressa em $\text{nmol. min}^{-1}.\text{mg de proteína}^{-1}$.

3.6.6 Histologia da tireoide

Para avaliação de possível lesão causada pelo clorpirifós às estruturas da tireoide, material histológico foi preparado e analisado junto ao Departamento de patologia do hospital veterinário da UFPR.

Amostras foram coletadas de filhotes machos e fêmeas dos grupos de tratamento nos momentos PND21 e PND70.

A tireoide foi retirada após a decapitação dos animais. Cada amostra foi colocada em meio com fixador Metacam. Após a fixação inicial a solução fixadora foi substituída por etanol 70%, e posteriormente as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol e xilol: etanol 80% (1 hora 30 minutos); etanol 90% (1 hora e 30 minutos); etanol 95% (1 hora e 30 minutos); etanol absoluto (três tempos de 30 minutos); xilol: etanol (1:1; 12 horas na geladeira); xilol absoluto (2 tempos de 20 minutos e um tempo de 5 minutos). Após a desidratação as peças foram impregnadas em parafina (Histosec - Merck, Alemanha) durante três horas a 56 °C, e emblocadas na temperatura ambiente. Os blocos foram cortados em fragmentos com três micrômetros de espessura (Micrótomo Leica RM 2145, Alemanha) e corados com hematoxilina e eosina para posterior análise histológica.

3.6.7 Análise estatística

Para a avaliação estatística dos grupos a normalidade entre os valores que compõem os grupos de tratamento foi utilizado o teste de D'Agostino & Pearson. Quando definido como grupos com valores paramétricos foi utilizado o teste ANOVA de uma via para a análise de variância dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle seguido pelo pós-teste de Dunnett's. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ou em valores percentuais no caso das massas relativas dos órgãos.

4 RESULTADOS

Os resultados aqui descritos estão relacionados aos materiais e métodos do desenvolvimento da gestação e ao desenvolvimento corporal da prole. A descrição de resultados e a discussão referente ao desenvolvimento comportamental estão relacionadas nos artigos que compõem essa tese.

O desenvolvimento corporal das progenitoras foi avaliado a partir do ganho de massa corporal (GMC) ao final dos períodos de gestação (Gd21) e ao final da lactação (PND21), conforme indicado na tabela 1.

As avaliações das massas relativas de órgãos das mães bem como os parâmetros de gestação foram utilizadas para identificar possíveis modificações gestacionais relacionadas aos tratamentos com clorpirifós. Na tabela 1 é possível observar um GMC menor para as progenitoras do grupo CPF 10 em comparação ao grupo controle. Todos os outros parâmetros se mostraram semelhantes entre os grupos.

4.1 AVALIAÇÃO DOS DESCENDENTES

4.1.1 Peso ao nascer e massas corporal e relativa de órgãos

O GMC dos filhotes durante a gestação é refletido no peso ao nascer (tabela 2). O peso ao nascer da prole foi semelhante entre os grupos de tratamento e o grupo controle (tabela 1), não sendo observado sinais de toxicidade.

Na tabela 2 foram colocados os valores referentes a massa corporal e relativa dos órgãos dos filhotes, separados por sexo e por período. Foi observado apenas no grupo CPF 10 machos em PND70 que a massa corporal média foi maior que a do grupo controle. Este ponto foi melhor descrito no artigo 1.

4.1.2 Distância anogenital

A distância anogenital (DAG) começou a ser avaliada no 3º dia pós-natal com auxílio de um paquímetro digital e continuou sendo medida de quatro em quatro dias até o 19º. As médias foram comparadas pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett (tabela 3). Em nenhuma comparação dos grupos de tratamentos com o respectivo grupo controle foi averiguado diferenças estatísticas.

TABELA 1 - MASSA CORPORAL E DE ÓRGÃOS DAS MÃES NA GESTAÇÃO E NA LACTAÇÃO E PARÂMETROS DE GESTAÇÃO.

	Controle	PTU	Clorpirifós (mg/kg/dia)			
			0,01	0,1	1,0	10
Massa Corporal e de Órgãos						
Ao final da gestação (GD21) (g)	298 ± 31,7	326 ± 32,5	309 ± 25,6	322 ± 19,5	315 ± 25,4	275 ^a ± 23,7
Ao final da lactação (PND21) (g)	274 ± 21,8	279 ± 23,2	274 ± 18,3	276 ± 14,2	277 ± 13,1	253 ^a ± 17,5
Fígado*	5,08 ± 0,47	5,17 ± 0,30	5,30 ± 0,41	5,41 ± 0,47	5,24 ± 0,59	5,04 ± 0,75
Baço*	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,03
Rins*	0,39 ± 0,14	0,39 ± 0,15	0,36 ± 0,10	0,44 ± 0,16	0,41 ± 0,15	0,45 ± 0,15
Útero*	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,05	0,13 ± 0,06	0,17 ± 0,09
Parâmetros de Gestação						
Número de gestantes	11	12	12	13	14	14
Dias de gestação	21,3 ± 0,65	21,2 ± 0,39	21,6 ± 0,67	21,8 ± 1,01	22,1 ± 0,95	22,1 ± 1,49
Número de implantações	10,8 ± 1,53	10,5 ± 1,63	9,50 ± 1,62	10,4 ± 1,98	10,8 ± 2,39	9,80 ± 2,01
Perda pós-implante (%)	14,4 ± 0,13	13,7 ± 0,16	6,45 ± 0,06	8,45 ± 0,13	11,8 ± 0,17	18,6 ± 0,20
Peso médio dos filhotes (g)	6,02 ± 0,79	6,27 ± 0,65	5,87 ± 0,67	6,38 ± 0,69	6,34 ± 0,55	5,62 ± 0,62
Relação mães/filhotes (média)	8,91	9,25	8,83	9,54	9,46	7,6
Total filhotes nascidos	97	111	106	124	123	114
Natimortos	1	1	2	1	2	2
Relação filhotes machos/fêmeas	0,82	0,77	0,90	0,90	1,41	0,62
Eventos de canibalismo	2/11 (18%)	1/12 (8%)	1/12 (8%)	1/13 (7%)	3/14 (21%)	3/14 (21%)

Valores expressos por média ± desvio padrão. Os valores dos parâmetros com * são relativos a massa corporal total das mães ao final do período de lactação (PND21). PTU = Propiltiouracil, administrado durante o tratamento na dose de 10 mg/k/dia. ^a = difere do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA seguida de Dunnett.

TABELA 2 – MASSAS CORPORAL E RELATIVA DE ÓRGÃOS DOS FILHOTES AO FINAL DAS FASES DE LACTAÇÃO (PND21) E INFANTO-JUVENIL (PND70) COMO PARÂMETROS DE TOXICIDADE

	Controle	PTU	Clorpirifós (mg/kg/dia)			
			0,01	0,1	1	10
Machos PND21						
Massa corporal	35,8 ± 4,60	33,4 ± 1,58	39,0 ± 7,03	39,4 ± 5,13	38,0 ± 4,35	42,3 ± 6,22
Fígado	3,73 ± 0,23	4,80 ± 1,38	3,67 ± 0,19	3,54 ± 0,18	3,68 ± 0,32	3,99 ± 0,41
Rins	0,50 ± 0,04	0,60 ± 0,12	0,48 ± 0,03	0,52 ± 0,06	0,50 ± 0,04	0,54 ± 0,07
Testículos	0,29 ± 0,05	0,52 ± 0,06	0,27 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,06
Cérebro	3,88 ± 0,63	3,95 ± 0,35	3,49 ± 0,53	3,44 ± 0,46	3,57 ± 0,29	3,41 ± 0,59
Baço	0,38 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,38 ± 0,05	0,40 ± 0,08	0,42 ± 0,03	0,48 ± 0,11
Machos PND70						
Massa corporal	231 ± 13,9	239 ± 32,0	242 ± 22,8	252 ± 9,44	252 ± 36,2	258^a ± 12,6
Fígado	4,33 ± 0,27	4,17 ± 0,13	4,36 ± 0,39	4,37 ± 0,39	4,09 ± 0,23	3,98 ± 0,31
Rins	0,37 ± 0,06	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,03
Testículos	0,61 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,59 ± 0,08	0,60 ± 0,05	0,56 ± 0,05	0,54 ± 0,05
Cérebro	0,68 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,67 ± 0,05	0,71 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,65 ± 0,04
Baço	0,27 ± 0,08	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,17	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,24 ± 0,02
Fêmeas PND21						
Massa corporal	35,0 ± 5,57	36,0 ± 2,62	34,8 ± 8,46	37,8 ± 6,56	37,6 ± 6,69	37,0 ± 6,58
Fígado	3,74 ± 0,26	4,83 ± 1,33	3,64 ± 0,29	3,49 ± 0,33	3,49 ± 0,20	3,89 ± 0,28
Rins	0,53 ± 0,03	0,59 ± 0,08	0,51 ± 0,03	0,50 ± 0,04	0,50 ± 0,05	0,51 ± 0,04
Útero	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Cérebro	3,79 ± 0,29	3,73 ± 0,27	3,89 ± 0,96	3,41 ± 0,05	3,46 ± 0,48	3,51 ± 0,43
Baço	0,44 ± 0,09	0,50 ± 0,09	0,71 ± 0,04	0,36 ± 0,09	0,35 ± 0,05	0,40 ± 0,08
Fêmeas PND70						
Massa corporal	172 ± 17,6	170 ± 18,1	169 ± 13,0	173 ± 9,90	176 ± 7,57	171 ± 16,0
Fígado	4,25 ± 0,33	4,04 ± 0,30	4,57 ± 0,37	4,24 ± 0,28	4,04 ± 0,31	4,26 ± 0,11
Rins	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,36 ± 0,00	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,03
Útero	0,14 ± 0,14	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,21 ± 0,07	0,22 ± 0,02	0,17 ± 0,02

						continuação
Cérebro	0,95 ± 0,08	0,93 ± 0,09	0,94 ± 0,10	0,86 ± 0,11	0,78 ± 0,12	0,95 ± 0,04
Baço	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,32 ± 0,08	0,27 ± 0,03	0,49 ± 0,11	0,27 ± 0,03

As massas corporais e dos órgãos estão expressas em porcentagem (%), sendo indicado o valor da média ± desvio padrão. PTU = Propiltiouracil administrado em 10 mg/kg/dia de tratamento. ^a = difere do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA seguida de Dunnett.

TABELA 3 – DISTÂNCIA ANOGENITAL DA PROLE AVALIADA DURANTE A LACTAÇÃO

	Controle	Clorpirifós (mg/kg/dia)				
		0,01	0,1	1	10	
Machos						
Dia 3	1,98 ± 0,47	2,12 ± 0,19	2,18 ± 0,22	2,08 ± 0,17	2,41 ± 0,23	
Dia 7	2,64 ± 0,40	2,45 ± 0,06	2,30 ± 0,53	2,55 ± 0,18	2,76 ± 0,19	
Dia 11	2,60 ± 0,18	2,76 ± 0,31	2,56 ± 0,39	2,39 ± 0,28	2,73 ± 0,11	
Dia 15	3,33 ± 0,27	3,02 ± 0,15	3,02 ± 0,52	3,05 ± 0,13	3,44 ± 0,33	
Dia 19	3,69 ± 0,70	3,27 ± 0,21	3,85 ± 0,27	3,85 ± 0,22	3,90 ± 0,22	
Fêmeas						
Dia 3	1,16 ± 0,08	1,20 ± 0,14	1,21 ± 0,14	1,12 ± 0,07	1,24 ± 0,15	
Dia 7	1,49 ± 0,19	1,44 ± 0,12	1,55 ± 0,22	1,34 ± 0,13	1,60 ± 0,22	
Dia 11	1,83 ± 0,16	1,95 ± 0,13	1,96 ± 0,21	1,67 ± 0,04	1,89 ± 0,19	
Dia 15	2,28 ± 0,21	2,29 ± 0,19	2,32 ± 0,20	2,19 ± 0,17	2,36 ± 0,20	
Dia 19	2,72 ± 0,23	2,61 ± 0,17	2,59 ± 0,15	2,67 ± 0,22	2,79 ± 0,15	

Avaliação da distância anogenital (mm) de machos e fêmeas no período da lactação (PND 0-21) com valores expressos em média ± desvio padrão da média. ANOVA seguida de Dunnett.

4.1.3 Descida dos testículos à bolsa escrotal

Após a avaliação das médias dos tempos em dias para a descida dos testículos à bolsa escrotal, não foram observadas diferenças entre os grupos de tratamento com clorpirifós e o grupo controle para esse parâmetro.

4.1.4 Abertura do canal vaginal

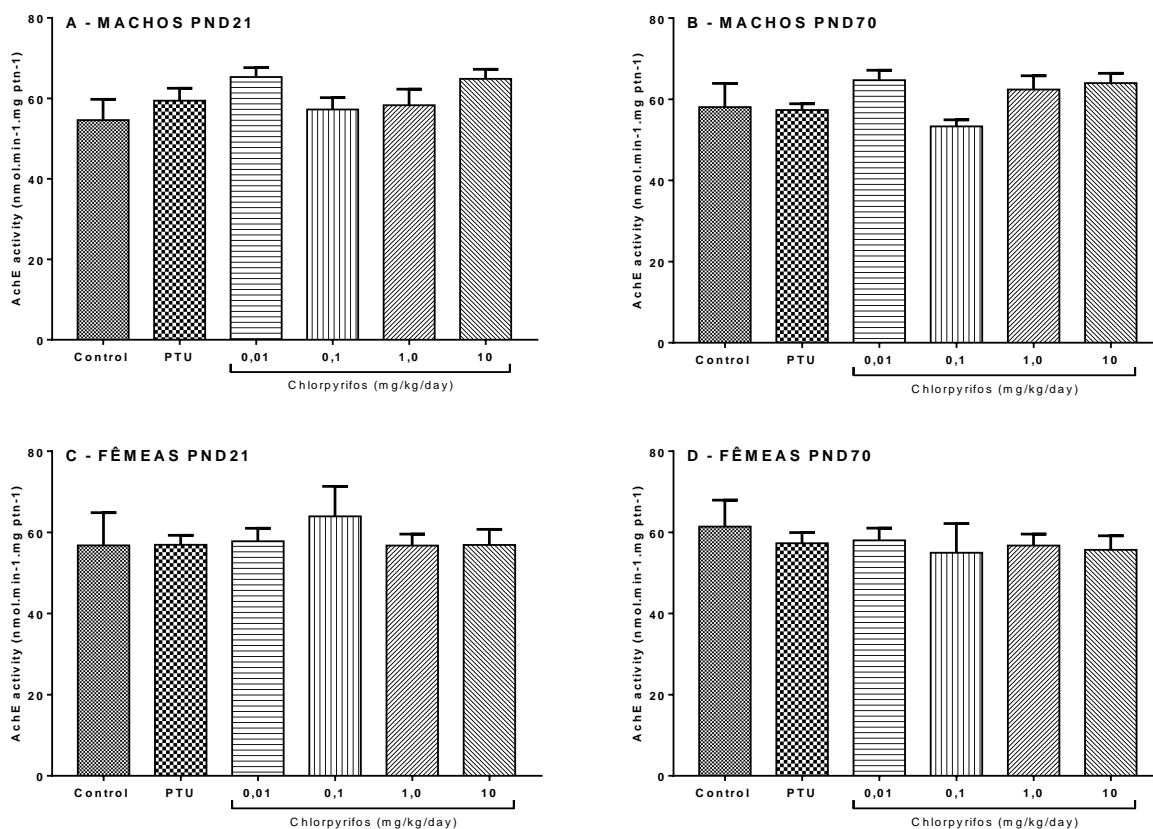
Após a avaliação das médias dos tempos em dias para a abertura do canal vaginal, não foram observadas diferenças entre os grupos de tratamento com clorpirifós e o grupo controle para esse parâmetro.

4.1.5 Atividade da acetilcolinesterase

Foram medidos os níveis de AChE cerebral nos filhotes (machos e fêmeas) nos períodos PND21 e PND70. A média do nível de AChE ativa de cada grupo clorpirifós e do grupo PTU foi comparado com a média do grupo controle por meio da ANOVA seguido o pós-teste de Dunnett's. A normalidade dos grupos foi avaliada pelo teste D'Agostino & Pearson. A significância estatística entre os grupos foi considerada por $p < 0,05$. Os resultados estão indicados no gráfico 1 abaixo.

A avaliação estatística dos machos em PND21 (gráfico 1A) e em PND70 (gráfico 1B) não indicou diferenças entre os grupos de tratamento clorpirifós, o grupo PTU em relação ao grupo controle, [F (5,66) =1,63 $p=0,1652$] e [F (5,31) = 0,318 $p=0,898$] respectivamente. Os gráficos 1C e 1D indicam os resultados para as fêmeas em PND21 e PND70 respectivamente. A avaliação dos dados para as fêmeas não indicou diferenças estatísticas entre os grupos de tratamento quando comparados ao grupo controle. Em PND21 [F (5,63) = 1,93; $p=0,102$] e PND70 [F (5,32) = 0,244; $p=0,939$].

GRÁFICO 1 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL



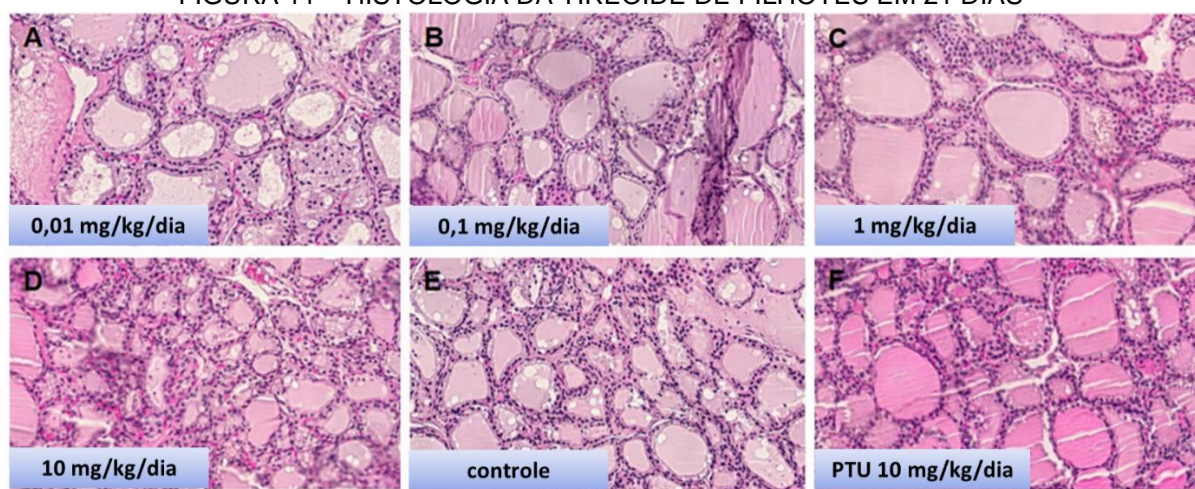
Avaliação dos níveis de atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral em animais com exposição ao clorpirifós durante a gestação. Todos os grupos de exposição foram comparados ao grupo controle por ANOVA seguida do pós-teste de Dunnett.

