

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA
DE IMIDACLOPRIDO EM RATOS WISTAR

BRUNA DUCATTI TONIETTO

Porto Alegre, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA
DE IMIDACLOPRIDO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada por **Bruna
Ducatti Tonietto** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo
Co-orientadora: Profa. Dr^a. Mirna Bainy Leal

Porto Alegre, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22 de setembro de 2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Aline Rigon Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Flavia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Prof^a. Dr^a. Rosane Gomez

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Göethel (Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Tonietto, Bruna Ducatti
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA DE IMIDACLOPRIDO
EM RATOS WISTAR / Bruna Ducatti Tonietto. -- 2021.
109 f.
Orientador: Marcelo Dutra Arbo.

Coorientador: Mirna Bainy Leal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Toxicologia. 2. Neonicotinoide. 3. Imidacloprido. 4. Toxicidade subcrônica. 5. Avaliação comportamental em roedores. I. Arbo, Marcelo Dutra, orient. II. Leal, Mirna Bainy, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo e co-orientação da Prof. Dr^a Mirna Bainy Leal, no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS). A pesquisa foi financiada pelos projetos Fapergs (Programa Pesquisador Gaúcho – PqG – edital 05/2019). Bruna Ducatti Tonietto recebeu bolsa de estudos da CAPES.

“I have loved the stars too fondly to be fearful of the night.”

Sarah Williams

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro de vida Marcos. Tu foste e és uma fonte de força e inspiração para mim. Teu apoio foi essencial para a finalização desta etapa, desde etiquetar eppendorfs até as caronas de final de semana ao CREAL. Te amo e sou muito grata por dividir minha trajetória contigo e pela nossa família com a Arya.

Agradeço aos meus pais, Beatriz e Airton, e avós maternos, Leonides e Armando, que sempre apoiaram meus estudos e forneceram uma base sólida para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Sou grata pelo apoio e incentivo ao meu sonho de ingressar no mestrado e por entenderem e respeitarem minha ausência. Amo vocês!

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo pelo apoio, orientação durante esta etapa e por aguardar pacientemente minha trajetória de aprendizado. Sou grata também por ter aceitado me orientar mesmo sem me conhecer. Agradeço pelas responsabilidades e análises de parcerias que tu fornecestes durante este tempo e por confiar e acreditar no meu potencial, até quando eu mesma não acreditava.

Agradeço a Profa. Dra. Mirna Bainy Leal pela orientação, apoio desde a iniciação científica. Tu foste essencial na minha escolha de entrar e seguir na vida acadêmica. Diversos momentos durante minha trajetória foram impactados pelas tuas palavras e por duas vezes decidi recalculá-la e alterar minhas escolhas futuras com teu apoio e por isso sou muito grata. O destino me concedeu a oportunidade de ser monitora em Farmacologia I em 2016 e desde então contar com tua presença na minha vida.

Agradeço equipe do LATOX, em especial aos alunos do Prof. Dr. Marcelo, pela acolhida, ensinamentos e apoio ao meu trabalho. O auxílio de vocês foi essencial para realizar os experimentos. Hoje entendo que um trabalho como esse é feito por mais do que apenas duas mãos. Sem vocês essa etapa seria muito mais difícil, muito obrigada por tanto!

Agradeço a Profa. Dra. Eliane Dallegrave que auxiliou na elaboração do projeto e nas eutanásias junto com suas alunas.

Agradeço a Fernanda Kechinski pela possibilidade de auxiliar no teu trabalho de conclusão de curso. A convivência, conversa, experimentos e escrita em conjunto contigo me fizeram enxergar meu papel como aluna de outro ângulo e proporcionou um crescimento que nem imaginava ser possível em tão pouco tempo.

Agradeço aos animais que deram sua vida para realização deste trabalho mesmo sem o poder de escolha. Os 6 meses de convivência com eles trouxe a oportunidade de ajustar meus princípios e minhas escolhas de vida.

Agradeço ao fomento da CAPES, através da concessão da bolsa, e a FAPERGS, através dos recursos financeiros.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a Faculdade de Farmácia, ao LATOX e ao CREAL por fornecerem a estrutura para realização deste trabalho.

Agradeço ao destino por permitir essa oportunidade de crescimento e evolução. A Bruna que ingressou no mestrado em 2019 não é a mesma que escreve esse agradecimento em 2021. Minha transformação enquanto pessoa foi – e ainda é – intensa e incrível. E por fim, agradeço ao universo pela possibilidade de viver nesse espaço-tempo e pelas estrelas por me guiarem nessa empreitada que é a vida.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicação a ser submetida e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Revisão da Literatura, Artigo científico a ser submetido presente no Capítulo I, Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta de uma forma geral o embasamento teórico no qual a proposta deste trabalho foi construída. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências Bibliográficas pertinentes à publicação específica encontram-se dentro do Capítulo I.