4.1.6 Histologia da tireoide

A histologia das tireoides foi realizada seguindo a técnica de coloração por hematoxilina-eosina. Após a avaliação da morfologia das estruturas que compõem a tireoide não foi verificado nenhuma alteração que indicasse lesão tecidual ou

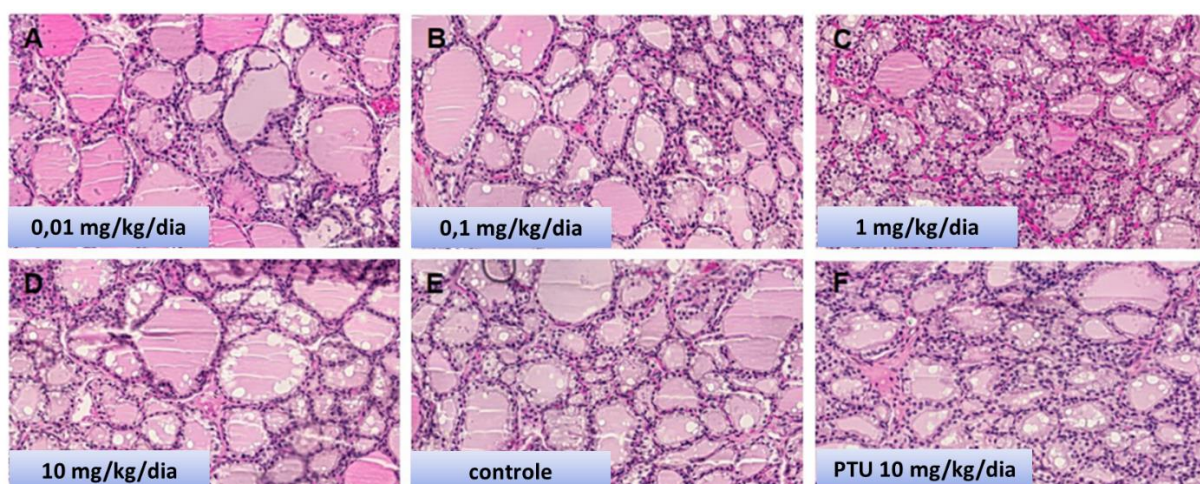
destruição celular que comprometesse o funcionamento. No geral, a estrutura das células foliculares da tireoide apresenta volume próprio. A apresentação dos folículos com volumes variados em todas as amostras histológicas é compreensível devido a tireoide apresentar um funcionamento de escala, onde os hormônios tireoidianos são pré-sintetizados no folículo e depois distribuídos por exocitose pelas células foliculares.

FIGURA 11 – HISTOLOGIA DA TIREOIDE DE FILHOTES EM 21 DIAS



Avaliação histomorfológica de tireoide de filhotes machos e fêmeas em PND21.

FIGURA 12 – HISTOLOGIA DA TIREOIDE DE FILHOTES EM 70 DIAS



Avaliação histomorfológica de tireoide de filhotes machos e fêmeas em PND70.

4.2 ARTIGOS DA TESE

4.2.1 Artigo 1: Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy

Este artigo aborda a capacidade do clorpirifós em causar transtorno de ansiedade em ratos machos lactantes. O artigo foi aceito para publicação no periódico *Neuroscience Letters*.



Research article

Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy

Jonas G. Silva^{a, b},  , Ana C. Boareto^b, Anne K. Schreiber^b, Daiany D.B. Redivo^b, Eder Gambeta^b, Fernanda Vergara^b, Helen Morais^b, Janaína M. Zanoveli^b, Paulo R. Dalsenter^b

 [Show more](#)

<http://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.053>

[Get rights and content](#)

Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy

Jonas G. Silva^{a,b*}, Ana C. Boareto^b, Anne K. Schreiber^b, Daiany D. B. Redivo^b, Eder Gambeta^b, Fernanda Vergara^b, Helen Moraes^b, Janaína M. Zanoveli^b, Paulo R. Dalsenter^b

^a *Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, Paraná 81280-340, Brazil*

^b *Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná 81540-990 Brazil*

*Corresponding author at: Laboratory of Reproductive Toxicology, Department of Pharmacology, Federal University of Parana, P.O. Box 19031, Curitiba, Paraná 81540-990, Brazil.

Fax: +55 41 3361 1716.

Email: jonasgolart@gmail.com

Abstract

Chlorpyrifos is a pesticide, member of the organophosphate class, widely used in several countries to manage insect pests on many agricultural crops. Currently, chlorpyrifos health risks are being reevaluated due to possible adverse effects, especially on the central nervous system. The aim of this study was to investigate the possible action of this pesticide on the behaviors related to anxiety and depression of offspring rats exposed during pregnancy. Wistar rats were treated orally with chlorpyrifos (0.01, 0.1, 1 and 10 mg/kg/day) on gestational days 14-20. Male offspring behavior was evaluated on post-natal days 21 and 70 by the elevated plus-maze test, open field test and forced swimming test. The results demonstrated that exposure to 0.1, 1 or 10 mg/kg/day of chlorpyrifos could induce anxiogenic-like, but not depressive-like behavior at post-natal day 21, without causing fetal toxicity. This effect was reversed on post-natal day 70.

Keywords: Chlorpyrifos, Wistar rats, anxiety-like behavior, fetal toxicity, pregnancy

Highlights

- Chlorpyrifos induces anxiogenic-like effects in male offspring.
- Chlorpyrifos did not induces depressive-like effects in male offspring.
- Fetal neurodevelopment might be affected by chlorpyrifos exposure.

1. Introduction

Organophosphates are the most widely used pesticide class in crop protection and pest control worldwide (Burns *et al.*, 2013). Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) ester phosphorothioic acid) is an organophosphate whose great chemical stability and environmental persistence make it a first choice pesticide (Richardson *et al.*, 1993). Furthermore, chlorpyrifos (CPF) is a broad spectrum pesticide with wide applicability and relative safety to other organophosphates, which has led to its extensive use in agriculture (Slotkin, 2004). Indirect exposure to Chlorpyrifos (CPF) can occur through dieting, in both fresh and industrialized food (Li *et al.*, 2015). According to the US Environmental Protection Agency (EPA), the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) of CPF for an acute dietary exposure for inhibition of red blood cell cholinesterase is 0.5 mg/kg/day (Smegal, 2000; Epa, 2013).

The main mechanism of CPF's acute neurotoxic effects is through acetylcholinesterase (AChE) inhibition and consequent cholinergic hyperstimulation. However, increasing evidence indicates that CPF exerts neurotoxicity at low doses with mechanisms different from those observed at higher doses (Eaton *et al.*, 2008; Slotkin e Seidler, 2012). It has also been suggested that CPF affects liver (Buratti *et al.*, 2011; Uzun e Kalender, 2013); thyroid (De Angelis *et al.*, 2009); behavior (Levin *et al.*, 2002; Slotkin *et al.*, 2013) and reproduction (Breslin *et al.*, 1996; Nishi e Hundal, 2013) even at levels below toxicity guidelines.

The ability to metabolize CPF appears to be age-dependent in rats, with inferior detoxification in lactating individuals due to their lower metabolic maturity (Vidair, 2004; Eaton *et al.*, 2008). Thus, exposure to CPF during pregnancy is a critical situation, because the fetuses are a particularly vulnerable subpopulation to chemical contaminants (Timchalk *et al.*, 2006). During pregnancy the fetal neurodevelopment is a complex phenomenon that involves several mechanisms and follows a peculiar logic of construction, and gestational exposure to CPF impairs neuronal differentiation, synaptogenesis and gene expression in rats (Crumpton *et al.*, 2000). The rapid development of fetal and infant brain architecture and circuitry is susceptible to exposure to pesticides (Garcia *et al.*, 2005) – even more so when the ability that pesticides have to cross the placental barrier and enter the amniotic fluid (Bradman *et al.*, 2003), including CPF (Lassiter *et al.*, 1997; Lassiter *et al.*, 1998), is considered.

Cell differentiation, plasticity and synapses are variables subject to changes by exposure to pesticides such as CPF (Connors *et al.*, 2008).

Studies indicate that organophosphates reduce the neurobehavioral performance and the AchE levels in the serum on the neurodevelopment of children exposed environmentally (Abdel Rasoul *et al.*, 2008). Exposure during pregnancy leads to a higher risk of delay in mental and motor development, and to a higher incidence of disorders such as Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) (Rauch *et al.*, 2012). A previous study has linked prenatal exposure to CPF to a lower weight and smaller head circumference at birth (Whyatt *et al.*, 2004).

It is recognized that the last third of the gestation period is critical for neurogenesis [12]. Brain regions such as the hippocampus and the neocortex develop promptly during this period (Smart, 2008). The perinatal period presents an intense activity of cerebral circuitry involved with the development and maintenance of appropriate mouse social behavior (Garcia *et al.*, 2005). Studies on the exposure to CPF during the gestational period show that it features the ability to influence an important neurotransmitter system associated with anxiety modulation – the serotonergic system (Slotkin *et al.*, 2006; Timofeeva *et al.*, 2008) – in addition to cholinergic system (Slotkin e Seidler, 2015). Thus, it is suggested that CPF is able to induce modifications related to the emotional behavior in the offspring (Venerosi *et al.*, 2015).

Therefore, a new set of relevant mechanisms to the neurotoxicity of CPF, without acting on AChE and in lower doses, promotes great interest in the issue of the security of organophosphates (Slotkin, 2004). However, there is little data on the effects of CPF exposure only during pregnancy on the neurodevelopment of the offspring, and on whether these possible effects on the brain circuitry remain during childhood and adulthood. Thus, exposure to low levels of pesticides such as CPF is a concern to be evaluated in pregnancy. Considering these issues, the aim of the present study was to evaluate if gestational exposure to CPF at low doses could induce anxiogenic-like and/or depressive-like behaviors in male offspring after weaning and young adulthood, through behavioral tests for anxiety and depression.

2. Material and methods

2.1. Animals

Wistar rats were provided by the vivarium of the Federal University of Paraná, and kept under controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C) with a light/dark cycle of 12h, and free access to water and food. Female rats were placed into the male cage, at a ratio of 3:1, for 3 h at the end of the dark period. Mating was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears, and the day on which sperm was detected was considered gestation day 0 (GD 0). Pregnant females were randomly assigned into 5 groups of 11-14 each. Maternal weight was monitored daily during treatment period in gestation (GD14-20) and all animals were observed for clinical signs of toxicity. All experiments with pregnant rats and their litters were conducted in accordance to the rules and laws of the Ethics Committee for Research on Animals at UFPR (CEUA/BIO-UFPR; #758/14). All efforts were made to minimize the number of rats and their suffering.

2.2. Drugs and treatment

Chlorpyrifos analytical standard (Sigma-Germany, CAS 2921-88-2) was purchased from Sigma Aldrich in Brazil. The CPF doses were based on the value of acceptable daily intake (ADI) of 0,01 mg/kg/day according to the C20 monographic report of the Brazilian national health surveillance agency (Anvisa, 2002) and to the OECD - 407 Guidelines (Oecd, 2008).

Experimental groups were distributed as follows: vehicle control; CPF 0.01 mg/kg/day (CPF 0.01); CPF 0.1 mg/kg/day (CPF 0.1); CPF 1 mg/kg/day (CPF 1); CPF 10 mg/kg/day (CPF 10). The animals were treated orally (gavage). The vehicle used for drug administration in all groups was comprised of 9% saline plus Tween20 (0.1mL/mL saline), and the volume administered was 3 mL/kg.

2.3 Pregnancy outcome

The experimental design is shown in Fig. 1. The progenitors were treated from day 14-20 of gestation. The behavior tests were performed on postnatal day 21 (PND21) and postnatal day 70 (PND70).

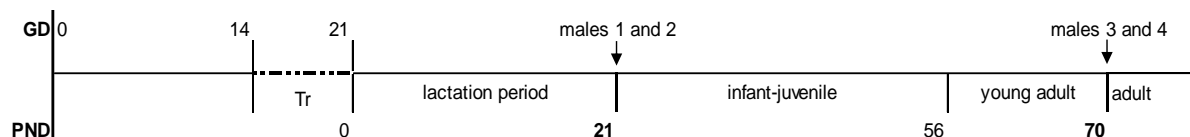


Fig. 1. Experimental design. Treatment with CPF and the control group was made between GD 14-20. After the lactation period PND21, male pups (1 and 2) went through elevated plus-maze test, forced swim and open field. On PND70, the males (3 and 4) went through the same battery of tests. GD (gestation day); PND (post-natal day); Tr (treatment period).

Maternal weight was monitored weekly during lactation. Throughout pregnancy and lactation, animals were observed daily for clinical signs of toxicity related to chemical treatment. The following parameters were evaluated: gestation length, number of implants, post-implantation losses, average weight of offspring, offspring/mother ratio, total live births, pup's stillbirths, and male index in the litter (Table 1). The body mass gain of the mothers was followed during the gestational period of treatment (GD 14-20) (Fig. 2), as well as, weekly, during lactation.

The offsprings were examined macroscopically at birth. The body weight gain of male offspring was evaluated. The dams that did not deliver viable offsprings were killed on GD 24 for observation of the number of implantations and post-implantation losses.

To evaluate the effects of CPF exposure on the offspring behavior, the male offsprings 1 (PND21) and 3 (PND70) were assessed by modified forced swimming test and open field test, while the offsprings 2 (PND21) and 4 (PND70) were assessed by the elevated plus-maze test (Fig. 1) in a number of 8-10 offspring per group.

2.5 Elevated plus-maze (EPM) test

The test was conducted as previously described in the literature (Pellow *et al.*, 1985; Gambeta *et al.*, 2016). On PND21 and PND70, animals were individually placed in the center of the apparatus with the head faced to the open arm, and then they were recorded on camera for 5 minutes. Time spent in the open arms was measured as an indicative of anxiety-like behavior. Animals that fell out of the open arms were excluded.

2.6 Open field test

To evaluate the influence of the CPF on the locomotor activity of the offsprings, the open field model was used as previously described in the literature (Walsh e Cummins, 1976; Santiago *et al.*, 2010). The animal is placed in a rectangular apparatus

(40x50x63 cm) with a division of 9 equal rectangles on the ground. The animal is placed in the center of the apparatus and the number of intersections between these units (crossed rectangles) was evaluated during 5 minutes as a parameter of locomotor activity. After each animal, the apparatus was cleaned with 20% alcohol solution.

2.7 Modified forced swimming test

In order to assess whether the CPF would induce depressive-like behavior, we used the modified forced swimming test (Cryan *et al.*, 2005; Redivo *et al.*, 2016). The test is conducted in two steps, the pre-test and the test. During the pre-test the animal is placed in a cylinder (20 cm diameter x 50 cm height containing 30 cm of water at a temperature of 24 ± 2 °C) during 15 min, and 24 hours after the pre-test, the animal is again exposed to the test apparatus and recorded during 5 minutes. The frequency of predominant behavior (immobility, swimming and climbing) was counted at intervals of 5 seconds. The pre-test was performed on PND20 and PND69, and on PND21 and PND70 the test session was carried. The water was exchanged after each animal.

2.8 Statistical Analysis

The normality of the values within the groups was verified by D'agostino & Pearson test. When appropriate, one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) was used and the data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Dunnett's test was used as a *post hoc* test for multiple comparisons between the groups. A value of $p < 0.05$ was defined as significant.

3. Results

3.1 Pregnancy outcome

Between GD14-20, treatment was conducted in all groups, in the same period of the day. During treatment (GD19-21) (Fig. 2), body mass gain of the mothers for the CPF 10 group was lower than that for the control group. Two-way ANOVA analysis showed that there is statistical interaction on days 19, 20 and 21 [$F(28.413) = 2.4$ $p < 0.05$] (Fig. 2).

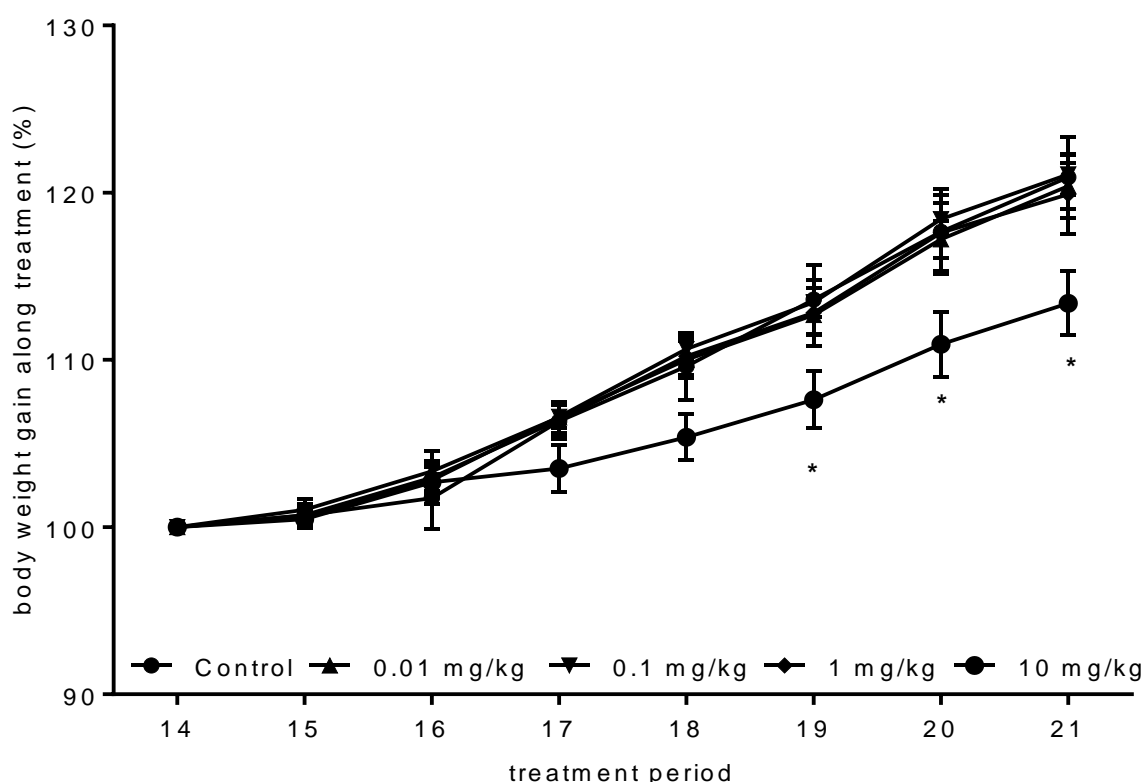


Fig. 2. Body mass gain of mothers throughout the period of CPF treatment during pregnancy. Two-way ANOVA followed by Dunnett's pot-hoc test for multiple comparisons. * Indicates differences between control group and CPF 10 mg/kg/day group ($p < 0.05$).

All parameters evaluated during pregnancy (Table 1) were similar for the treatment and control groups. Only the index of males born per litter in CPF Group 1 was greater than 50% (57.7%).

Table 1 - Pregnancy outcomes

Parameters in pregnancy	Control	CPF (mg/kg/day)			
		0.01	0.1	1	10
Number of dams	11	12	13	13	14
Pregnancy length (days)	21.3 ± 0.65	21.6 ± 0.67	21.8 ± 1.01	22.1 ± 0.95	22.1 ± 1.49
Number of implantation	10.8 ± 1.53	9.50 ± 1.62	10.4 ± 1.98	10.8 ± 2.39	9.80 ± 2.01
Post-implantation loss (%)*	14.4 ± 0.13	6.45 ± 0.06	8.45 ± 0.13	11.8 ± 0.17	18.6 ± 0.20
Average weight of offsprings (g)	6.02 ± 0.79	5.87 ± 0.67	6.38 ± 0.69	6.34 ± 0.55	5.62 ± 0.62
Total live births offsprings	98	106	124	123	107
Ratio total live offsprings/dams	8.91	8.83	9.54	9.46	7.64
Stillbirths	1	2	1	2	2
Male index in the litter (%)*	45.9	47.2	42.7	57.7	41.2

Values are expressed as mean and standard deviation.

* Percentage values regarding the average body weights in final lactation period.

The body development of males was also accompanied throughout the postnatal period with notes every 7 days during lactation and every 14 days along the growth phase until PND70 (Fig. 3). Male body mass gain was significant from PND42 where the CPF 10 group had the greatest mass gain when compared to the control group. Two-way ANOVA analysis showed that there is statistical interaction on evaluation days 42, 56 and 70 [$F(28.322) = 3.51$ $p < 0.05$] (Fig. 3).

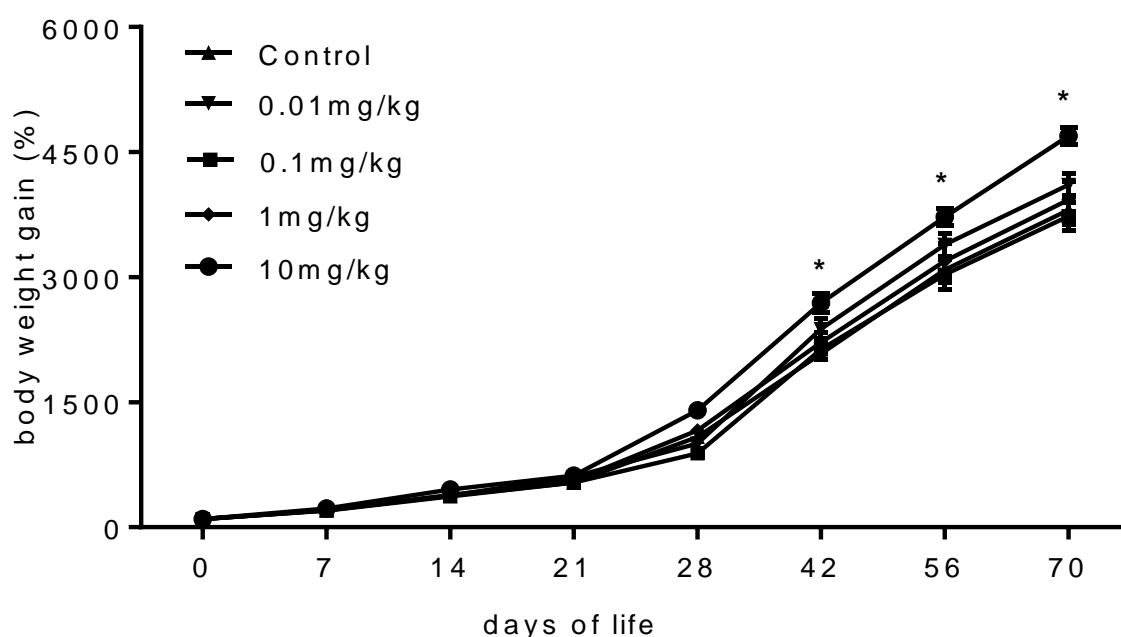


Fig. 3. Body mass gain of males during the lactation period (GD0-21) and the growth phase (PND21-70). Percentage figures from the pups' day of birth are expressed by the mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Dunnett's test for multiple comparisons among groups with $p < 0.05$. * Expresses values statistically different between control group and CPF 10 mg/kg/day.

3.2 Elevated plus-maze (EPM) test

Figure 4 shows a comparison of the percentage of time the animals spent in the open arms of the maze (PND21). One-way ANOVA showed a significant difference between the groups [$F(4.39) = 5.765$ $p < 0.05$]. The *post hoc* test indicated that the exposure to CPF in the doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg/day induced anxiogenic-like behavior in animals at 21 days of life when compared to the control group ($p < 0.05$).

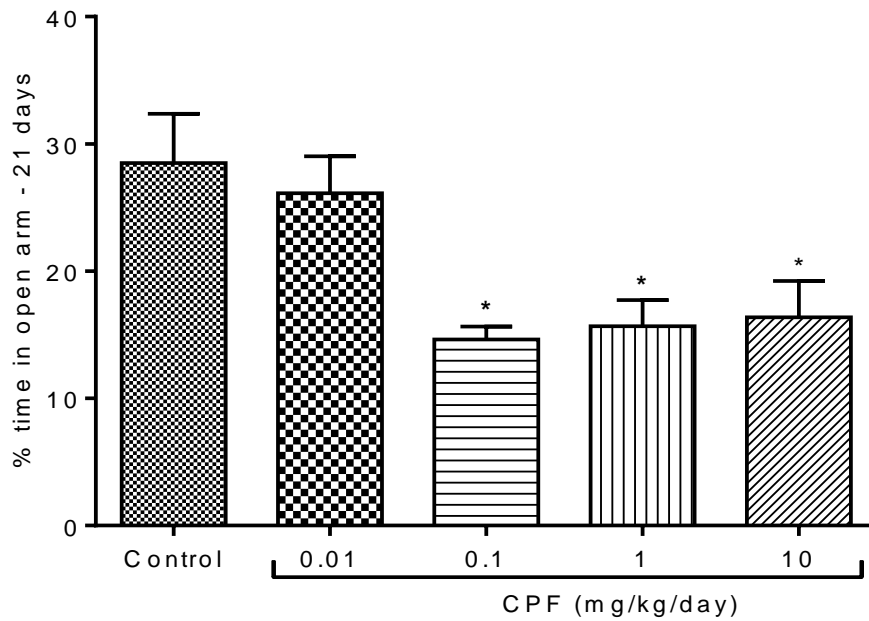


Fig. 4. Percentage of time spent in the open arm of the maze apparatus in high cross with males on PND21. * = $p < 0.05$. ANOVA followed by Dunnett's test.

Figure 5 shows a comparison of the percentage of time the animals spent (PND70) in the open arms of the maze. One-way ANOVA showed a significant difference between the groups [$F(4,39) = 3.39$, $p < 0.05$]; however, there was no difference between the groups when compared to control groups ($p < 0.05$).

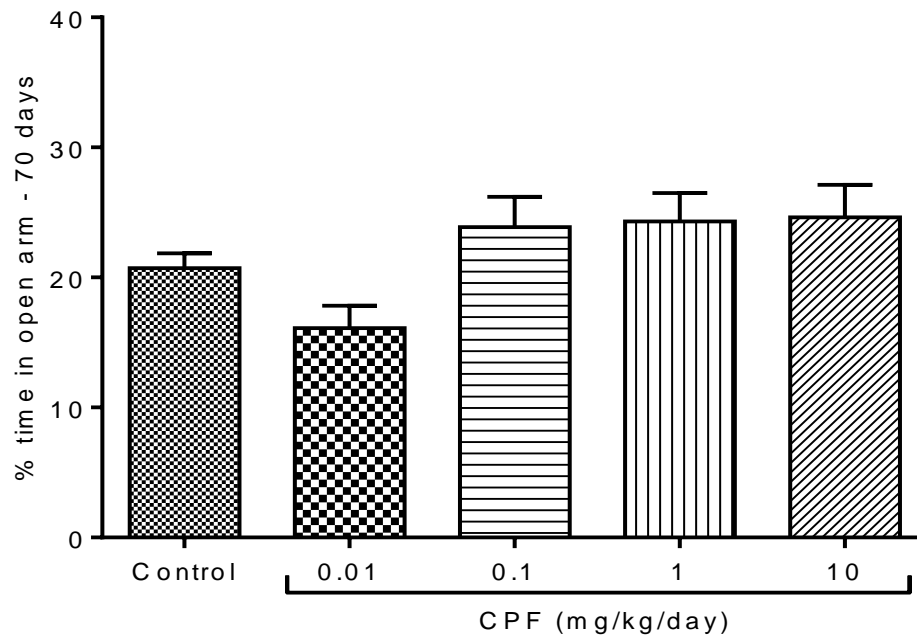


Fig. 5. Time spent in the open arm of the maze apparatus in high cross by males at 70 days of life. One-way ANOVA did not show difference between the control group and CPF groups.

3.3 Open field test

As it can be seen in table 2, one-way ANOVA showed a significant difference between the groups (PND21) [F (4.39 = 54.8) $p < 0.05$]. The Dunnett's *post hoc* test showed a significant difference between 0.1 groups; 1.0 and 10 mg/kg/day when compared to the control group indicating increased locomotor activity. However, no difference was observed between the all groups in PND70 [F (4.39 = 2.92) $p = 0.033$].

3.4 Modified forced swimming test

One-way ANOVA showed a significant difference between the groups when the immobility and climbing frequencies in the PND21 group were evaluated [F (4.39) = 5.5, $p < 0.05$; F (4.39) = 3.0, $p < 0.05$], respectively; see Table 2, but there was no difference when swimming frequency was evaluated [F (4.39 = 0.61) $p < 0.05$]. Interestingly, *post hoc* analysis did not show difference between groups when compared to control groups ($p < 0.05$).

Regarding PND70, one-way ANOVA showed difference between the groups [F (4.39 = 4.44) $p < 0.05$], but *post hoc* test did not show any difference between the frequencies of immobility when compared to control groups ($p < 0.05$). Also, there was no difference between groups when swimming and climbing frequencies were evaluated [F (4.39) = 2.4, $p < 0.05$; F (4.39) = 1.8, $p < 0.05$, respectively]; see Table 2.

Table 2 - Effect of treatments with CPF on parameters of open field test and modified forced swimming test

PND21		Control	CPF 0,01	CPF 0,1	CPF 1	CPF 10
	N	8	10	8	10	8
Locomotor activity						
open field test		30.3 ± 3.43	26.1 ± 3.23	40.6 ± 3.28*	52.1 ± 5.26*	42.3 ± 5.66*
Depressive-like behavior						
immobility frequency		43.5 ± 2.08	45.9 ± 2.54	49.0 ± 1.84	37.0 ± 1.97	48.8 ± 1.96
swimming frequency		4.75 ± 0.59	3.7 ± 0.58	4.13 ± 0.64	4.80 ± 0.74	4.88 ± 0.80
climbing frequency		5.25 ± 0.88	4.50 ± 0.65	4.63 ± 0.98	7.90 ± 0.86	5.25 ± 0.84
PND70		Control	CPF 0,01	CPF 0,1	CPF 1	CPF 10
	N	8	10	8	10	8
Locomotor activity						
open field test		61.0 ± 2.63	58.2 ± 4.77	62.3 ± 5.33	64.1 ± 4.66	59.1 ± 3.28
Depressive-like behavior						
immobility frequency		52.0 ± 1.91	54.5 ± 1.12	48.6 ± 2.87	46.0 ± 2.84	58.8 ± 2.74
swimming frequency		2.00 ± 0.33	2.60 ± 0.26	2.13 ± 0.30	3.00 ± 0.42	1.75 ± 0.25
climbing frequency		3.38 ± 0.18	3.70 ± 0.51	4.75 ± 0.77	5.00 ± 0.70	3.25 ± 0.65

Values were expressed as mean ± SEM with 8-10 animals per group.

* $p < 0.05$ - It was considered significant for statistical analysis between treatment groups and control group. The Dunnett's *post hoc* test.

4. Discussion

The variation in body mass for both mothers and offspring is an indicator of the ability of a toxic influence on pregnancy over body development of the offspring. The dose of 10 mg/kg CPF reduced body mass gain in mothers during treatment (Fig. 2) and increased body weight gain in male offspring from PND42 (Fig. 3), indicating maternal toxicity. For that dose, other authors have indicated apparent maternal toxicity when the treatment occurred during a similar period (GD14-18), showing that this dose is able to reduce the levels of maternal brain cholinesterase (ChE) (Lassiter *et al.*, 1999). The threshold for the occurrence of gestational weight gain reduction appears to be the dose of 5 mg/kg (Garcia *et al.*, 2003). Gestational exposures in doses of 0.01, 0.1 and 1 mg/kg were unable to change the weight gain of the mothers during both pregnancy and lactation period when compared to the control group (data not shown). The pregnancy outcomes investigated are also indicators of the pregnancy evolution, showing no adverse effects on maternal parameters (Table 1). No significant change in the relative weight of liver, kidneys, spleen and brain (mothers and male offspring in PND21 and PND70) was found, suggesting that the doses tested had no influence on these parameters (data not shown).

Differences in the toxicity of CPF between the fetus and the mother have already been reported, showing that for being highly lipophilic the CPF passes easily through the placental barrier (Bradman *et al.*, 2003). However, the lack of placental CYP450 enzymes group and other esterases is important for the conversion of CPF into chlorpyrifos-oxon, which is the most toxic (Timchalk *et al.*, 2006). In this way, the toxicity that was not evidenced in the mother may happen in the fetus.

The evaluation of the male offspring development indicated that all treated groups had a similar body mass gain to the control group until PND42, when the CPF 10 group showed the highest weight gain until the end (PND70). Corroborating with this result, the increased body mass gain of male offspring from PND45 in relation to the control group was observed at a dose of 2.5 mg/kg with maternal exposure to CPF between GD7 and PND21 (Lassiter e Brimijoin, 2008).

In relation to anxiety, previous studies show the ability of the CPF in changing parameters of anxiety-like behavioral [9, 11, 36, 38] with exposures greater than or equal to 1.0 mg/kg. However, our data show that the CPF could induce an anxiogenic-like behavior at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg/day at the end of lactation (PND21) only with maternal exposure (GD14-20) – when the animals spent a shorter period of time

in the open arms when compared to the control group (Fig. 4). The anxiety-like behavior at the dose of 10 mg/kg/day in PND21 (fig. 4) cannot be completely attributed to the CPF for the fact that this group showed maternal toxicity, with reduction of the mothers weight gain during pregnancy (fig. 2).

Interestingly, this anxiogenic-like behavior on PND21 in the CPF 0.1, 1 and 10 groups was not evidenced on PND70, suggesting that neuroplasticity throughout the period of life can positively influence the interference caused by exposure to CPF during the gestational phase.

In fact, Icenogle *et al.* (2004) indicates that exposure to CPF during the period of neurulation (GD9-12) brings locomotor and cognitive impairment but that in the long term the capacity of neuroplasticity can compensate for adverse effects during neurogenesis (Icenogle *et al.*, 2004). Neuroplasticity happens intensively during pregnancy and may suffer the influence of external factors (Sheikhi e Saboory, 2015), but may continue to occur throughout life (Benninghoff *et al.*, 2012; Van Der Kooij *et al.*, 2015), which added to the conditions of socialization with other animals along the stage of adolescence and early young adult stage can lead to the abolition of the anxiety condition, since unlike the socialization, isolation is a catalyst for the development of anxiety in rats (Ieraci *et al.*, 2016).

It is important to highlight that Venerosi *et al.* (2010) (Venerosi *et al.*, 2010) performed a study using a late gestational exposure (GD 14-17) to CPF at the dose of 6 mg/kg, and the animals were evaluated at adulthood. Similarly, to our data obtained from PND70, they also did not observe in CD-1 male mice a significant effect on anxiety levels when these animals were evaluated in another animal test of anxiety – the light-dark exploration test. Corroborating with the possibility of reversing the effect of the CPF in adulthood Abou-Donia *et al.* (2005) [2] exposed Sprague-Dawley rats (GD 4-20) the dose of 1 mg/kg of CPF and observed in PND90 that the offsprings males when evaluated by the test of beam-walk time and incline plane showed no statistical difference in relation to the control.

The increased locomotor activity in open field test in 0.1; 1.0 and 10 mg/kg/day groups observed in PND21 (table 2) can be related to anxiogenic-like behavior, and discards the motor impairment by CPF.