A seção Discussão contém a interpretação geral dos resultados obtidos.

A seção Conclusão aborda as conclusões gerais da dissertação.

A seção Referências Bibliográficas lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão

A seção "Anexo" contém a carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS.

RESUMO

Até a década de 90, as principais classes de agrotóxicos comercializados eram carbamatos, organofosforados e piretróides, porém diversos organismos vinham tornando-se resistentes aos mesmos, então foi necessário o desenvolvimento de uma nova classe. Portanto, em 1991, foi lançado o imidacloprido (IMI), o primeiro inseticida neonicotinoide. O IMI é amplamente utilizado para proteção de culturas contra pragas, tem uso residencial em jardins e aplicações veterinárias para controle de doenças em animais. O mecanismo de ação do IMI é o agonismo de receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina (nAChRs), sendo 565 vezes mais específico para nAChRs de insetos, embora haja relatos de toxicidade em mamíferos e outras espécies. Os estudos sobre a neurotoxicidade e toxicidade sistêmica de IMI não são conclusivos, portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos subcrônico de uma formulação comercial a base de IMI em ratos. Ratos Wistar machos adultos foram divididos em 4 grupos, o grupo controle recebeu água e os grupos tratados receberam suspensão do inseticida MUCH® (Albaugh Agro Brasil Ltda) em água nas concentrações de 1,5; 5 e 15 mg/kg. O tratamento foi administrado por via oral e teve duração de 45 dias. A toxicidade comportamental foi avaliada em testes de coordenação e atividade motora, memória, atenção e aprendizado. A toxicidade sistêmica foi avaliada por meio de análises hematológicas, bioquímicas e de estresse oxidativo. Os resultados apontam para prejuízos comportamentais por aumento no *rearing*, no tempo dispendido na periferia no teste de atividade locomotora e diminuição no tempo para completar a tarefa do OX Maze ($p < 0,05$; ANOVA/Bonferroni). Além disso, foi observada uma diminuição na hemoglobina corpuscular média e na concentração de hemoglobina corpuscular média ($p < 0,05$; ANOVA/Bonferroni) e aumento na atividade da butirilcolinesterase sérica ($p < 0,001$; ANOVA/Bonferroni). Assim, observamos que a administração subcrônica do agrotóxico MUCH®, contendo IMI na sua composição, causa alterações comportamentais e sistêmicas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de neurotoxicidade e possíveis danos em órgãos como baço, coração, fígado e rins.

Palavras-chave: IMI, toxicidade subcrônica, atividade locomotora, OX Maze, hemoglobina, butirilcolinesterase.

ABSTRACT

Until the 90s the pesticide market was centered on carbamates, organophosphates and pyrethroids, however several organisms had or were developing resistance, thus it was necessary to develop a new class of pesticides. Therefore, in 1991, imidacloprid (IMI) was launched as the first neonicotinoid insecticide. IMI is widely used for crop protection against pests, has residential use in gardens and veterinary applications to animal diseases control. IMI is an agonist of postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), being 565 times fold more specific for insects' nAChRs, although there are reports of toxicity in mammals and other species. Studies on IMI neurotoxicity are not conclusive, therefore the aim of this study was to evaluate subchronic toxic effects of an IMI based commercial pesticide on rats. Male Wistar adult rats were divided on 4 groups, control group received distilled water and the treated groups received suspension of MUCH® (Albaugh Agro Brasil Ltda) pesticide on water in the concentrations of 1.5; 5 and 15 mg/kg. The treatment was administrated by oral route for 45 days. Behavioral toxicity was evaluated using motor coordination and activity, memory and learning tasks. Systemic toxicity was assessed using hematological, biochemical and oxidative stress analysis. Our results pointed to behavioral impairments by increase in rearing and time spent in periphery in locomotor activity test and decrease in time to finish the OX Maze task ($p < 0.05$; ANOVA/Bonferroni). Systemic toxicity was demonstrated by decrease in mean corpuscular hemoglobin and mean corpuscular hemoglobin concentration ($p < 0.05$; ANOVA/Bonferroni) and increase on serum butyrylcholinesterase ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni). Therefore, it was observed that subchronic administration of pesticide containing IMI causes behavioral and systemic impairments. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms of neurotoxicity and possible damages in organs such as spleen, heart, liver and kidneys.

Keywords: imidacloprid, subchronic toxicity, locomotor activity, OX Maze, hemoglobin, butyrylcholinesterase.