The behavioral responses related to depression were evaluated using the modified forced swimming test (table 2). In both ages of animals - PND21 and PND70 – there was no significant change in the frequencies of immobility, swimming and

climbing in all the dosages applied when compared to control groups. That result corroborates data from Venerosi *et al.* (2010). They have also shown that in adult CD-1 mice exposed to CPF (6 mg/kg) during the late gestational phase (gestational days 14-17) no differences were found between CPF and control mice when they were evaluated in the forced swimming test. Nevertheless, it is important to note that a depressive-like behavior has been reported in previous studies in which animals received the CPF (in different doses) directly by repeated injections (Chen *et al.*, 2011) (Chen *et al.*, 2014).

In our study, doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg/day could induce an anxiogenic-like behavior in males at the end of lactation, without presenting toxicity in the offspring. Thus, gestational exposure to the CPF in the dose of 0.1 mg/kg/day was considered the low observed adverse effect level (LOAEL) for the anxiogenic-like behavior.

Our results showed the ability of the CPF to influence the mechanisms of neurodevelopment over anxiety-like behavior when exposure occurs only during pregnancy, an intense activity period for the constitution of the central nervous system and in low doses not observed in previous studies. Even more, the occurrence of anxiety-like behavior in the initial stage of neuronal maturation (late lactation) can serve as a window for the consolidation of traumatic events in the future.

5. Conclusion

In this study, we showed that exposure to low doses of chlorpyrifos during the gestational period (GD14-20) can trigger a condition of anxiety-like behavior in male Wistar rats at the end of the lactation period. Thus, our data suggest that exposure to chlorpyrifos during pregnancy can promote neurological changes in circuit required for the appropriate perceptual effects in the neurodevelopment of the male offspring.

Conflict of interest statement

The authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

This study was funded by CAPES/CNPQ. The authors would like to thank the Academic Publishing Advisory Center (*Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA* - www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná for assistance with English language editing.

References

ABDEL RASOUL, G. M. et al. Effects of occupational pesticide exposure on children applying pesticides. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 5, p. 833-838, 9// 2008. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X08001290> >.

ANVISA. Índice monográfico C20. <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/C20%2B%2BClorpirif%25C3%25B3s.pdf/f8ddca3d-4e17-4cea-a3d2-d8c5babe36ae>, p. 2, 2002.

BENNINGHOFF, J. et al. The complex role of the serotonin transporter in adult neurogenesis and neuroplasticity. A critical review. **World J Biol Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 240-7, Apr 2012. ISSN 1814-1412 (Electronic) 1562-2975 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22409535> >.

BRADMAN, A. et al. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1779-1782, 2003. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241723/> >.

BRESLIN, W. J. et al. Evaluation of the Developmental and Reproductive Toxicity of Chlorpyrifos in the Rat. **Toxicological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 119-130, January 1, 1996. Disponível em: < <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/29/1/119.abstract> >.

BURATTI, F. M. et al. Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: Biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. **Toxicology**, v. 280, n. 3, p. 98-108, 2/27/ 2011. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X1000630X> >.

BURNS, C. J. et al. Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 16, n. 3-4, p. 127-283, 2013/04/01 2013. ISSN 1093-7404. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2013.783383> >.

CHEN, W.-Q. et al. Neurobehavioral evaluation of adolescent male rats following repeated exposure to chlorpyrifos. **Neuroscience Letters**, v. 570, p. 76-80, 6/6/ 2014. ISSN 0304-3940. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394014002675> >.

CONNORS, S. L. et al. Fetal Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders. **Pediatric Neurology**, v. 38, n. 3, p. 163-176, 3// 2008. ISSN 0887-8994. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887899407005425> >.

CRUMPTON, T. L.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. **Brain Research**, v. 857, n. 1-2, p. 87-98, 2/28/ 2000. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899399023574> >.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-005-0093-5> >.

DE ANGELIS, S. et al. Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels Without Other Toxicity Signs in Cd1 Mice. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 311-319, April 1, 2009 2009. Disponível em: < <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/108/2/311.abstract> >.

EATON, D. L. et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. sup2, p. 1-125, 2008/01/01 2008. ISSN 1040-8444. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/10408440802272158> >.

EPA, U. S. E. P. **Interim Reregistration Eligibility Decision for Chlorpyrifos**. BiblioBazaar, 2013. ISBN 9781287012658. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=laGPmwEACAAJ> >.

GAMBETA, E. et al. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neurosci Lett**, v. 619, p. 100-5, Apr 21 2016. ISSN 1872-7972 (Electronic) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26952973> >.

GARCIA, S. J.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Developmental neurotoxicity elicited by prenatal or postnatal chlorpyrifos exposure: effects on neurospecific proteins indicate changing vulnerabilities. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 3, p. 297-303, 2003. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241386/> >.

_____. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 455-461, 5// 2005. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668904002686> >.

ICENOGLE, L. M. et al. Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 1, p. 95-101, 1// 2004. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036203001338> >. Acesso em: 2004/2//.

IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plast**, v. 2016, p. 6212983, 2016. ISSN 1687-5443 (Electronic) 1687-5443 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26881124> >.

LASSITER, T. L. et al. Gestational exposure to chlorpyrifos: dose response profiles for cholinesterase and carboxylesterase activity. **Toxicol Sci**, v. 52, n. 1, p. 92-100, Nov 1999. ISSN 1096-6080 (Print) 1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10568702> >.

LASSITER, T. L.; BRIMIJOIN, S. Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. **Neurotoxicol Teratol**, v. 30, n. 2, p. 125-30, Mar-Apr 2008. ISSN 0892-0362 (Print) 0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166376> >.

LASSITER, T. L. et al. The fetal brain appears to be protected from late gestational exposure to chlorpyrifos: toxicokinetic considerations. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 3, p. 261, 1997/05/01 1997. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036297824555> >.

LASSITER, T. L. et al. Gestational Exposure to Chlorpyrifos: Apparent Protection of the Fetus? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 56-65, 1998/09/01 1998. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X98985143> >.

LEVIN, E. D. et al. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, n. 6, p. 733-741, 11// 2002. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036202002726> >. Acesso em: 2002/12//.

LI, R. et al. Chlorpyrifos residue levels on field crops (rice, maize and soybean) in China and their dietary risks to consumers. **Food Control**, v. 51, p. 212-217, 5// 2015. ISSN 0956-7135. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006574> >.

NISHI, K.; HUNDAL, S. S. Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 732-738, 12// 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513006819> >.

OECD. **Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. OECD Publishing, 2008. Disponível em: < [/content/book/9789264070684-en](http://content/book/9789264070684-en) <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070684-en> >.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0022374863&partnerID=40&md5=44cb5714c23c3d97d29ea2dd3581643d> >.

RAUCH, S. A. et al. Associations of prenatal exposure to organophosphate pesticide metabolites with gestational age and birth weight. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 7, p. 1055-60, Jul 2012. ISSN 1552-9924 (Electronic)

0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22476135> >.

REDIVO, D. D. B. et al. Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid treatment over mechanical allodynia and depressive-like behavior associated with experimental diabetes. **Behavioural Brain Research**, v. 298, Part B, p. 57-64, 2/1/ 2016. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815302710> >.

RICHARDSON, R. J. et al. Chlorpyrifos: Assessment of Potential for Delayed Neurotoxicity by Repeated Dosing in Adult Hens with Monitoring of Brain Acetylcholinesterase, Brain and Lymphocyte Neurotoxic Esterase, and Plasma Butyrylcholinesterase Activities. **Toxicological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 89-96, July 1, 1993 1993. Disponível em: < <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/21/1/89.abstract> >.

SANTIAGO, R. M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104-1114, 8/16/ 2010. ISSN 0278-5846. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584610002216> >.

SHEIKHI, S.; SABOORY, E. Neuroplasticity Changes of Rat Brain by Musical Stimuli during Fetal Period. **Cell J**, v. 16, n. 4, p. 448-55, Winter 2015. ISSN 2228-5806 (Print) 2228-5806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685735> >.

SLOTKIN, T. A. Guidelines for Developmental Neurotoxicity and Their Impact on Organophosphate Pesticides: A Personal View from an Academic Perspective. **NeuroToxicology**, v. 25, n. 4, p. 631-640, 6// 2004. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X03000500> >.

SLOTKIN, T. A. et al. Does thyroid disruption contribute to the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 284-287, 9// 2013. ISSN 1382-6689. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913000860> >.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 2, p. 232-241, 3// 2012. ISSN 0892-0362. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036211002248> >. Acesso em: 2012/4//.

_____. Prenatal nicotine alters the developmental neurotoxicity of postnatal chlorpyrifos directed toward cholinergic systems: Better, worse, or just “different?”. **Brain Research Bulletin**, v. 110, p. 54-67, 1// 2015. ISSN 0361-9230. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923014001920> >.

SLOTKIN, T. A. et al. Organophosphate Insecticides Target the Serotonergic System in Developing Rat Brain Regions: Disparate Effects of Diazinon and Parathion at Doses Spanning the Threshold for Cholinesterase Inhibition. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 10, p. 1542-1546, 07/27

05/16/received

07/27/accepted 2006. ISSN 0091-6765

1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1626396/> >.

SMART, I. H. M. Evolution, Development, and Initial Function of the Mammalian Neocortex: Response of the Germinal Zones to Endothermy. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 291, n. 1, p. 28-48, 2008. ISSN 1932-8494. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/ar.20629> >.

SMEGAL, D. C. Human health risk assessment chlorpyrifos. **US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, US Government Printing Office: Washington, DC**, p. 1-131, 2000.

TIMCHALK, C.; POET, T. S.; KOUSBA, A. A. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. **Toxicology**, v. 220, n. 1, p. 13-25, Mar 1 2006. ISSN 0300-483X (Print)

0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343727> >.

TIMOFEEVA, O. A. et al. Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. **Brain Research Bulletin**, v. 77, n. 6, p. 404-411, 2008. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-57149132128&partnerID=40&md5=cf9fd3bd4740e846df4b4f3d2aa296a4> >.

UZUN, F. G.; KALENDER, Y. Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 549-556, 5// 2013. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151300104X> >.

VAN DER KOOIJ, M. A. et al. The effects of stress during early postnatal periods on behavior and hippocampal neuroplasticity markers in adult male mice. **Neuroscience**, v. 311, p. 508-18, Dec 17 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26548415> >.

VENEROSI, A. et al. Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social-emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. **Psychopharmacology**, v. 208, n. 1, p. 99-107, 2010. ISSN 1432-2072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00213-009-1713-2> >.

VENEROSI, A. et al. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring - a mouse study. **Environ Health**, v. 14, p. 32, 2015. ISSN 1476-069X (Electronic) 1476-069X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889763> >.

VIDAIR, C. A. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 287-302, 4/15/ 2004. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X04000079> >.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, May 1976. ISSN 0033-2909 (Print) 0033-2909 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582919> >.

WHYATT, R. M. et al. Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1125-1132, 2004. ISSN 0091-6765.

4.2.2 Artigo 2: Anxiety and depressive-like behavior in females offsprings rats induced by chlorpyrifos

Este artigo aborda a capacidade do clorpirifós em causar os transtornos de ansiedade e/ou depressão em ratos fêmeas lactantes. O artigo foi submetido para publicação no periódico *Neuro Toxicology*.

Submission Confirmation

Entrada x



NeuroToxicology <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para jgolart, mim

14:54 (Há 0 minutos) ☆



inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Profjjonasgolart,

Your submission entitled "Anxiety and depressive-like behaviors in females offsprings rats induced by chlorpyrifos" for the category Full Length Article has been received by journal Neurotoxicology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/neutox/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Professor Joan Cranmer
Editor-in-Chief, NeuroToxicology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Anxiety and depressive-like behavior in females offsprings rats induced by chlorpyrifos

Jonas G. Silva^{a,b*}, Ana C. Boareto^b, Anne K. Schreiber^b, Daiany D. B. Redivo^b, Fernanda Vergara^b, Francielle T. Mathias^b, Janaína M. Zanoveli^b, Paulo R. Dalsenter^b

^a *Department of Chemistry and Biology, Federal Technological University of Paraná, Curitiba, Paraná 81280-340, Brazil*

^b *Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná 81540-990 Brazil*

*Corresponding author at: Laboratory of Reproductive Toxicology, Department of Pharmacology, Federal University of Parana, P.O. Box 19031, Curitiba, Paraná 81540-990, Brazil.

Fax: +55 41 3361 1716.

Email: jgolart@utfpr.edu.br

Abstract

Chlorpyrifos is one of the most commonly used pesticides in the world and especially in Brazil. The high consumption of this pesticide has directed studies for a possible relationship between chlorpyrifos and mood disorders such as anxiety and depressive-like behavior. The aim of this study was to investigate the possible relationship between prenatal exposure to low doses of chlorpyrifos and behavior disorders in rats. For this, Wistar rats were exposed to oral treatment of chlorpyrifos (0.01, 0.1, 1 and 10 mg/kg/day) during pregnancy (GD 14-20) and the behavior of the female offsprings was evaluated at the end of lactation (PND21) and early adulthood (PND70). The behavior tests used were elevated plus-maze, open field and forced modified swimming tests. The results indicated that female offsprings can development both anxiety and depressive-like behavior at the end of the period of lactation, but this behavior does not persist until adulthood after prenatal exposition to chlorpyrifos.

Keywords: organophosphate, anxiety, depressive behavior, pregnancy, young female, low dose.

Highlights

- Low doses of chlorpyrifos can induce behavior disorders in rats exposed during pregnancy.
- Chlorpyrifos induce anxiety and depressive-like behavior in female offsprings at the end of lactation period but not at early adulthood.
- Female offspring rats are susceptible to develop anxiety and depression behaviors after prenatal exposition to chlorpyrifos.

1. Introduction

World agricultural production is only possible because of the intervention of various chemical compounds, primarily by organophosphate pesticides. Among the most used worldwide (MAMCZARZ et al., 2016; VENEROSI et al., 2010) and especially in Brazil (ANVISA, 2016) stands the chlorpyrifos (CPF). The Program of Analysis of Residues in Food (PARA) the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) in Brazil identified CPF residual indexes above the permitted in several foods (ANVISA, 2016).

The studies linking the influence of prenatal exposure to pesticides focusing on emotional changes that lead to anxiety and/or depression are scarce and generally have inconclusive data. It is noteworthy that these studies involve males as the ideal model. However, the average human population in various cultures is composed of females (WORLDBANK, 2017). Thus, it is valid to think that behavioral changes leading to anxiety and depression disorders in females may not occur the same way as happens with male.

The CPF was originally developed to block the hydrolysis of acetylcholine (ACh) by the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in cholinergic system. However, beyond this classic effect, the CPF presents the ability to influence at low doses other physiological systems (Slotkin e Seidler, 2012). Low dose studies have commonly reflected the conditions of human exposure (FLIERS; UNMEHOPA; ALKEMADE, 2006; GILBERT et al., 2012). The effects of exposure to low doses of organophosphates only during gestational phase are not yet well understood (DEATON et al., 2008).

The gestational period is considered the most sensitive step along the development of living organisms (TIMCHALK; POET; KOUSBA, 2006). Further, the development of the nervous system in gestational period can be relatively more susceptible to chlorpyrifos than the nervous system in children and infants (DEATON et al., 2008; GILBERT et al., 2012). The ability to metabolize the CPF appear to be a problem for the offsprings because presenting less enzyme maturity (VIDAIR, 2004). Thus, the subpopulation composed by young females that during pregnancy were exposed to pesticides can be considered more vulnerable.

Effects of exposure to the CPF during gestational period include changes in weight gain in offsprings (ZHAO; GADAGBUI; DOURSON, 2005), attention deficit disorder with hyperactivity (GRABOVSKA; SALYHA, 2015), trouble on the social

behavior (VENEROSI et al., 2015), the anxiety-like behavior in (ALDRIDGE et al., 2005; SILVA et al., 2017; VENEROSI et al., 2015).

Thus, the objective of this study was to evaluate the influence of prenatal exposure to CPF on the anxiety and depressive-like behavior in female offspring rats at the end of lactation and early adulthood.

2. Materials and methods

2.1 Animals

The Ethics Committee for research with animals previously approved all experiments with pregnant rats and their litters (certificate/BIO-UFPR; 758/14). Animals in 3:1 ratio (females/males) were accommodated in vivarium with light/dark cycles of 12 hours under conditions of free access to food and water. At the time of mating animals placed in the same box for 3 hours at the end of the dark period. The attestation of pregnant was held by the presence of sperm in vaginal material collected at the end of the 3th hours, from that moment was considered the day 0 of gestation (GD 0). For the formation of the treatment and control groups the rats were randomized in 5 groups of 11-14 animals.

2.2 Drugs and treatments

To avoid interference from commercial compositions all treatment groups received CPF analytical standard (Sigma Aldrich – Germany, CAS 2921-88-2). The concentrations of the CPF were thought from the values of acceptable daily Intake (ADI) of 0.01 mg/kg/day for humans (ANVISA, 2016). The distribution of treatment groups followed: vehicle control (saline solution); CPF 0.01 (0.01 mg/kg/day); CPF 0.1 (0.1 mg/kg/day); CPF 1.0 (1.0 mg/kg/day) and CPF 10 (10 mg/kg/day). All treatments occurred via oral (gavage) administered volume of 3 mL/kg in the same period of the day for the dilution of the CPF has been used Tween20 (0.1 mL/mL saline).

2.3 Pregnancy outcomes

After pregnancy confirmation an experimental design was established as shown in Figure 1. Pregnancy started in GD0 and treatments between GD14-20. At the end of the period of lactation (PND21) was performed the first behavioral assessment with the elevated plus-maze, open field and forced swimming modified tests. The second

behavioral evaluation happened at the end of the young adult stage (PND70) with the achievement of the same tests.

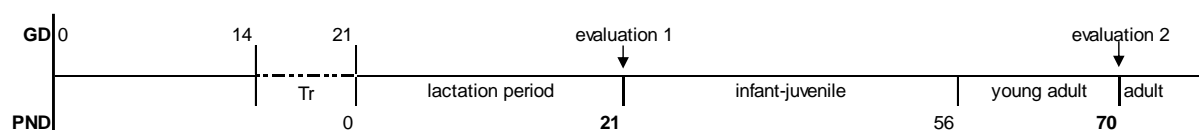


Figure 1. Experimental design. Treatments with the CPF and control groups were held in the final third of gestation (GD14-21). Behavioral tests were carried out at 21 (PND21) and 70 days (PND70) after birth. GD (gestation day); PND (post-natal day); Tr (treatments period).