LISTA DE ABREVIATURAS

AChe	Acetilcolinesterase
ACh	Acetilcolina
AST	Aspartato Aminotransferase
AST	Alanina Aminotransferase
BuChE	Butirilcolinesterase
CCD	Distúrbio De Colapso De Colônia
CEUA	Comissão De Ética No Uso De Animais
CHCM	Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média
CREAL	Centro De Reprodução E Experimentação De Animais De Laboratório
FAL	Fosfatase Alcalina
IMI	Imidacloprido
LDH	Lactato Desidrogenase
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
mAChR	Receptor Muscarínico De Acetilcolina
MDA	Malondialdeído
nAChR	Receptor Nicotínico De Acetilcolina
NOEL	No Observed Effect Level
RPM	Rotação Por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico
UFRGS	Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	25
1. Objetivo Geral	27
2. Objetivos Específicos	27
REVISÃO DE LITERATURA	29
1. Neonicotinoides	31
1.1 Imidacloprido	32
2. Avaliação comportamental em roedores	33
2.1 Rota-rod	34
2.2 Atividade locomotora	35
2.3 Reconhecimento de objetos	37
2.4 OX Maze	38
3. O papel da acetilcolina no sistema nervoso central	40
CAPÍTULO I: ARTIGO	
Imidacloprid based commercial pesticide causes behavioral, biochemical and hematological impairments in Wistar rats.	45
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO	87
PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS	107
ANEXO I: Carta de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS	109

Agrotóxicos são utilizados com a finalidade de prevenir, remover ou exterminar pragas e são amplamente utilizados para proteger plantações na agricultura e para combater vetores de doenças na saúde pública (KIM; KABIR; JAHAN, 2017). Em 2018, foram comercializadas 549.280,44 toneladas de ingrediente ativo de agrotóxicos no Brasil segundo relatório do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). O Rio Grande do Sul foi o segundo estado que mais comercializou ingredientes ativos de agrotóxicos, totalizando 11,66% deste montante, ficando atrás apenas de São Paulo, sendo este o dado mais atual até então (IBAMA, 2019).

O mercado de agrotóxicos, até 1990, era centralizado em três classes: carbamatos, organofosforados e piretróides. No entanto, diversos organismos já desenvolveram ou estavam desenvolvendo resistência aos mesmos, portanto fez-se necessário o desenvolvimento de uma nova classe de agrotóxicos. A partir desta demanda foram elaborados os inseticidas neonicotinóides (ELBERT et al., 2008). O imidacloprido (IMI) foi o primeiro representante da classe dos neonicotinóides a ser lançado em 1991 pela Bayer CropScience (JESCHKE et al., 2011) e desde então é extensivamente utilizado devido a sua ampla gama de atuação, desde a agricultura, uso residencial para controle de pragas e também aplicação em uso veterinário para controle de doenças em animais (BUCKINGHAM et al., 1997; NAGATA et al., 1998). Este foi o décimo ingrediente ativo de agrotóxico mais comercializado no Brasil em 2019 totalizando 9.214,45 toneladas em vendas (IBAMA, 2019) sendo este o dado mais atualizado referente ao Brasil.

O mecanismo de ação do IMI é baseado no agonismo de receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos (nAChRs) (MATSUO; TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1998; TOMIZAWA; CASIDA, 2005), sendo 565 vezes mais específico para receptores nAChRs de insetos em relação a de mamíferos e outras espécies vertebradas (CHAO; CASIDA, 1997; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; ZHANG et al., 2000; SIMON-DELSO et al., 2015). Além disso, a seletividade do IMI por receptores de insetos é ainda maior do que outras classes de agrotóxicos como por exemplo metilcarbamatos, organofosforados e organoclorados (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

No entanto, há relatos de toxicidade de IMI em diversas espécies: danos em prole de ratas e peixes-zebra tratados (ABOU-DONIA et al., 2008; CROSBY et al., 2015), acúmulo de metabólitos de biotransformação em cérebro de lagarto (*Eremias argus*) (WANG et al., 2018), diminuição na atividade locomotora espontânea e limiar de dor em ratos Wistar (LONARE et al., 2014), indícios de efeito excitatório em cultura celular de neurônios cerebelares de ratos neonatos (KIMURA-KURODA et al., 2012) e em neurônios humanos ($\alpha 4\beta 2$) com receptores nicotínicos (LI; ANN; AKK, 2011).

Diversos estudos demonstram que agrotóxicos são nocivos tanto para os trabalhadores do campo quanto para consumidores via alimentos e bebidas (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011; KIM; KABIR; JAHAN, 2017), podendo estar ligado a doenças metabólicas (FOLEY et al., 2018; JIN et al., 2018), imunotoxicidade (DI PRISCO et al., 2013; DAISLEY et al., 2017; LIU; FU; JIN, 2017; LEUNG-GURUNG et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018), distúrbios endócrinos e reprodutivos (JIN et al., 2012, 2013; HOCINE et al., 2016; CREMONESE et al., 2017; SAMTANI; SHARMA; GARG, 2018; BERNIERI et al., 2019), neurotoxicidade (LI; ANN; AKK, 2011), câncer (ZHAO et al., 2012; VOPHAM et al., 2017), além de afetar a microbiota intestinal (YUAN et al., 2019).

O IMI tem substituído a utilização de outras classes de agrotóxicos por sua seletividade, porém diversos estudos têm apontando para uma possível toxicidade apesar de sua aparente segurança para mamíferos e outras espécies não alvo (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Neste sentido, considerando sua potencial toxicidade, este estudo contribui para o avanço da compreensão dos efeitos comportamentais, bioquímicos, hematológicos e de estresse oxidativo causados pela utilização de IMI em ratos Wistar após administração subcrônica.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

- Avaliação da toxicidade subcrônica da formulação comercial MUCH®, cujo ingrediente ativo é o IMI, em ratos Wistar adultos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração de formulação comercial de IMI sobre a locomoção e coordenação motora dos animais;
- Avaliar os efeitos da administração de formulação comercial de IMI sobre a memória, atenção e aprendizado;
- Avaliar os efeitos da administração de formulação comercial de IMI em parâmetros bioquímicos séricos;
- Avaliar os efeitos da administração de formulação comercial de IMI em parâmetros hematológicos;
- Avaliar os efeitos da administração de formulação comercial de IMI em biomarcadores do estresse oxidativo periféricos.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Neonicotinoides

Os neonicotinoides foram desenvolvidos baseados na estrutura do alcaloide (S)-nicotina, presente no extrato aquoso de tabaco, que antigamente era utilizado como inseticida natural (JESCHKE et al., 2011). Atualmente, estão disponíveis no mercado sete compostos neonicotinoides: imidacloprido, nitempiram, acetamiprido, tiametoxam, tiacloprido, clotianidina e dinotefurano (JESCHKE et al., 2011).

Os neonicotinoides são utilizados para controlar pragas de insetos em uma variedade de ambientes agrícolas, comerciais, residenciais e veterinários (BUCKINGHAM et al., 1997; NAGATA et al., 1998), sendo uma das classes com maior crescimento de uso no mundo (ABOU-DONIA et al., 2008). Atualmente, dentre os inseticidas disponíveis, são a classe mais relevante e eficaz e possuem registro em mais de 120 países e com utilização em cerca de 140 cultivos (NAUEN; JESCHKE; COPPING, 2008; JESCHKE et al., 2011).

O IMI foi o primeiro representante da classe, lançado em 1991 pela Bayer CropScience. Este foi sucedido pelo nitempiram (Sumitomo Chemical Takeda Agro Co.) e pelo acetamiprido (Nippon Soda), ambos introduzidos no mercado em 1995. O tiametoxam (Syngenta) foi introduzido ao mercado em 1998, seguido pelo tiacloprido (Bayer CropScience) em 2000 e pela clotianidina (Sumitomo Chemical Takeda Agro Co./Bayer CropScience) em 2001. Por fim, em 2002, foi apresentado o dinotefurano (Mitsui Chemicals), sendo este o último representante da classe até então (JESCHKE et al., 2011; BASS et al., 2015;). A figura 1 esquematiza os lançamentos dos neonicotinoides e o respectivo laboratório responsável em uma linha do tempo.

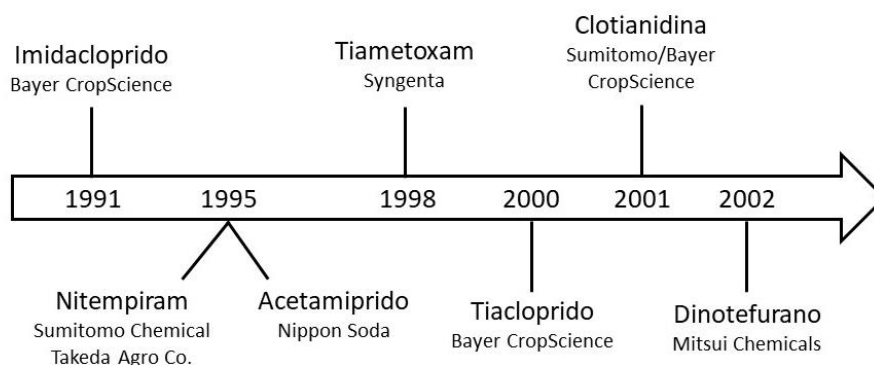


Figura 1. Linha do tempo referente ao ano e laboratório responsável pelo lançamento dos inseticidas neonicotinoides.

A comercialização de IMI movimentou o montante de \$2,632 bilhões de dólares em 2009, representando aproximadamente 41,5% de todo o comércio de neonicotinoides (JESCHKE et al., 2011). A comercialização de IMI, tiametoxam e clotianidina foi responsável por quase 85% do total de vendas de neonicotinoides em 2012. Em 2014, os neonicotinoides totalizaram mais que 25% das vendas totais de inseticidas (BASS et al., 2015). Em 2019, foi o décimo ingrediente ativo de agrotóxico mais comercializado no Brasil com o total de vendas de 9.214,45 toneladas (IBAMA, 2019) sendo este o dado mais atualizado referente ao Brasil.