At birth, the offsprings were assessed macroscopically and their body masses registered. The stage of lactation was accompanied by the general development of the offsprings: opening of eyes, ears and the vaginal canal, any of these parameters presented differences relative to the control (data not shown).

2.4 Acetylcholinesterase

Acetylcholinesterase activity was measured at 21 and 70 days postnatal. The brains were weighed and homogenized in potassium phosphate buffer (KH₂PO₄, K₂HPO₄) 0.1M, pH 7.5, 1:10 dilution weight/volume, centrifuged to 10,100 x g at 4° C for 20 minutes. Aliquots of supernatant were used to perform the analysis.

In microplate was added 50 µL of diluted supernatant 1:5, 200 µL of DTNB 0.75 mM, 50 µL of 10 mM ATC, and the absorbance was measured at 405 nm for 4 minutes every 30 seconds in spectrophotometer. Acetylcholinesterase activity was expressed as nmol. min⁻¹.mg⁻¹ protein.

2.5 Elevated plus-maze

The elevated plus-maze test (EPM) was performed in evaluations 1 and 2 (figure 1) as previously described (PELLOW et al., 1985). The animals were placed individually in the central part of the apparatus facing the open arm, and were evaluated for a period of 5 minutes. The time spent in the open arm was measured and was used as a parameter of anxiety-like behavior. At the end of the test animals were replaced in your source box. Animals that fell out of the open arms were excluded.

2.6 Open field

The impairment of locomotor activity of the offsprings was evaluated by the open field test as previously described (WALSH; CUMMINS, 1976). The open field is of a

rectangular arena (40x50x63 cm) divided into 9 rectangles on the floor. The animals were placed in the center of the arena and the behavior was recorded for 5 minutes and was evaluated the number of intersections between the rectangles. At the end of the test session the arena was cleaned with alcohol 20%.

2.7 Modified forced swim test

The modified forced swimming test was used to evaluate the depressive-like behavior as previously described (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). The test was conducted in two sessions (pre-test and test). At the time of the pre-test the animal was placed in a cylinder (20 cm in diameter x 50 cm high x 30 cm depth of water) at a temperature of $24 \pm 2^\circ \text{C}$ for 15 minutes. After 24 hours the test was carried out with the same exposed apparatus for 5 minutes. Was evaluated the frequency of the predominant behavior (immobility, swimming and climbing) in the range of 5 seconds. After each test the water volume of the apparatus was changed and the temperature stabilized.

2.8 Statistical analysis

All values passed by D'Agostino & Pearson normality test. Analysis of variance (ANOVA) one-way or two-way were used for the tests with parametric data, with data being expressed with means \pm standard error of the media (SEM). All CPF groups were compared with the control group and the post-hoc Dunnett's was chosen. The degree of confidence was considered significant as $p < 0.05$. For the calculations was used the program GraphPad Prism7[®].

3. Results

3.1 Pregnancy outcomes

The mothers body development was evaluated by body mass gain throughout gestation (Figure 2) by ANOVA followed by Dunnett's post-test. During the pre-treatment (GD 0-13) mass gain was similar among all groups; but at the end of the treatment period (GD 14-20) the CPF 10 group showed lower weight gain compared to the control group, indicating possible maternal toxicity of CPF in the dose of 10 mg/kg/day.

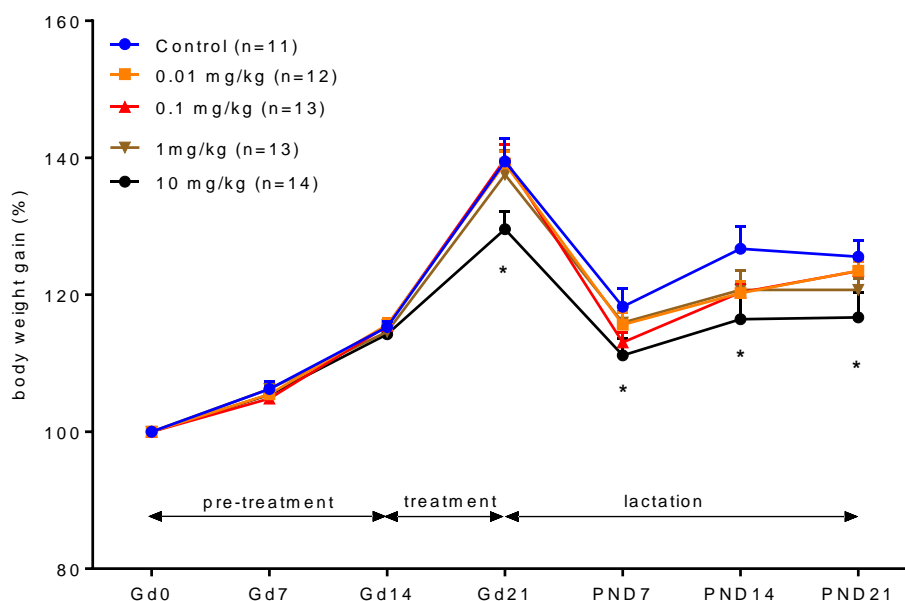


Figure 2. Maternal percentage body mass gain during gestation and lactation periods. Values expressed by mean \pm SEM. Gd (gestational day); PND (post-natal day). * = $p < 0.05$ (Two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons with the control group)

The endpoints of offsprings body developmental (time for opening of the eye, to the ear and detachment opening of the vaginal canal) was observed throughout the experiment. In all groups assessed, the endpoints showed similar values (data not shown). Indicating not changes in the development of the offsprings. The offspring body weight gain was similar between the CPF groups and the control group, indicating that the CPF has not interfered in this condition (Figure 3). The results were obtained by two-way ANOVA ($F=1.94$, $DFn=5$, $DFd=48$ e $p=0.1051$) followed by Dunnett's post-test considered $p < 0.05$ as significant.

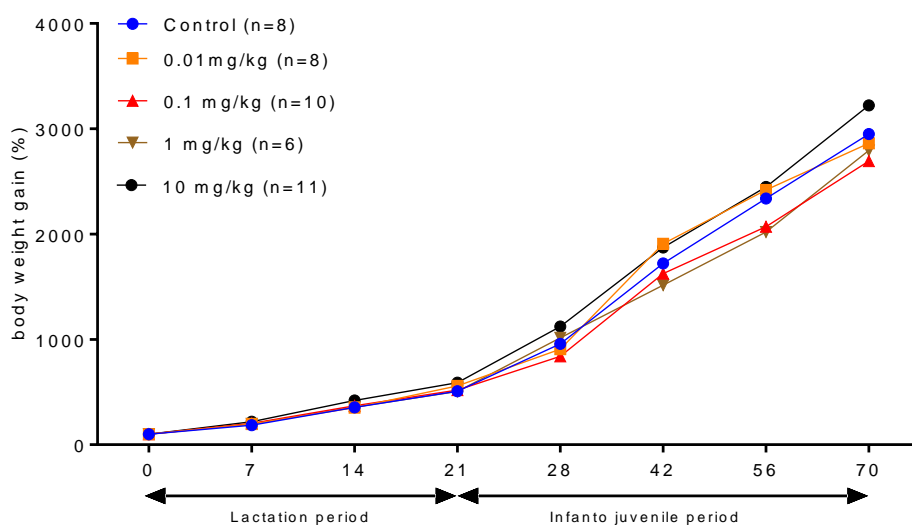


Figure 3. Females offsprings body weight gain. Values expressed by mean \pm SEM. $p < 0.05$ (Two-way ANOVA followed by Dunnett's test).

3.2 Acetylcholinesterase

Figure 4 show the activity in PND21 and PND70. ANOVA was used followed by Dunnett's and did not indicate difference between CPF groups and control group with [F (5,32) = 0.244 $p=0.940$] and [F (5,63) = 1.93 $p=0.102$] for PND21 and PND70 respectively.

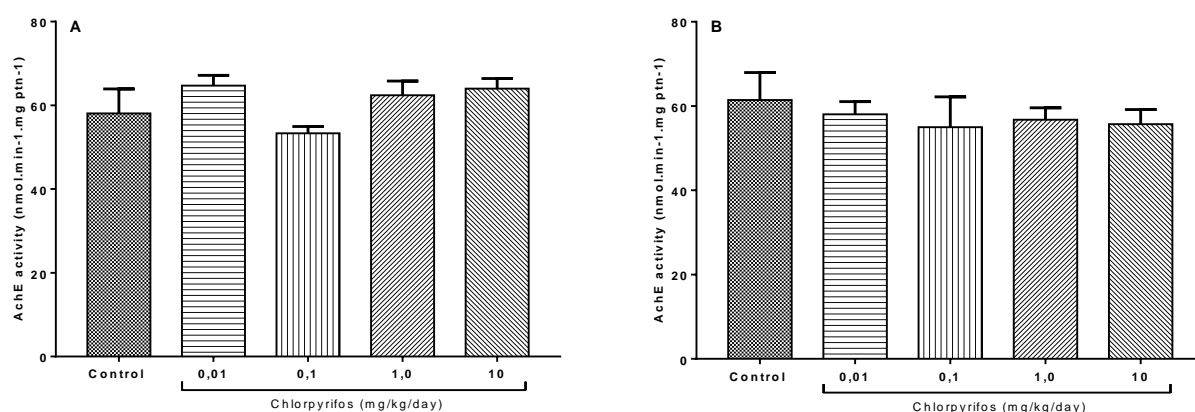


Figure 4. AChE activity. Figure A – AChE activity in PND21. Figure B – AChE activity in PND70. Activity levels of AChE in nmol. min⁻¹.mg protein⁻¹. $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's post-test).

3.3 Elevated plus-maze

The anxiety-like behavior was evaluated using the EPM test at 21 and 70 postnatal days. At PND21 was observed that CPF groups 0.1; 1.0 and 10 obtained significant less time in open arm when compared to the control group (Figure 5A). In

Figure 5B the EPM no statistical difference between the treatment groups and the control group in PND70 was observed.

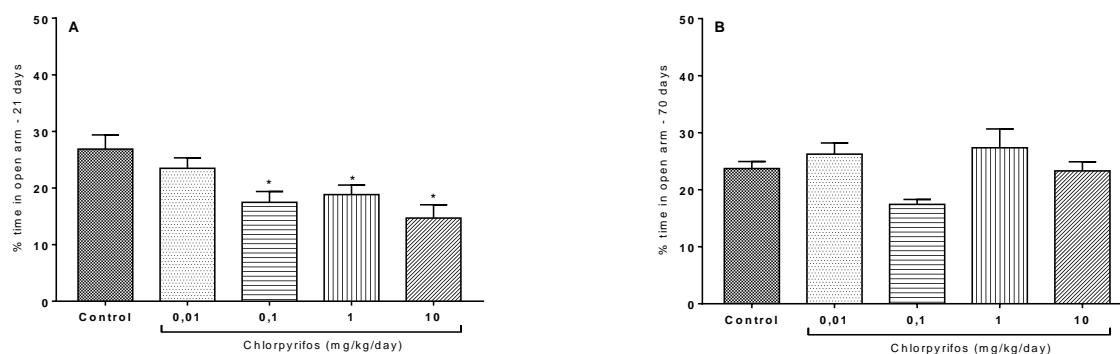


Figure 5. Percentage of time spent in the open arm of the elevated plus-maze apparatus in females at 21 and 70 days of life. One-way ANOVA followed by Dunnett's test ($p < 0.05$).

3.4 Open field

The motor activity assessed by open field test no showed statistical differences between the CPF groups and control group in both PND21 [$F(4,47) = 1.36$ $p = 0.261$] as in PND70 [$F(4,49) = 1.964$ $p = 0.1148$] (Table 1).

3.5 Modified forced swim test

The modified forced swimming test indicated statistical differences between control group and the CPF 1 group in relation to the parameters of immobility [$F(4,55) = 4.22$ $p < 0.05$], swimming [$F(4,58) = 1.771$ $p < 0.05$] and climbing [$F(4,55) = 5.1$ $p < 0.05$] at PND21. In PND70 was no statistical differences found between the groups CPF and the control group for parameters of immobility [$F(4,46) = 0.921$ $p > 0.05$], swimming [$F(4,51) = 0.506$ $p > 0.05$] and climbing [$F(4,52) = 1.39$ $p > 0.05$].

Table 1 - Effect of treatments with CPF on parameters of open field test and modified forced swimming test in females with 21 and 70 days of life.

PND21		Control	CPF 0,01	CPF 0,1	CPF 1	CPF 10
	N	11	10	10	11	14
Open Field Test						
Crossing numbers		27.8 ± 3.49	25.5 ± 2.48	33.6 ± 5.06	33.8 ± 1.57	37.1 ± 5.52
Modified Forced Swim Test						
Immobility frequency		41.2 ± 2.51	42.4 ± 1.35	46.8 ± 1.65	50.4 ± 1.38*	48.0 ± 2.11*
Swimming frequency		5.45 ± 0.83	4.25 ± 0.55	4.53 ± 0.61	3.15 ± 0.43*	3.78 ± 0.68
Climbing frequency		8.82 ± 0.98	10.3 ± 0.75	8.08 ± 1.21	4.75 ± 0.62*	8.58 ± 0.75
PND70		Control	CPF 0,01	CPF 0,1	CPF 1	CPF 10
	N	11	10	11	9	11
Open Field Test						
Crossing numbers		58.36 ± 2.25	72.36 ± 3.94	72.56 ± 3.56	68.82 ± 5.29	63.67 ± 5.22
Modified Forced Swim Test						
Immobility frequency		55.9 ± 0.41	60.6 ± 3.36	56.2 ± 3.35	55.0 ± 1.35	55.5 ± 1.18
Swimming frequency		2.18 ± 0.26	2.36 ± 0.28	2.36 ± 0.28	1.91 ± 0.25	2.33 ± 0.29
Climbing frequency		3.00 ± 0.19	3.54 ± 0.40	6.08 ± 1.18	5.27 ± 0.18	4.92 ± 1.56

Values were expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$ - It was considered significant for statistical analysis between treatment groups and control group. (ANOVA one way followed by Dunnett's *post hoc* test).

4. Discussion

Our results in this study show that chlorpyrifos can induce changes sufficient for manifestation to anxiety and depression-like behavior when female's rats are exposed during pregnancy. The gestational period (GD 14-21) chosen in our study for exposure to CPF include the intense activity of neurogenesis, important to central nervous system development in areas related to the anxiety and depressive-like behavior (GARCIA et al., 2002; LANDRIGAN et al., 1999; LEVIN et al., 2002). Several factors can trigger the behaviors of anxiety and depression in humans, such as genetic predisposition, environmental chemical exposure and social factors (IERACI; MALLEI; POPOLI, 2016).

The pregnancy outcomes indicated that the CPF could influence negatively in the mother's body mass gain from GD14 to the GD 21, indicating a possible maternal toxicity caused by the dose of 10 mg/kg/day. The assessment of body mass gain is considered an important parameter in pregnancy (BOARETO et al., 2008, 2012; DALLEGRAVE et al., 2007). The other parameters of gestation, as post implant loss, number of implantation and average weight of offsprings (data not shown) and the offsprings body weight gain were similar to the respective values of the control group. Thus, possibly the results obtained in behavioral tests had no influence by exposure to CPF in pregnancy.

The activity of AChE levels was not different between the investigated groups, indicating that cholinergic system was not affected by CPF exposition. AChE is an important enzyme for the regulation of the nerve impulse, inactivating the acetylcholine and thus regulating its action in the synapse (SOREQ; SEIDMAN, 2001). It acts at the neuromuscular junction regulating the synaptic transmission. Reduction in AChE density may lead to transmission failure (MARTINEZ-PENA Y VALENZUELA; AKAABOUNE, 2007) and consequently cause changes in muscle contraction and movement, which can be interpreted as apathy, a characteristic behavior of anxiety and depression. The open-field test was used to assess the ability of locomotion in a checkered arena. No differences were found between the CPF and the control group groups in any of the periods evaluated.

In this study, doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg/days of CPF induced anxiety-like behavior at postnatal day 21, but not at 70 days. A similar result was found in male offsprings exposed at the same doses and in the same period (SILVA et al., 2017), demonstrating that CPF has the potential to induce anxiety-like behavior in both

sexes. In this case, the CPF dose of 0.1 mg/kg/day could be considered as LOAEL-dose (Lowest Observed Adverted Effect Level) in this exposure period.

Venerosi *et al.* (2010) showed that mice treated in pre-natal period (GD14-17) with 6 mg/kg/day of CPF was sex (female) selective in relation to the effects of behavioral change in adulthood, when evaluated by light-dark exploration test, probably by influence negatively on serotonergic system leading to loss of responsiveness of selective serotonin transporter (5-HTT). In fact, the serotonergic system plays a fundamental role in maintaining the humor. In anxiety and depression the levels the serotonin and/or the expression of receptors (5-HTR) in the hippocampus and in the dorsal raphe nucleus (DRN) are changed (AMIGÓ *et al.*, 2016; BOLDRINI *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2017).

Depressive-like behavior was assessed by the modified forced swim test and the doses of 1 and 10 mg/kg/days of CPF induced this behavior in female offsprings by increase of immobility. A smaller frequency of swimming was observed in CPF 1 at PND21, indicating that the CPF possibility it is related with serotonergic system. In fact, the exposure for small doses of CPF is able to change the levels of 5-HT in the dorsal raphe nucleus with decrease of 5-HT_{1A} receptors (JUDGE *et al.*, 2016), condition found in depression (DREVETS *et al.*, 2007). The frequency of swimming in the modified forced swim test is related with the activity of serotonin (5-HT) in areas of the hippocampus and pre frontal cortex involved with mood disorders as depressive-like behavior (CRYAN; PAGE; LUCKI, 2005). In this way, the decrease in the frequency of swimming in the CPF 1 group indicates a possible interference of the CPF on neurons involved with the 5-HT release in those regions. The climbing frequency observed in CPF 1 group at PND21 was lower than that of the control group, indicating that in this group the CPF is probably capable of influencing the noradrenergic system. The relationship between CPF and noradrenergic system has been indicated in other studies (LEVIN *et al.*, 2014; SLOTKIN; SKAVICUS; SEIDLER, 2015).