1.1 Imidacloprido

A ANVISA concedeu registro ao IMI em 1994 para utilização no Brasil e atualmente existem 37 produtos comerciais registrados contendo IMI como ingrediente ativo, correspondendo a 12 diferentes formulações. A sua aplicação abrange mais de 40 culturas, desde sementes como amendoim, arroz, aveia, feijão, milho, soja e trigo; na aplicação da área foliar de diversas frutas e verduras, e ainda no solo das culturas de cana-de-açúcar, café, fumo e uva (IBAMA, 2019). Países europeus como Itália, Alemanha e França proibiram sua utilização como agrotóxico devido a sua possível relação com Distúrbio de Colapso de Colônia (CCD), caracterizado pelo abandono súbito das abelhas de suas colmeias (HENRY et al., 2012; WHITEHORN et al., 2012). Além de representar uma possível ameaça a diversas espécies animais (HALLMANN et al., 2014; VIJVER; BRINK, 2014; GIBBONS; MORRISSEY; MINEAU, 2015; PISA et al., 2015; RABY et al., 2018; PARKINSON; GRAY, 2019), incluindo humanos (WANG et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Assim como os demais neonicotinoides, o mecanismo de ação do IMI é o agonismo de receptores nicotínicos pós-sinápticos de acetilcolina (nAChRs) (MATSUO; TOMIZAWA; YAMAMOTO, 1998; TOMIZAWA; CASIDA, 2005), apresentando especificidade 565 vezes maior para receptores nAChRs de

insetos em relação a de mamíferos e outras espécies vertebradas, especialmente pelo nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (CHAO; CASIDA, 1997; ZHANG et al., 2000; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; SIMON-DELSO et al., 2015). Apesar da sua expressiva seletividade, há relatos de toxicidade relativamente baixa em mamíferos, demonstrando uma significativa margem de segurança (TOMIZAWA; CASIDA, 2005), devido a sua baixa penetração pela barreira hematoencefálica (YAMAMOTO et al., 1995).

Exposição a baixas doses (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de IMI e dois de seus metabólitos a gafanhotos (*Locusta migratoria*) afetou a capacidade de voo e o comportamento de evitamento de colisão, sugerindo neurotoxicidade (PARKINSON; GRAY, 2019). Exposição a IMI a peixes-zebra (*Danio rerio*) em baixa concentração alterou parâmetros de estresse oxidativo e a microbiota intestinal (LUO; WANG; YUANXIANG, 2021). Wang (2018) relatou que a biotransformação do IMI em lagarto (*Eremias argus*) causa acúmulo de metabólitos no cérebro e estresse oxidativo em tecidos, especialmente no rim. Há estudos demonstrando que o IMI causou danos ao desenvolvimento neurocomportamental de ratos adolescentes após exposição durante a gestação (ABOU-DONIA et al., 2008) e há indícios que a administração de IMI nas doses 45 e 90 mg/kg a ratos Wistar machos diminui atividade locomotora espontânea e estimula a sensação de dor junto com alterações cerebrais (LONARE et al., 2014).

2. Avaliação comportamental em roedores

Modelos animais são utilizados para avaliação comportamental pela possibilidade de correlação entre a neurobiologia animal e humana. A avaliação de comportamentos animais e sua correspondência com o comportamento humano é baseado em publicações de Charles Darwin que observou a semelhança entre o estado mental de humanos e animais e expressão do estado da mente pelos mesmos movimentos. Ou seja, a expressão emocional de humanos e outros mamíferos é preservada filogeneticamente (DARWIN, 1872).

Portanto, modelos animais foram desenvolvidos para mimetizar condições fisiológicas e patológicas humanas e a partir destes resultados é possível estudar

estados emocionais, etiologia de doenças e potenciais tratamentos farmacológicos de modo preliminar. Ademais, o estudo de comportamento em animais permitiu elucidar a patogenia, mecanismo de ação de medicamentos, efeitos tóxicos, teratogênese, entre outros. Porém, é inegável que estes modelos são limitados, tendo em vista a complexidade biológica e genética de humanos. A translação de dados obtidos em animais para humanos é um desafio, porém estes estudos em animais forneceram uma base e um ponto inicial importante (LISTER, 1990).

Os estudos comportamentais na toxicologia têm como objetivo avaliar efeito da exposição a alguma substância possivelmente tóxica e a geração de efeitos que excedem a capacidade do organismo de se ajustar e identificar a natureza destas disfunções. Além disso, fornece informações sobre efeitos de uso agudo e prolongado e ajuda a estabelecer limites de segurança como os níveis nos quais não é observado efeitos, auxiliando a apontar segurança na utilização destas substâncias em humanos (RUSSEL, 1991).

A análise comportamental é uma medida não invasiva, pois não depende de coleta de fluidos e tecidos para avaliar a ação de uma substância química no cérebro, inclusive podem ser aplicados repetidamente para estudar efeitos progressivos. A utilização de animais tem importante papel pois os testes com humanos para avaliação comportamental é drasticamente limitada por motivos éticos (RUSSEL, 1991).

2.1 Rota-rod

O teste do rota-rod (fig. 2) foi desenvolvido por Jones & Roberts (1968) para avaliar coordenação motora e equilíbrio quando o roedor é posicionado em uma barra em rotação (CURZON, 2009). O equipamento permite a configuração de velocidade e diversas opções de rotação por minuto (RPM) e quanto maior a RPM, mais difícil torna-se o teste. É importante a realização prévia de um treino para habituação do animal ao aparato novo pois este parâmetro pode afetar os resultados obtidos.

O teste é utilizado para avaliar comportamentalmente o cerebelo que é essencial para que a função e coordenação motora existam. O rota-rod é descrito na literatura inclusive como uma ferramenta para exclusão de animais com grandes anormalidades motoras que possam interferir em testes comportamentais conduzidos posteriormente (CRAWLEY, 1999).

O teste de rota-rod foi utilizado para avaliar a coordenação motora em ratos expostos a administração subcrônica de levamisol, demonstrando impacto na latência para cair do aparato (LAURENTINO et al., 2021). Animais tratados com dizocilpine, composto utilizado para mimetizar modelo de esquizofrenia, apresentaram desempenho inferior na tarefa do que animais controle (ANDRABI et al., 2019).



Figura 2. Equipamento Rota-rod para ratos (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, Brasil). Fonte: <<https://insightltda.com.br/produto/eff-411-rota-rod-para-ratos/>>

2.2 Atividade locomotora

O teste do campo aberto foi criado por Hall (1934) e logo tornou-se um dos testes comportamentais mais utilizados para avaliação psicológica e de

comportamento espontâneo de roedores (WALSH; CUMMINS, 1976). O primeiro aparato de campo aberto é descrito como uma arena circular circunscrita por uma parede, impedindo o contato do animal com o exterior do experimento e diminuindo possíveis variáveis no experimento. O aparato pode ser circular ou quadrado, sendo este último o mais comum atualmente. O animal é posicionado próximo a parede e seus movimentos na arena que era dividida em áreas era observado (WALSH; CUMMINS, 1976).

O monitor de atividade IR (fig. 3) foi desenvolvido como uma automação e aperfeiçoamento do teste do campo aberto. Os movimentos do roedor são captados por sensores de infravermelho e convertidos em dados como distância percorrida, velocidade média, *rearing*, *grooming* e movimentos circulares horário e anti-horário por um software.

O *rearing* é considerado um comportamento exploratório no qual o corpo do animal é verticalizado, as patas dianteiras são elevadas, permanecendo temporariamente sustentado pelas patas traseiras. O *rearing* tem como função principal ampliar, quando exposto a um novo ambiente, ou atualizar, quando re-exposto ao mesmo ambiente, a coleta de informações sobre o mesmo, auxiliando na formação de um mapa cognitivo espacial. Ademais, esta exploração fornece informações importante para decisão de defesa do animal no ambiente pela aproximação ou afastamento de algum local (LEVER; BURTON; O'KEEFE, 2006).

O *grooming* é um comportamento inato de roedores com objetivo de limpeza da pele e da pelagem em movimentos estereotipados. Este comportamento acontece em condições normais e também em condições de estresse. Em condições normais, ratos apresentam o *grooming* de modo cefalocaudal de maneira organizada e estereotipada. Em condições de estresse, como no teste do campo aberto, os animais podem expressar *grooming* de maneira ininterrupta em sequência desorganizada a depender do nível de ansiedade (BOLLES, 1960; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992).

O teste de atividade locomotora apontou aumento na distância total percorrida por ratos após tratamento subcrônico com benzo(a)pireno (MACIEL

et al., 2014). Animais tratados com morfina também apresentaram aumento na atividade locomotora (ZHANG; KONG, 2017).



Figura 3. Equipamento monitor de atividade IR (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, Brasil). Fonte: <<https://insightltda.com.br/produto/ep-149-monitor-de-atividades-ir/>>

2.3 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos (fig. 4) foi desenvolvido por Ennaceur and Delacour (1988) para avaliar a memória de reconhecimento que é a habilidade de distinguir objetos novos e objetos familiares (KINNAVANE; ALBASSER; AGGLETON, 2015). O teste consiste em inserir o rato em uma arena retangular aberta na qual estão dispostos dois objetos idênticos (objeto A) por um determinado tempo. O animal tende a explorar os objetos por ser um novo estímulo até que eles se tornam familiares e o tempo dispendido diminui. Então o animal é removido da arena e um dos objetos A é trocado por um novo objeto (objeto B) (DELLU et al., 1992; ANDREWS et al., 1995). Os animais normalmente gastarão mais tempo explorando o novo objeto em detrimento ao objeto antigo quando retornarem à arena (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

O teste foi popularizado e tornou-se amplamente utilizado por ser simples, efetivo e não necessitar de privação de água ou alimento, portanto avalia a

memória não associativa pois não depende de um estímulo positivo nem aversivo. Inclusive é possível avaliar memória de curta e longa duração alterando o intervalo de tempo entre a habituação e a reintrodução do animal no aparato (KINNAVANE; ALBASSER; AGGLETON, 2015).