The comparison of the behavioral tests of EPM with the study with male offsprings of our group (SILVA *et al.*, 2017) showed similar results between the sexes in both PND21 and PND70. However, it is worth noting that the depressive-like behavior seen in female offsprings, didn't occur when the modified forced swim test in males (previous study). That way, even with the females being exposed to the CPF under the same conditions, as were males, it is possible to observe a greater susceptibility of female offsprings when compared with males in the same age.

The anxiety and depressive-like behaviors occurs only in PND21 but not persisted until PND70. This fact may be related with the neuroplasticity that would still be going on throughout the period of youth. The process of neurogenesis is a set of neurobiological actions that occurs extensively in the embryonic stage (MUNDKUR, 2005; PITTENGER; DUMAN, 2008; SHEIKHI; SABOORY, 2015) and continues throughout the life (BENNINGHOFF et al., 2012). In adulthood, the continuous exposure (chronic treatment similar) to organophosphates have been linked to cases of anxiety and depression (MEYER et al., 2010; SALVI et al., 2003; WESSELING et al., 2010). In a study of Aldridge et al. (2005) exposure to CPF (1 mg/kg/day) when made in offsprings males in PND1-4 period took the damage persisted in adulthood to the 5-HT system when evaluated by the EPM test and preference for sucrose (ALDRIDGE et al., 2005). However, based on our results to display at prenatal stage is not able to achieve a long-lasting effect. Indicating that even neurodevelopment being more fragile in the embryonic period, it is more dynamic and thus can recover from lesions faster than later neurodevelopment.

5. Conclusion

Prenatal exposure to low doses of the pesticide CPF could generate the anxiety and depressive-like behavior in female Wistar rats at the end of lactation, but not persisting in adulthood. The depressive-like behavior seen only in females is indicative that the action of the CPF on the behavioral disorders is sex selective and that the prenatal period is critical to the neurodevelopment.

Conflict of interest statement

The authors declare they have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

References

ALDRIDGE, J. E. et al. Developmental Exposure of Rats to Chlorpyrifos Leads to Behavioral Alterations in Adulthood, Involving Serotonergic Mechanisms and Resembling Animal Models of Depression. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 5, p. 527–531, 2 fev. 2005.

AMIGÓ, J. et al. The absence of 5-HT₄ receptors modulates depression- and anxiety-like responses and influences the response of fluoxetine in olfactory bulbectomised mice: Adaptive changes in hippocampal neuroplasticity markers and 5-HT_{1A} autoreceptor. **Neuropharmacology**, v. 111, p. 47–58, 2016.

ANVISA. Program for Analysis of Agrochemical Waste in Food. 2016.

BENNINGHOFF, J. et al. The complex role of the serotonin transporter in adult neurogenesis and neuroplasticity. A critical review. **World J Biol Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 240–247, 2012.

BOARETO, A. C. et al. Toxicity of artemisinin [*Artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in Wistar rats. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 25, n. 2, p. 239–246, 2008.

BOARETO, A. C. et al. Study on the developmental toxicity of combined artesunate and mefloquine antimalarial drugs on rats. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 658–664, 2012.

BOLDRINI, M. et al. Unión al autorreceptor 5-HT_{1A} de la serotonina en el núcleo dorsal del rafe en muestras de tejido de víctimas de suicidio deprimidas. **Psiquiatría Biológica**, v. 17, n. 1, p. 12–21, 2010.

CHEN, A. et al. Serotonin 5-HT₄ receptors modulate the development of glutamatergic input to the dorsal raphe nucleus. **Neuroscience Letters**, v. 640, p. 111–116, 2017.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, 2005.

DALLEGRAVE, E. et al. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 9, p. 665–673, 2007.

DEATON, D. L. et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews of**

Toxicology, v. S2, p. 1–125, 2008.

DREVETS, W. C. et al. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, n. 7, p. 865–877, 2007.

FLIERS, E.; UNMEHOPA, U. A.; ALKEMADE, A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 251, n. 1–2, p. 1–8, 2006.

GARCIA, S. J. et al. Chlorpyrifos targets developing glia: Effects on glial fibrillary acidic protein. **Developmental Brain Research**, v. 133, n. 2, p. 151–161, 2002.

GILBERT, M. E. et al. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 4, p. 842–852, 2012.

GRABOVSKA, S.; SALYHA, Y. ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 66, n. 2, p. 121–127, 2015.

IERACI, A.; MALLEI, A.; POPOLI, M. Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. **Neural Plast**, v. 2016, p. 6212983, 2016.

JUDGE, S. J. et al. Mechanism for the acute effects of organophosphate pesticides on the adult 5-HT system. **Chemico-Biological Interactions**, v. 245, p. 82–89, 5 fev. 2016.

LANDRIGAN, P. J. et al. **Pesticides and inner-city children: Exposures, risks, and prevention** *Environmental Health Perspectives*, 1999.

LEVIN, E. D. et al. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, n. 6, p. 733–741, 2002.

LEVIN, E. D. et al. Prenatal dexamethasone augments the neurobehavioral teratology of chlorpyrifos: Significance for maternal stress and preterm labor. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 41, p. 35–42, 2014.

MAMCZARZ, J. et al. Spatial learning impairment in prepubertal guinea pigs prenatally exposed to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos: Toxicological implications. **NeuroToxicology**, v. 56, p. 17–28, 2016.

MARTINEZ-PENA Y VALENZUELA, I.; AKAABOUNE, M.

Acetylcholinesterase mobility and stability at the neuromuscular junction of living mice.

Mol Biol Cell, v. 18, n. 8, p. 2904–2911, 2007.

MEYER, A. et al. Mood Disorders Hospitalizations, Suicide Attempts, and Suicide Mortality Among Agricultural Workers and Residents in an Area With Intensive Use of Pesticides in Brazil. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 73, n. 13–14, p. 866–877, 28 maio 2010.

MUNDKUR, N. Neuroplasticity in children. **Indian journal of pediatrics**, v. 72, p. 855–857, 2005.

PELLOW, S. et al. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88–109, 2008.

SALVI, R. M. et al. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. **Toxicological Sciences**, v. 72, n. 2, p. 267–271, 1 abr. 2003.

SHEIKHI, S.; SABOORY, E. Neuroplasticity Changes of Rat Brain by Musical Stimuli during Fetal Period. **Cell J**, v. 16, n. 4, p. 448–455, 2015.

SILVA, J. G. et al. Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy. **Neuroscience Letters**, v. 641, p. 94–100, 2017.

SLOTKIN, T. A.; SKAVICUS, S.; SEIDLER, F. J. Prenatal drug exposures sensitize noradrenergic circuits to subsequent disruption by chlorpyrifos. **Toxicology**, v. 338, p. 8–16, dez. 2015.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 294–302, 2001.

TIMCHALK, C.; POET, T. S.; KOUSBA, A. A. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. **Toxicology**, v. 220, n. 1, p. 13–25, 2006.

VENEROSI, A. et al. Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social–emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. **Psychopharmacology**, v. 208, n. 1, p. 99–107, 2010.

VENEROSI, A. et al. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social

investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring - a mouse study. **Environ Health**, v. 14, p. 32, 2015.

VIDAIR, C. A. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: extrapolation to the human. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 196, n. 2, p. 287–302, 2004.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WESSELING, C. et al. Symptoms of psychological distress and suicidal ideation among banana workers with a history of poisoning by organophosphate or n-methyl carbamate pesticides. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 67, n. 11, p. 778 LP-784, 19 out. 2010.

WORLD BANK. **Population, female (% of total) | Data**. Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.TOTL.FE.ZS>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

ZHAO, Q.; GADAGBUI, B.; DOURSON, M. Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: A comparison of human and animal data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 55–63, 2005.

5 DISCUSSÃO

Na primeira parte dos trabalhos que compõem essa tese avaliamos a influência que a exposição a baixas doses do pesticida clorpirifós teve sobre um modelo animal com ratas Wistar nos períodos de gestação e lactação, e no desenvolvimento corporal dos filhotes ao longo da fase de lactação e no início da fase adulta.

O momento de exposição ao clorpirifós (Gd14-20) foi escolhido por ser um período crítico para o neurodesenvolvimento de áreas do conjunto límbico, que inicia em Gd11 (Wang *et al.*, 2013) e continua durante a fase adulta (Eriksson *et al.*, 1998); e para o início do funcionamento da glândula tireoide do filhote (Gd16-18) (Auso *et al.*, 2004).

A toxicidade gestacional de uma substância pode ser avaliada pelo acompanhamento do desenvolvimento corporal (ganho de massa corporal), por sinais visuais de intoxicação (piloereção, apatia, tremores, vômito e diarreia) e por sinais clínicos (febre, glicemia e pressão arterial).

Durante o período de gestação o acompanhamento do ganho de massa corporal (GMC) das mães e dos filhotes foi o principal indicador de toxicidade do clorpirifós, sendo o parâmetro inicial para a comparação de toxicidade entre: os grupos expostos ao clorpirifós, o grupo PTU e o grupo controle.

O período compreendido entre a confirmação da prenhez (Gd0) e o início dos tratamentos (Gd14), com clorpirifós, PTU e o grupo controle, o GMC das mães foi acompanhado para nos assegurar que nenhuma progenitora tivesse algum problema na fase de pré-exposição que comprometesse os dados do grupo (artigo 2, gráfico 1).

Após o início do tratamento (Gd14) e até o dia do parto (Gd21) o acompanhamento do GMC materno foi realizado diariamente (artigo 2, figura 1). Ao final do período de exposição foi observado que as mães do grupo CPF 10 apresentaram, em média, um menor GMC quando comparado as mães do grupo controle (artigo 2, figura 1). Visto que o clorpirifós apresenta toxicidade sobre a tireoide (De Angelis *et al.*, 2009), este fato poderia estar relacionado a participação hormonal da tireoide no metabolismo energético. Uma vez que, o GMC materno durante a gestação está relacionado ao metabolismo da mãe (Haddow *et al.*, 2015), ao desenvolvimento fetal e também ao aumento do volume uterino (Gray *et al.*, 2015).

O GMC das mães do grupo PTU foi relativamente maior comparado ao controle (Tabela 2), porém não significativo estatisticamente ($p < 0,087$). O PTU é uma droga

que age em diferentes níveis de regulação da produção de hormônios da tireoide, reduzindo a síntese de pró-hormônios da tiroxina, bloqueando a enzima tireoide peroxidase, e a iodação da tiroglobulina (Bagnato *et al.*, 2015), podendo interferir com a inibição da deionidase tipo 1 que converte o T4 em T3 (Manna *et al.*, 2013). Desta forma, é provável que o sutil aumento do GMC das mães do grupo PTU esteja ligado a diminuição dos níveis de T3 plasmáticos, o que acarretaria diminuição do metabolismo glicêmico e consequente aumento da via anabólica de lipídios (Lindsey e Mohan, 2017).

Apesar do GMC ter sido menor nas mães dos grupos CPF 10 em relação as mães do grupo controle durante o período de gestação, as médias das massas corporais dos filhotes ao final da lactação foi semelhante entre os dois grupos, indicando que o clorpirifós não foi capaz de influenciar no desenvolvimento corporal dos filhotes alterando o seu GMC. O clorpirifós apresenta a capacidade de passar pela barreira hematoencefálica (Lassiter *et al.*, 1998) e de ser encontrado no leite materno (Salas *et al.*, 2003; Bedi *et al.*, 2015), porém, não parece ser capaz de influenciar, nas doses desse trabalho, o desenvolvimento corporal do filhotes quando avaliado o GMC. Os outros tratamentos com clorpirifós também não ocasionaram diferenças sobre a massa corporal dos filhotes ao final da gestação.

As médias dos dias de gestação (tabela 2) de todos os grupos se mostraram dentro do esperado (21 dias \pm 2) indicando que tanto o clorpirifós quanto o PTU não foram capazes de influenciar sobre esse parâmetro.

O número de implantações uterinas juntamente com o número de perdas pós-implantes (tabela 2) são dois parâmetros importantes para indicar se a substância estudada é capaz de gerar reabsorção embrionária, ocasionando o descolamento do embrião da parede do endométrio. Quando observados, esses dois parâmetros, não foram vistas diferenças entre os grupos; indicando que o clorpirifós, em todas as suas doses, e o PTU não apresentaram capacidade de gerar reabsorção uterina quando comparados ao grupo controle.

Outro fator importante para o estudo da toxicologia gestacional é o estudo sobre o desenvolvimento dos filhotes. O número de filhotes nascidos por mães e a massa corporal de cada um ao nascer (tabela 2) são parâmetros importantes sobre a qualidade da gestação. As médias dos números de filhotes nascidos vivos por ninhada e as médias das massas corporais dos filhotes ao nascerem foram semelhantes entre todos os grupos. Esses resultados são corroborados com os dados de implantação e

perda pós-implante. Desta forma, nos parece que tanto os tratamentos com clorpirifós quanto com PTU não foram capazes de influenciar sobre a gestação no que se refere ao desenvolvimento corporal da prole e a sua quantidade.

A avaliação toxicológica da gestação também teve como parâmetro o estudo da massa relativa dos órgãos. Em nosso estudo foram avaliados os órgãos: fígado, rins, baço, testículos, úteros e cérebros. Para todos os animais estudados (mães na tabela 2 e filhotes na tabela 3) foram anotados os pesos destes órgãos; no caso das mães, os órgãos foram coletados ao final da lactação; e dos filhotes, uma parte da prole foi avaliada no final da lactação (PND21) e outra parte no início da fase adulta (PND70). Foi realizado o cálculo para a conversão do peso absoluto para o peso relativo que é o valor percentual do peso do órgão em relação ao peso corporal total. Os resultados estão nas tabelas 2 (mães) e 3 (filhotes), e após comparados os valores não foi observado diferenças entre os grupos de tratamentos (CPF e PTU) e o grupo controle. Objetivamente concluímos que tanto os tratamentos com clorpirifós quanto com o PTU não foram capazes de alterar a morfologia dos órgãos avaliados a ponto de modificar a sua massa.

Como discutido anteriormente, os filhotes do grupo PTU apresentaram um pequeno aumento de GMC em relação ao grupo controle provavelmente pelo mecanismo de ação sobre o metabolismo da tireoide. Porém, nenhum dos tratamentos com clorpirifós ou PTU foi capaz de alterar significativamente os parâmetros de desenvolvimento dos filhotes até o final da lactação. O que nos sugere, então, que o mecanismo de ação dessas substâncias nas doses empregadas esteve relacionado mais sutilmente a outros sistemas fisiológicos, como por exemplo o sistema nervoso central, no qual podemos comprovar modificações sexo-seletivas sobre os comportamentos do tipo-ansiedade e no tipo-depressão nos artigos 1 e 2 dessa tese. Outros comportamentos já foram indicados como sexo-seletivos quando houve exposição a baixas doses de clorpirifós. Como no comportamento investigação social demonstrando maior agressividade das fêmeas quando na fase adulta (De Felice *et al.*, 2014) e o de piora da memória referencial no teste de labirinto radial (Aldridge *et al.*, 2005).

No artigo 1, discutimos também que o CPF 10 é um grupo onde os filhotes machos, a partir de PND42, tiveram um GMC acentuado em relação ao grupo controle (artigo 1, figura 3), essa observação pode ser corroborada por Lassiter *et al.* (2008) que afirma no seu estudo um maior GMC (10,5%) e um aumento médio de 12% em

volume para os machos já a partir da dose de 2,5 mg/kg, quando comparado ao grupo controle a partir de PND45 até PND72. O fato do aumento do GMC nos machos pode estar relacionado ao sistema serotoninérgico em que um papel importante da 5-HT está relacionado ao metabolismo energético. Fatores relacionados ao equilíbrio energético e a regulação da ingestão de alimentos é influenciada pela 5-HT (Cataldo *et al.*, 2014). No sistema nervoso central, os neurônios do núcleo da rafe projetam fibras serotoninérgicas para áreas de controle do apetite. As áreas do hipotálamo basomedial e lateral são relacionadas ao controle do comportamento alimentar, com inervação feita por neurônios serotoninérgicos da rafe mesencefálica (Azmitia, 1999). Receptores pós-sinápticos 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C} são relevantes na anorexia de mamíferos (Blundell e Hill, 1987; Yadav *et al.*, 2009).

A ingestão e o consumo energético são diretamente mediados pela 5-HT. No sistema entérico a 5-HT, no momento em que é lançada por células enterocromafins, regula o equilíbrio energético por mecanismos periféricos (Al-Zoairy *et al.*, 2017). Efeitos da 5-HT sobre o equilíbrio energético trazem influências secundárias na homeostase glicêmica, estabelecendo uma ligação entre a obesidade e a resistência à insulina. E ainda, as vias serotoninérgicas afetam a homeostase glicêmica pela regulação autonômica e pela ação em tecidos periféricos (Munro *et al.*, 2012).

Assim, apesar do consumo da alimentação não ter sido medido como parâmetro de estudo e as curvas de crescimento geradas pelo acompanhamento do GMC das mães e dos filhotes não indicarem alguma diferença entre os grupos é possível haver uma relação entre o clorpirifós e a via metabólica da 5-HT e de seus receptores.

Desta forma, ao avaliarmos o período gestacional e o desenvolvimento corporal dos filhotes como um todo a partir dos parâmetros discutidos até aqui, é possível afirmar que o clorpirifós foi capaz de interferir sobre o metabolismo materno, diminuindo o GMC durante o tratamento apenas com a maior dose (10 mg/kg/dia) e esse menor GMC persistiu ao longo da lactação indicando assim toxicidade materna para essa dose. Os filhotes machos do grupo CPF 10 apresentaram um ganho de GMC acentuado a partir de PND42, fato esse, corroborado com estudos anteriores e com possível influência do sistema serotoninérgico.

Conjuntamente ao acompanhamento da gestação e do desenvolvimento dos filhotes foram realizados também a quantificação dos níveis de acetilcolinesterase cerebral ativa, a avaliação microscópica por histologia morfológica das tireoides dos

filhotes (machos e fêmeas) ao final da lactação e no início da fase adulta e a medida anogenital dos filhotes após o parto até o PND19.

Diversos estudos mostram a relação entre a exposição ao clorpirifós e os níveis de acetilcolinesterase (AChE) cerebrais (Goodman *et al.*, 2013). O princípio toxicológico de todos os organofosforados é agir primariamente sobre o mecanismo de ação da enzima AChE. A AChE está envolvida com a transmissão de impulsos nervosos, por promover uma rápida hidrólise da acetilcolina (ChE) em diversas vias colinérgicas tanto no sistema nervoso central quanto periférico. A AChE pode ser inibida por diversas substâncias, incluindo clorpirifós, levando a acumulação de ACh e assim hiperestimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos. (Čolović *et al.*, 2013). A atividade da AChE foi medida nos filhotes em PND21 e em PND70 a partir das amostras cerebrais. Apesar dos estudos sugerirem que há relação entre o clorpirifós e os níveis de atividade da AChE cerebral nossos estudos não indicaram diferenças significativas entre os tratamentos com clorpirifós, com PTU e o grupo controle. Possivelmente, devido ao desenho experimental realizado por nós ser fundamentado apenas na exposição gestacional. Ainda mais, as concentrações dos tratamentos com clorpirifós foram inferiores ao que a literatura indica como LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) para os níveis de AChE cerebral (Moreira *et al.*, 2010).

A histologia morfológica da tireoide foi avaliada para identificar possíveis danos estruturais relacionados às células ou ao conjunto folicular. Os cortes histológicos foram realizados com os filhotes em todos os grupos e nos dois períodos avaliados (PND21 e PND70). Após estudo da morfologia normal da tireoide foi possível fazer a comparação entre os grupos nos quais não foi evidenciada nenhuma alteração morfológica que indicasse diminuição da funcionalidade da tireoide.

A distância anogenital é uma medida antropométrica que pode ser definida como sendo a distância entre o ânus e a genitália. Essa medida é considerada um marcador de dimorfismo sexual válido tanto para humanos quanto para roedores (Kita *et al.*, 2016). Essa técnica é utilizada principalmente para avaliar o potencial anti-androgênico em estudos experimentais. O período pré-natal é considerado como de maior susceptibilidade a interferência por substâncias desreguladoras endócrinas (Shono *et al.*, 2004; Ipulan *et al.*, 2016; Kita *et al.*, 2016).

A segunda parte dos trabalhos que compõem essa tese avaliou a influência da exposição ao clorpirifós no neurodesenvolvimento de áreas cerebrais relacionadas

com os comportamentos do tipo-ansiedade e do tipo-depressão em filhotes com prévia exposição durante a gestação. Para tal, foram realizados testes para avaliação do comportamento e da atividade motora.

O primeiro ponto levantado foi a possibilidade do clorpirifós prejudicar a atividade motora, pois, o comprometimento poderia ser confundido com a apatia que é a falta de interesse em se movimentar para explorar o ambiente, e um indicativo sugerido de depressão. Para tal, foi realizado o teste de campo aberto com os animais que posteriormente passariam pelo teste de nado forçado modificado.

O teste de campo aberto (artigo 1) indicou que a atividade motora dos animais machos foi maior nos grupos CPF 0,1; 1 e 10 quando comparados ao grupo controle em PND21. O que indica uma possível relação com o comportamento do tipo-ansiedade nesse modelo em ratos. De fato, a atividade locomotora é um parâmetro importante para demonstrar a “angustia” que o animal está sentindo em estar num ambiente novo e desconhecido (Morrow-Tesch *et al.*, 1998). A atividade motora das fêmeas (artigo 2) não teve diferença estatística entre os grupos tratados com clorpirifós e o grupo controle.

O desenvolvimento dos comportamentos de ansiedade e depressão nos filhotes (machos e fêmeas) em PND21 e PND70 foi avaliado com base nos resultados encontrados nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e de natação forçada modificado (NFM).

O teste de LCE é voltado para a avaliação do comportamento do tipo-ansiedade (Gambeta *et al.*, 2016). Com sua estrutura composta por dois braços abertos, dois braços fechados e ambos elevados do solo, o LCE mimetiza o repertório natural de defesa do rato baseando-se no medo inato que os roedores têm de ambientes abertos. Porém, apresenta a possibilidade de exploração do ambiente aberto, de forma que o LCE se torna um dispositivo válido para o estudo do conflito de aproximação e esquiva (De Moraes *et al.*, 2014).

Ao avaliarmos os machos (artigo 1) e as fêmeas (artigo 2) pelo teste de LCE foi visto que os grupos CPF 0,1; 1 e 10 em ambos sexos tiveram a percentagem de tempo no braço aberto menor quando comparados ao grupo controle, o que indica uma aversão ao braço aberto. Esta aversão pode estar relacionada com um prejuízo ao sistema serotoninérgico já que a 5-HT desempenha papel fundamental na ansiedade (Zanoveli *et al.*, 2010).

O teste de natação forçada modificado (NFM) é um teste comportamental validado para o estudo do comportamento tipo-depressivo em modelo animal com roedores. Sua característica principal é avaliar a eficácia de uma substância em promover esse tipo de comportamento (Cryan *et al.*, 2005). O NFM foi empregado por ser relativamente rápido e prático com reprodutibilidade dos dados quando feito nas mesmas condições e especificidade. Sua funcionalidade se baseia no estudo de três fatores: a imobilidade, a natação e a escalada, onde esses fatores são medidos ao longo de um período de 300 segundos, sendo que a cada cinco segundos é feita uma avaliação do comportamento totalizando 60 avaliações (Cryan *et al.*, 2002).

A comparação entre o tempo de imobilidade versus o tempo de natação é feita para a determinação da influência da substância de estudo sobre o sistema serotoninérgico. A outra comparação é feita entre o tempo de imobilidade versus o tempo de escalada, com ela é possível estudar as substâncias que apresentem potencial de ação sobre o sistema das catecolaminas diminuindo a imobilidade e aumentando a escalada (Cryan *et al.*, 2002; Cryan *et al.*, 2005). Assim o teste de NFM se torna bastante adequado ao estudo do comportamento do tipo depressão em modelos animais onde ocorra modificação dos níveis das monoaminas noradrenérgicas.

Atualmente há diversas teorias que tentam explicar a neurobiologia da ansiedade e da depressão, sendo a primeira a ser proposta e a mais discutida a Teoria Monoaminérgica, na qual há uma redução na biodisponibilidade das aminas biogênicas encefálicas (serotonina, dopamina e noradrenalina) podendo levar a uma *downregulation* de receptores pós-sinápticos desses neurotransmissores (Ferrari e Villa, 2016). Além disso, estudos clínicos demonstraram que pacientes com depressão maior apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF e interleucina 6 – IL-6) na corrente sanguínea (Dowlati *et al.*, 2010), sendo que o mesmo foi encontrado em modelo animal de depressão pela exposição ao estresse crônico, o qual leva ao aumento da expressão de TNF, IL-6 e interleucina 1 β (Hodes *et al.*, 2015).

Alguns estudos têm sugerido que a exposição a pesticidas pode levar a alterações no sistema serotoninérgico, de tal modo a contribuir para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como a depressão (Beseler *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011). Estudos prévios demonstraram que a exposição ao clorpirifós em ratas no período Gd17-20 também promove alterações no sistema serotoninérgico em

períodos tardios (PND60) (Aldridge *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2005) promovendo de tal modo alterações comportamentais relacionada a depressão (Aldridge *et al.*, 2005).

Em nosso estudo não foi observado o comportamento do tipo depressivo nos animais machos no PND70 (artigo 1), o que difere do estudo de Aldridge et al (2005) onde os testes comportamentais foram realizados na fase escura do ciclo de luz. Essa diferença no protocolo pode ser o fator que levou a essas diferenças no comportamento apresentados. Apesar disso, nosso estudo sugere o comportamento do tipo depressivo em fêmeas no PND21 (artigo 2).

Neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe são mediadores das respostas neuroendócrinas e comportamentais em condições estressoras (Faria *et al.*, 1997). A 5-HT desenvolve papel importante tanto na modulação motora e na atividade sensorial, ainda mais também com função importante na cognição, emoções e transtornos comportamentais de ansiedade e depressão (Graeff e Zangrossi, 2010; Graeff *et al.*, 2015). Assim, o aumento da imobilidade durante o teste pode estar relacionado com uma possível desregulação do sistema serotoninérgico nesses animais, o qual pode-se sugerir que a exposição no período GD14-20 também pode levar a alterações no sistema serotoninérgico em fases iniciais de vida.

6 CONCLUSÕES

As exposições ao clorpirifós nas doses e condições conforme a proposta desse trabalho nos fazem concluir que:

- a) O clorpirifós na maior dose aqui trabalhada causou toxicidade materna. Visto que, alterou o parâmetro de ganho de massa corporal tanto nas progenitoras durante a gestação quanto na prole masculina.
- b) Os comportamentos do tipo ansiedade e depressão apresentados pelos descendentes parecem ser dependentes do período de vida, manifestando-se na fase inicial da vida, mas não persistindo até a fase adulta, possivelmente devido a neuroplasticidade atuante ao longo da vida.
- c) O comportamento do tipo depressivo parece ser sexo seletivo e pode ser visto apenas durante a fase final da lactação em fêmeas, sugerindo maior susceptibilidade deste sexo a esta condição.
- d) Não foi possível relacionar a interferência do clorpirifós à atividade da tireoide com os transtornos de comportamento. Visto que, na presença do controle positivo o propiltiouracil, não houve diferença estatística nos testes comportamentais avaliados.
- e) Nesse modelo de exposição proposto quando avaliada a condição histológica da tireoide não foi observado modificações que indicassem lesão tecidual.
- f) A exposição ao composto organofosforado denominado clorpirifós, nas doses utilizadas nesse projeto, geram distúrbios comportamentais do tipo ansiedade e do tipo depressão no período inicial de vida de ratos Wistar, o que pode tornar o indivíduo mais susceptível a traumas posteriores.

7 REFERÊNCIAS

AL-ZOAIRY, R. et al. Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. **Diabetol Metab Syndr**, v. 9, p. 1, 2017. ISSN 1758-5996.

ALDRIDGE, J. E. et al. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 5, p. 527-31, May 2005. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking).

ALDRIDGE, J. E.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. 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**, v. 112, n. 2, p. 148-55, Feb 2004. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765

ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Dsm-5**. Amer Psychiatric Pub Incorporated, 2013. ISBN 9780890425558.

AUSO, E. et al. A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortigenesis alters neuronal migration. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4037-47, Sep 2004. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227

AZMITIA, E. C. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2 Suppl, p. 33S-45S, Aug 1999. ISSN 0893-133X (Print) 0893-133X.

BAGNATO, G. et al. Propylthiouracil modulates aortic vasculopathy in the oxidative stress model of systemic sclerosis. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 79-83, 8// 2015. ISSN 1537-1891.

BANO, G. et al. Is the defect in pro-hormone processing in Type 2 diabetes mellitus restricted to the beta cell? **Diabetic Medicine**, v. 18, n. 1, p. 17-21, Jan 2001. ISSN 0742-3071.

BARTZOKIS, G. et al. Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men - A magnetic resonance imaging study (vol 58, pg 461, 2001). **Archives of General Psychiatry**, v. 58, n. 8, p. 774-774, Aug 2001. ISSN 0003-990X.

BASSETT, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, n. 1, p. 1-11, Dec 31 2003. ISSN 0303-7207.

BEDI, J. S. et al. Pesticide Residues in Bovine Milk in Punjab, India: Spatial Variation and Risk Assessment to Human Health. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 69, n. 2, p. 230-40, Aug 2015. ISSN 1432-0703 (Electronic) 0090-4341

BERBEL, P. et al. Delayed neurobehavioral development in children born to pregnant women with mild hypothyroxinemia during the first month of gestation: the importance of early iodine supplementation. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 19, n. 5, p. 511-519, 2009.

BERNAL, J. 63 - Thyroid Hormones and Brain Development. In: EDITORS-IN-CHIEF: DONALD, W. P.;ARTHUR, P. A., *et al* (Ed.). **Hormones, Brain and Behavior (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2009. p.2005-2034. ISBN 978-0-08-088783-8.

BESELER, C. et al. Depression and pesticide exposures in female spouses of licensed pesticide applicators in the agricultural health study cohort. **J Occup Environ Med**, v. 48, n. 10, p. 1005-13, Oct 2006. ISSN 1076-2752 (Print) 1076-2752

BLUNDELL, J. E.; HILL, A. J. Nutrition, serotonin and appetite: case study in the evolution of a scientific idea. **Appetite**, v. 8, n. 3, p. 183-94, Jun 1987. ISSN 0195-6663 (Print) 0195-6663

BOAS, M.; FELDT-RASMUSSEN, U.; MAIN, K. M. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 355, n. 2, p. 240-248, 2012. ISSN 0303-7207.

BOAS, M. et al. Environmental chemicals and thyroid function. **European Journal of Endocrinology**, v. 154, n. 5, p. 599-611, May 1, 2006 2006.

BOELEN, A. et al. Chronic local inflammation in mice results in decreased TRH and type 3 deiodinase mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus independently of diminished food intake. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 3, p. 707-714, Dec 2006. ISSN 0022-0795.

BRADMAN, A. et al. Measurement of pesticides and other toxicants in amniotic fluid as a potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1779-1782, 2003. ISSN 0091-6765.

BURATTI, F. M. et al. Foetal and neonatal exposure to chlorpyrifos: Biochemical and metabolic alterations in the mouse liver at different developmental stages. **Toxicology**, v. 280, n. 3, p. 98-108, 2011. ISSN 0300-483X.

CATALDO, L. R. et al. [Role of peripheral serotonin in the insulin secretion and glucose homeostasis]. **Nutr Hosp**, v. 30, n. 3, p. 498-508, Sep 01 2014. ISSN 1699-5198 (Electronic) 0212-1611.

CHAPIN, R. E. et al. The Effects of Perinatal/Juvenile Methoxychlor Exposure on Adult Rat Nervous, Immune, and Reproductive System Function. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 138-157, 1997. ISSN 0272-0590.

CHEN, W. Q. et al. Repeated exposure to chlorpyrifos alters the performance of adolescent male rats in animal models of depression and anxiety. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 355-61, Aug 2011. ISSN 1872-9711 (Electronic) 0161-813X.

CHIAMOLERA, M. I. et al. Fundamentally Different Roles for Thyroid Hormone Receptor Isoforms in Thyroid Hormone Pituitary Feedback. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 3, p. S2542-S2542, Jun 2010. ISSN 0163-769X.

CHO, S.-D. et al. Pre-validation study for OECD enhanced test guideline 407 protocol by gavage for 4 weeks using propylthiouracil and tamoxifen. **Toxicology Letters**, v. 144, n. 2, p. 195-204, 9/30/ 2003. ISSN 0378-4274.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-84, Oct 1993. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765.

ČOLOVIĆ, M. B. et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 05/ 06/06/received 01/04/revised 02/02/accepted 2013. ISSN 1570-159X 1875-6190.

CONNORS, S. L. et al. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders. **Pediatric Neurology**, v. 38, n. 3, p. 163-176, Mar 2008. ISSN 0887-8994.

CROFTON, K. M. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 209-223, 2008. ISSN 1365-2605.

CROFTON, K. M. et al. PCBs, thyroid hormones, and ototoxicity in rats: Cross-fostering experiments demonstrate the impact of postnatal lactation exposure (vol 57, pg 131, 2000). **Toxicological Sciences**, v. 58, n. 1, p. Cp3-Cp3, Nov 2000. ISSN 1096-6080.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 5, p. 238-45, May 2002. ISSN 0165-6147 (Print) 0165-6147.

CRYAN, J. F.; PAGE, M. E.; LUCKI, I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 3, p. 335-44, Nov 2005. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158.

DASTON, G. P.; COOK, J. C.; KAVLOCK, R. J. Uncertainties for endocrine disrupters: Our view on progress. **Toxicological Sciences**, v. 74, n. 2, p. 245-252, Aug 2003. ISSN 1096-6080.

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 211-218, May 2008. ISSN 0091-3022. Disponível em: < <Go to ISI>://000255579700005 >.

DE ANGELIS, S. et al. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in CD-1 mice. **Toxicol Sci**, v. 108, n. 2, p. 311-9, Apr 2009. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929

DE FELICE, A. et al. Sex-dimorphic effects of gestational exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on social investigation in mice. **Neurotoxicol Teratol**, v. 46, p. 32-9, Nov-Dec 2014. ISSN 1872-9738 (Electronic) 0892-0362.

DE MORAIS, H. et al. Increased oxidative stress in prefrontal cortex and hippocampus is related to depressive-like behavior in streptozotocin-diabetic rats. **Behav Brain Res**, v. 258, p. 52-64, Jan 01 2014. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328.

DIXON, B. et al. Prediction of aquifer vulnerability to pesticides using fuzzy rule-based models at the regional scale. **Physical Geography**, v. 23, n. 2, p. 130-153, Mar-Apr 2002. ISSN 0272-3646.

DOERIG, N. et al. Amygdala response to self-critical stimuli and symptom improvement in psychotherapy for depression. **Br J Psychiatry**, v. 208, n. 2, p. 175-81, Feb 2016. ISSN 1472-1465 (Electronic) 0007-1250.

DOWLATI, Y. et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 5, p. 446-57, Mar 01 2010. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223.

EATON, D. L. et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. s2, p. 1-125, 2008a.

ERDEMIR, F. et al. The effect of sertraline, paroxetine, fluoxetine and escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats. **Int Braz J Urol**, v. 40, n. 1, p. 100-8, Jan-Feb 2014. ISSN 1677-6119 (Electronic) 1677-5538

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**, v. 4, n. 11, p. 1313-7, Nov 1998. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956.

ESTEVAN, C.; VILANOVA, E.; SOGORB, M. A. Chlorpyrifos and its metabolites alter gene expression at non-cytotoxic concentrations in D3 mouse embryonic stem cells under in vitro differentiation: Considerations for embryotoxic risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 217, n. 1, p. 14-22, 2013. ISSN 0378-4274.

EVANS, T. J. Chapter 14 - Reproductive toxicity and endocrine disruption. In: RAMESH, C. G.; DVM, et al (Ed.). **Veterinary Toxicology**. Oxford: Academic Press, 2007. p.206-244. ISBN 978-0-12-370467-2.