O teste de reconhecimento de objetos aplicado em ratos submetidos a tratamento subcrônico com cafeína e taurina em associação demonstrou melhora na memória de curto prazo (VALLE et al., 2018). O antidepressivo agomelatina administrada em dose única por via intraperitoneal em ratos melhorou a performance no teste de reconhecimento de objetos (BERTAINA-ANGLADE et al., 2011).

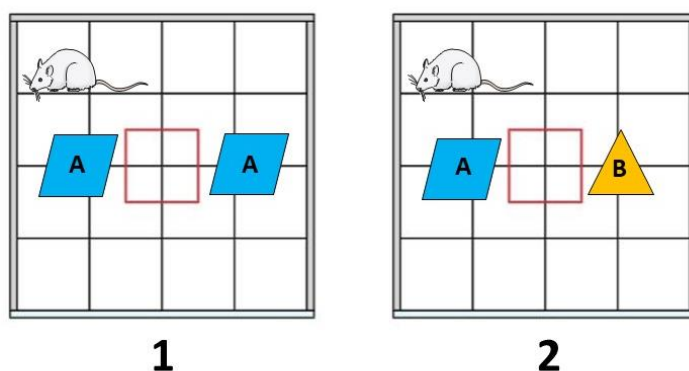


Figura 4. Esquema do teste de reconhecimento de objetos. Habituação inicial aos objetos (1). Teste de reconhecimento de objetos realizado após a habituação (2).

2.4 OX Maze

O teste OX Maze (fig. 5) foi desenvolvido por Wood e colaboradores em 2011 com objetivo inicial de ser utilizado como enriquecimento ambiental para camundongos em modelos de doença de Huntington. Esta doença tem como parte de sua manifestação a degeneração progressiva do estriado e do córtex causando perda de função cognitiva e motora (REDDY; HEMACHANDRA; TAGLE, 1999). O teste OX Maze é diferenciado dos demais testes de atenção e aprendizado existentes pois foi projetado para ter pouca movimentação corporal,

devido à dificuldade locomotora dos animais no modelo de doença de Huntington e utilizar pistas visuais.

Princípios descritos por Skinner (1988) sobre aprendizagem demonstra que uma ação ou resposta quando seguida de um estímulo positivo ajuda este comportamento acontecer mais frequentemente, enquanto um estímulo negativo reforça o detrimento de um comportamento. O aprendizado e memorização no OX Maze acontecem apenas por reforço positivo, pois o teste utiliza como base recompensas em forma de alimento com um pellet (Froot loops®, Kellogs) mais palatável que o alimento de consumo usual do animal. Portanto, não há necessidade de jejum para realização do teste para que o animal esteja com fome e consuma a comida dentro do ambiente do teste (WOOD; GLYNN; MORTON, 2011).

O labirinto para o teste OX Maze é disposto no aparato onde foi executado previamente o teste de atividade locomotora. Os blocos utilizados no teste contêm um orifício em cada lateral, cada orifício é circunscrito por um símbolo (O, X, =, | |). O orifício circunscrito pelo símbolo O contém uma recompensa, portanto cada bloco contém apenas uma recompensa. Logo, cada animal pode encontrar até quatro recompensas por dia de teste. Quatro blocos são dispostos no aparato como descrito na figura 5. O teste é realizado por 10 dias consecutivos para possibilitar o entendimento da tarefa e a consolidação do aprendizado.

Durante este período os quatro blocos onde se encontram as recompensas são girados em sentido horário. Desta forma não há associação entre a localização da recompensa em relação ao aparato e a sala onde é realizado o teste e sim a pista visual representada pelo símbolo circunscrito na posição onde é colocada recompensa.

Atualmente existem apenas quatro artigos publicados aplicando o teste do OX Maze. Após o seu desenvolvimento por Wood e colaboradores em 2011, este foi aplicado em duas ocasiões para avaliar o impacto na memória e aprendizado de ratos submetido a hipóxia neonatal (WOOD; GLYNN; MORTON, 2011; ROJAS et al., 2015; DENIZ et al., 2018). Posteriormente Valle e colaboradores em 2018 utilizaram o mesmo para avaliar o impacto de bebida

energética e seus constituintes na memória, aprendizado e atenção de ratos (VALLE et al., 2018).