EVANS, T. J. Chapter 67 - Endocrine disruptors. In: RAMESH, C. G. (Ed.). **Reproductive and Developmental Toxicology**. San Diego: Academic Press, 2011. p.873-891. ISBN 978-0-12-382032-7.

FAGMAN, H.; NILSSON, M. Morphogenesis of the thyroid gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 35-54, 2010. ISSN 0303-7207.

FARIA, M. S. et al. Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur J Pharmacol**, v. 323, n. 1, p. 37-43, Mar 26 1997. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999.

FELDT-RASMUSSEN, U. et al. Long-term variability in serum thyroglobulin and thyroid related hormones in healthy subjects. **Acta Endocrinologica**, v. 95, n. 3, p. 328-334, 1980.

FELDT-RASMUSSEN, U.; MATHIESEN, E. R. Endocrine disorders in pregnancy: Physiological and hormonal aspects of pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 6, p. 875-884, 2011. ISSN 1521-690X.

FERRARI, F.; VILLA, R. F. The Neurobiology of Depression: an Integrated Overview from Biological Theories to Clinical Evidence. **Mol Neurobiol**, Aug 10 2016. ISSN 1559-1182 (Electronic) 0893-7648.

FERREIRA, A. B. D. H. **Novo dicionário da língua portuguesa**. Nova Fronteira, 1986. ISBN 8520904114.

FLASKOS, J. The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites. **Toxicol Lett**, v. 209, n. 1, p. 86-93, Feb 25 2012. ISSN 1879-3169 (Electronic) 0378-4274

FLIERS, E.; UNMEHOPA, U. A.; ALKEMADE, A. Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 251, n. 1-2, p. 1-8, Jun 7 2006. ISSN 0303-7207.

FRYE, C. A. et al. Endocrine Disrupters: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 1, p. 144-159, Jan 2012. ISSN 0953-8194.

GAMBETA, E. et al. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neurosci Lett**, v. 619, p. 100-5, Apr 21 2016. ISSN 1872-7972 (Electronic) 0304-3940.

GARCIA, S. J.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 455-461, 5// 2005. ISSN 1382-6689.

GHARAMI, K.; DAS, S. Thyroid hormone-induced morphological differentiation and maturation of astrocytes are mediated through the beta-adrenergic receptor. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 5, p. 1962-1969, Nov 2000. ISSN 0022-3042.

GILBERT, M. E. et al. Adult hippocampal neurogenesis is impaired by transient and moderate developmental thyroid hormone disruption. **Neurotoxicology**, v. 59, p. 9-21, Mar 2017. ISSN 1872-9711 (Electronic) 0161-813X.

GILBERT, M. E. et al. Developmental thyroid hormone disruption: Prevalence, environmental contaminants and neurodevelopmental consequences. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 4, p. 842-852, 2012. ISSN 0161-813X.

GLINOER, D. Potential Consequences of Maternal Hypothyroidism on the Offspring: Evidence and Implications. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 55, n. 3, p. 109-114, 2001. ISSN 1663-2818.

GOODMAN, J. E.; PRUEITT, R. L.; RHOMBERG, L. R. Incorporating Low-dose Epidemiology Data in a Chlorpyrifos Risk Assessment. **Dose Response**, v. 11, n. 2, p. 207-19, 2013. ISSN 1559-3258.

GRAEFF, F. G. et al. New Findings on the Neurotransmitter Modulation of Defense in the Dorsal Periaqueductal Gray. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 14, n. 8, p. 988-95, 2015. ISSN 1996-3181 (Electronic) 1871-5273 (Linking).

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H., JR. The dual role of serotonin in defense and the mode of action of antidepressants on generalized anxiety and panic disorders. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 207-17, Sep 01 2010. ISSN 1875-6166 (Electronic) 1871-5249

GRAY, C. et al. A maternal high fat diet programmes endothelial function and cardiovascular status in adult male offspring independent of body weight, which is reversed by maternal conjugated linoleic acid (CLA) supplementation. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115994, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203.

GUILLETTE, L. J. Endocrine disrupting contaminants - Beyond the dogma. **Environ Health Perspect**, v. 114, p. 9-12, Apr 2006. ISSN 0091-6765.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 11th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. xxxv, 1116 p. ISBN 0721602401.

HABIBI, H. R.; NELSON, E. R.; ALLAN, E. R. O. New insights into thyroid hormone function and modulation of reproduction in goldfish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 19-26, 2012. ISSN 0016-6480.

HADDOW, J. E. et al. An Inverse Relationship Between Weight and Free Thyroxine During Early Gestation Among Women Treated for Hypothyroidism. **Thyroid**, v. 25, n. 8, p. 949-53, Aug 2015. ISSN 1557-9077 (Electronic) 1050-7256.

HARTOFT-NIELSEN, M.-L. et al. Do Thyroid Disrupting Chemicals Influence Foetal Development during Pregnancy? **Journal of Thyroid Research**, v. 2011, p. 342189, 09/11 03/15/received 05/13/revised 06/02/accepted 2011. ISSN 2090-8067 2042-0072.

HAVILAND, J. A.; BUTZ, D. E.; PORTER, W. P. Long-term sex selective hormonal and behavior alterations in mice exposed to low doses of chlorpyrifos in utero. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 1, p. 74-79, 2010. ISSN 0890-6238.

HOBSBAWM, E. **A era dos impérios: 1875-1914**. Editora Paz e Terra, 2015. ISBN 8577532844.

HODES, G. E. et al. Neuroimmune mechanisms of depression. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1386-93, Oct 2015. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256.

IPULAN, L. A. et al. Investigation of sexual dimorphisms through mouse models and hormone/hormone-disruptor treatments. **Differentiation**, v. 91, n. 4-5, p. 78-89, Apr-Jun 2016. ISSN 1432-0436 (Electronic) 0301-4681 (Linking).

IRONSIDE, M. et al. Frontal Cortex Stimulation Reduces Vigilance to Threat: Implications for the Treatment of Depression and Anxiety. **Biol Psychiatry**, v. 79, n. 10, p. 823-30, May 15 2016. ISSN 1873-2402 (Electronic) 0006-3223.

ISHIHARA, A.; SAWATSUBASHI, S.; YAMAUCHI, K. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and to thyroid hormone receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 199, n. 1-2, p. 105-117, 2003. ISSN 0303-7207.

ISHIHARA, A.; SAWATSUBASHI, S.; YAMAUCHI, K. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and to thyroid hormone receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 199, n. 1-2, p. 105-117, Jan 31 2003. ISSN 0303-7207.

JEONG, S.-H. et al. Effect of chlorpyrifos-methyl on steroid and thyroid hormones in rat F0- and F1-generations. **Toxicology**, v. 220, n. 2-3, p. 189-202, 3/15/ 2006. ISSN 0300-483X.

JIANG, W.; DUYSEN, E. G.; LOCKRIDGE, O. Mice treated with a nontoxic dose of chlorpyrifos oxon have diethoxyphosphotyrosine labeled proteins in blood up to 4 days post exposure, detected by mass spectrometry. **Toxicology**, v. 295, n. 1-3, p. 15-22, 2012. ISSN 0300-483X.

JUGAN, M.-L.; LEVI, Y.; BLONDEAU, J.-P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 939-947, 2010. ISSN 0006-2952.

JUNG, J. et al. Impact of lingual gyrus volume on antidepressant response and neurocognitive functions in Major Depressive Disorder: A voxel-based morphometry study. **Journal of Affective Disorders**, v. 169, p. 179-187, 12/1/ 2014. ISSN 0165-0327.

KASAHARA, T. et al. Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. **Mol Psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 39-48, Jan 2016. ISSN 1476-5578 (Electronic) 1359-4184.

KHADEM, N. et al. Comparison of serum levels of Tri-iodothyronine (T3), Thyroxine (T4), and Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) in preeclampsia and normal pregnancy. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v. 10, n. 1, p. 47-52, Jan 2012. ISSN 1680-6433.

KHAN, S. A. et al. The hippocampus and executive functions in depression. **Ind Psychiatry J**, v. 24, n. 1, p. 18-22, Jan-Jun 2015. ISSN 0972-6748 (Print) 0972-6748

KITA, D. H. et al. Manipulation of pre and postnatal androgen environments and anogenital distance in rats. **Toxicology**, v. 368-369, p. 152-161, Aug 10 2016. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X.

KLEIN, S. **Health risks from exposure to endocrine disruptors**. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, 2011. p. ISBN 9781614707448 (softcover).

LASSITER, T. L. et al. The fetal brain appears to be protected from late gestational exposure to chlorpyrifos: toxicokinetic considerations. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 19, n. 3, p. 261, 1997/05/01 1997. ISSN 0892-0362.

LASSITER, T. L. et al. Gestational Exposure to Chlorpyrifos: Apparent Protection of the Fetus? **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 56-65, 1998/09/01 1998. ISSN 0041-008X.

LEVIN, E. D. et al. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, n. 6, p. 733-741, 11// 2002. ISSN 0892-0362.

LINDSEY, R. C.; MOHAN, S. Thyroid hormone acting via TRbeta induces expression of browning genes in mouse bone marrow adipose tissue. **Endocrine**, v. 56, n. 1, p. 109-120, Apr 2017. ISSN 1559-0100 (Electronic) 1355-008X.

MAKRIS, S. L. et al. A lifestage-specific approach to hazard and dose-response characterization for children's health risk assessment. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 83, n. 6, p. 530-546, 2008. ISSN 1542-9741.

MANNA, D.; ROY, G.; MUGESH, G. Antithyroid Drugs and Their Analogues: Synthesis, Structure, and Mechanism of Action. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 11, p. 2706-2715, 2013/11/19 2013. ISSN 0001-4842.

MANNING, R. P. C. et al. A systematic review of adult attachment and social anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 211, p. 44-59, 3/15/ 2017. ISSN 0165-0327.

MCCLELLAN, R. O. Chapter 2 - Concepts in veterinary toxicology. In: (Ed.). **Veterinary Toxicology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2012. p.8-36. ISBN 978-0-12-385926-6.

MEDINA-DÍAZ, I. M. et al. Organophosphate pesticides increase the expression of alpha glutathione S-transferase in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2074-2079, 2011. ISSN 0887-2333.

MEREDITH, R. M.; DAWITZ, J.; KRAMVIS, I. Sensitive time-windows for susceptibility in neurodevelopmental disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 35, n. 6, p. 335-344, 6// 2012. ISSN 0166-2236.

MILENKOVIC, M. et al. Duox expression and related H₂O₂ measurement in mouse thyroid: onset in embryonic development and regulation by TSH in adult. **Journal of Endocrinology**, v. 192, n. 3, p. 615-626, March 1, 2007 2007.

MOREIRA, E. G. et al. Toxicogenomic profiling in maternal and fetal rodent brains following gestational exposure to chlorpyrifos. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 245, n. 3, p. 310-25, Jun 15 2010. ISSN 1096-0333 (Electronic) 0041-008X.

MORROW-TESCH, J.; DAILEY, J. W.; JIANG, H. A video data base system for studying animal behavior. **J Anim Sci**, v. 76, n. 10, p. 2605-8, Oct 1998. ISSN 0021-8812 (Print) 0021-8812.

MOTONAGA, K. et al. A comparison of potency differences among thyroid peroxidase (TPO) inhibitors to induce developmental toxicity and other thyroid gland-linked toxicities in humans and rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 80, p. 283-290, 10// 2016. ISSN 0273-2300.

MUNRO, C. A. et al. Serotonin modulation of cerebral glucose metabolism: sex and age effects. **Synapse**, v. 66, n. 11, p. 955-64, Nov 2012. ISSN 1098-2396 (Electronic) 0887-4476 (Linking).

NASHED, M. G. et al. Depressive-like behaviours and decreased dendritic branching in the medial prefrontal cortex of mice with tumors: A novel validated model of cancer-induced depression. **Behav Brain Res**, v. 294, p. 25-35, Nov 01 2015. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328

NEJATY, H.; LACEY, M.; WHITEHEAD, S. A. Differing effects of endocrine-disrupting chemicals on basal and FSH-stimulated progesterone production in rat granulosa-luteal cells. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 6, p. 570-576, Jun 2001. ISSN 0037-9727.

OECD. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Organization for Economic, 1994. ISBN 9264140182.

PARK, J.; MOGHADDAM, B. Impact of anxiety on prefrontal cortex encoding of cognitive flexibility. **Neuroscience**, v. 345, p. 193-202, 3/14/ 2017. ISSN 0306-4522.

PARLATO, R. et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. **Developmental Biology**, v. 276, n. 2, p. 464-475, 2004. ISSN 0012-1606.

PAUS, T. et al. Maturation of white matter in the human brain: A review of magnetic resonance studies. **Brain Research Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 255-266, Feb 2001. ISSN 0361-9230.

PURKEY, H. E. et al. Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls Selectively Bind Transthyretin in Blood and Inhibit Amyloidogenesis: Rationalizing Rodent PCB Toxicity. **Chemistry & Biology**, v. 11, n. 12, p. 1719-1728, 2004. ISSN 1074-5521.

RAKIC, P. Evolving concepts of cortical radial and areal specification. **Changing Views of Cajal's Neuron**, v. 136, p. 265-280, 2002. ISSN 0079-6123.

RAUCH, S. A. et al. Associations of prenatal exposure to organophosphate pesticide metabolites with gestational age and birth weight. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 7, p. 1055-60, Jul 2012. ISSN 1552-9924 (Electronic) 0091-6765

ROSARIO, P. W.; PURISCH, S. Thyroid dysfunction in pregnancy: definition of TSH cut-off should precede the decision of screening in low-risk pregnant women. **Gynecological Endocrinology**, v. 27, n. 3, p. 205-208, Mar 2011. ISSN 0951-3590.

SALAS, J. H. et al. Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 15, p. 4468-71, Jul 16 2003. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561

SCHELL, L. M.; GALLO, M. V. Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 2, p. 246-253, 2010. ISSN 0031-9384.

SHONO, T. et al. The effect of a prenatal androgen disruptor, vinclozolin, on gubernacular migration and testicular descent in rats. **J Pediatr Surg**, v. 39, n. 2, p. 213-6, Feb 2004. ISSN 1531-5037 (Electronic) 0022-3468 (Linking).

SIMONA, D. A. et al. Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels Without Other Toxicity Signs in CD-1 Mice. **Toxicological Sciences**, v. 108, n. 2, p. 311-319, Apr 2009. ISSN 1096-6080.

SLOTKIN, T. A. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 198, n. 2, p. 132-151, 7/15/ 2004a. ISSN 0041-008X.

Guidelines for Developmental Neurotoxicity and Their Impact on Organophosphate Pesticides: A Personal View from an Academic Perspective. **NeuroToxicology**, v. 25, n. 4, p. 631-640, 6// 2004b. ISSN 0161-813X.

SLOTKIN, T. A. et al. Does thyroid disruption contribute to the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 284-287, 2013. ISSN 1382-6689.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 2, p. 232-241, 3// 2012. ISSN 0892-0362.

Prenatal nicotine alters the developmental neurotoxicity of postnatal chlorpyrifos directed toward cholinergic systems: Better, worse, or just “different?”. **Brain Research Bulletin**, v. 110, p. 54-67, 1// 2015. ISSN 0361-9230.

SLOTKIN, T. A. et al. Organophosphate Insecticides Target the Serotonergic System in Developing Rat Brain Regions: Disparate Effects of Diazinon and Parathion at Doses Spanning the Threshold for Cholinesterase Inhibition. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 10, p. 1542-1546, 07/27 05/16/received 07/27/accepted 2006. ISSN 0091-6765 1552-9924.

TIMOFEEVA, O. A. et al. Persistent behavioral alterations in rats neonatally exposed to low doses of the organophosphate pesticide, parathion. **Brain Research Bulletin**, v. 77, n. 6, p. 404-411, 2008.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Principles of anatomy and physiology**. 10th. New York: Wiley, 2003. xxxii, 1104, 97 p. ISBN 0471415014 (cloth alk. paper)..

UMBUZEIRO, G. D. A.; KUMMROW, F.; CARDOZO REI, F. F. Toxicologia, padrões de qualidade de água e a legislação. **InterfacEHS-Revista de Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 5, n. 1, 2010. ISSN 1980-0894.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. **Int J Androl**, v. 34, n. 6 Pt 2, p. e578-86, Dec 2011. ISSN 1365-2605 (Electronic) 0105-6263 (Linking).

VANDENBERG, L. N. et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. **Endocrine reviews**, v. 33, n. 3, p. 378-455, 2012. ISSN 0163-769X.

VENEROSI, A. et al. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring – a mouse study. **Environmental Health**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015. ISSN 1476-069X.

WANG, L. et al. Reversible effect of developmental exposure to chlorpyrifos on late-stage neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus in mouse offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 38, p. 25-36, 7// 2013. ISSN 0890-6238.

WAUNG, J. A.; BASSETT, J. H. D.; WILLIAMS, G. R. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 155-162, 2012. ISSN 1043-2760.

WEISS, B. Same sex, no sex, and unaware sex in neurotoxicology. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 5, p. 509-517, 2011. ISSN 0161-813X.

WHITE, R. K. Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic-Chemicals, Vol 2, Solvents - Howard, Ph. **Risk Analysis**, v. 12, n. 1, p. 163-163, Mar 1992. ISSN 0272-4332.

YADAV, V. K. et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. **Cell**, v. 138, n. 5, p. 976-89, Sep 04 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking).

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, Jul 2001. ISSN 0031-9333.

Molecular basis of resistance to thyroid hormone. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 7, p. 327-333, Sep 2003. ISSN 1043-2760.

ZANOVELI, J. M. et al. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 8, p. 1079-88, Sep 2010. ISSN 1469-5111 (Electronic) 1461-1457

ZHAO, Q.; GADAGBUI, B.; DOURSON, M. Lower birth weight as a critical effect of chlorpyrifos: A comparison of human and animal data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 55-63, 2005. ISSN 0273-2300.

ZOELLER, R. T.; TAN, S. W. Implications of research on assays to characterize thyroid toxicants. **Crit Rev Toxicol**, v. 37, n. 1-2, p. 195-210, Jan-Feb 2007. ISSN 1040-8444.