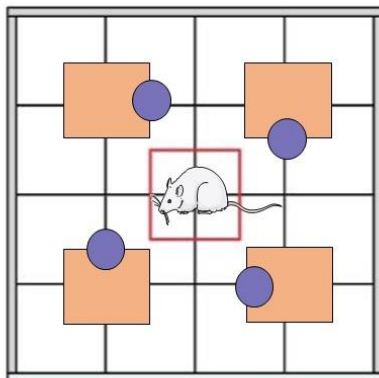


Figura 5 – Esquema do teste do OX Maze. Os quadrados laranja representam os quatro blocos dispostos na arena do teste. O círculo roxo representa a localização da pista visual O circunscrita na lateral, onde é colocada a recompensa.

3. O papel da acetilcolina no Sistema Nervoso Central

A acetilcolina (ACh) foi identificada por Henry Hallett Dale em 1914 e sua função como neurotransmissor foi descrita por Otto Loewi em 1921. O Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina foi concedido a ambos de 1936 por elucidar a função da ACh e sua relação com a transmissão química de impulsos nervosos (TANSEY, 2006).

A ACh apresenta importante papel em funções essenciais como a transmissão química na junção neuromuscular, função autonômica no sistema nervoso periférico e processos cognitivos mediados pelo sistema nervoso central (SNC), como atenção, aprendizagem, memória e plasticidade (PEPEU; GIOVANNINI, 2004; CONNER; CHIBA; TUSZYNSKI, 2005; BERTRAND; WALLACE, 2020). Nos gânglios autonômicos e junções neuromusculares a ACh é um neurotransmissor de ação rápida, e no cérebro a ACh participa da neuromodulação da liberação de neurotransmissores e na excitação dos neurônios, coordenando o disparo dos mesmos (CHANGEUX, 2010).

O papel do sistema colinérgico foi elucidado a partir de pesquisas usando modelos animais com lesões colinérgicas e pela manipulação genética para estudo da farmacologia do receptor e sua conexão com atenção, aprendizagem e memória (BERTRAND; WALLACE, 2020). O papel da neurotransmissão colinérgica para o funcionamento do SNC também é estudado a partir da fisiopatologia, evolução clínica e possíveis tratamentos para doenças como Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e *miastenia gravis* que causam degeneração progressiva das funções neurais (BLUSZTAJN; BERSE, 2000; KOTHARI, 2004). Os neurônios colinérgicos presentes no SNC deste sistema neurotransmissor podem ser classificados de acordo com sua topografia das projeções nervosas e características celulares em oito grupos de Ch1 a Ch8. Neurônio dos grupos Ch1 e Ch2 fornecem inervação colinérgica para o complexo hipocampal, Ch3 para o bulbo olfatório, Ch4 para o córtex cerebral e amígdala, Ch5 e Ch6 para o tálamo, Ch7 para o núcleo interpeduncular e Ch8 para o colículo superior (MESULAM et al., 1983).

A ACh pode se ligar a dois diferentes receptores colinérgicos: muscarínico e nicotínico. Estes foram nomeados por Henry Dale em 1914 baseado na sua capacidade intrínseca de ligar-se a muscarina e nicotina respectivamente, causando ativação colinérgica (DALE, 1914). Os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs) pertencem a uma superfamília de receptores acoplados a proteína G presente no sistema nervoso periférico e central. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) pertencem a família de receptores ionotrópicos e quando ativos tornam-se um canal aberto permeável a íons de sódio e potássio e estão presentes no sistema nervoso periférico e central, na junção neuromuscular, nos neurônios dos gânglios parassimpáticos e em células não neuronais (VERMA et al., 2018; BERTRAND; WALLACE, 2020).

A ACh é concentrada em vesículas sinápticas pois faz parte das sinapses colinérgicas. Quando há sinalização, estas vesículas fundem-se com a membrana dos terminais sinápticos no axônio dos neurônios. Receptores presentes na parte exterior da vesícula e na porção interior da membrana dos terminais sinápticos do axônio coordenam a fusão (POHANKA, 2020). Alguns componentes com uma função importante nesta fusão são N-etilmaleimida, sinaptotagmina, sinaptobrevina e proteína-25 associada a sinaptossomas

(MCMAHON et al., 1995; SEARL; SILINSKY, 2006). O cálcio interage com a sinaptotagmina e permite a interação da sinaptobrevina com a proteína-25 associada a sinaptossomas promovendo a fusão da membrana da vesícula à membrana do neurônio (SHARRAD; GAI; BROOKES, 2013).

A neurotransmissão é finalizada quando a ACh é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em ácido acético e colina, pois ambos não possuem função neurotransmissora (POHANKA, 2020). Novas moléculas de ACh são sintetizadas pela enzima colina-acetiltransferase à medida que o precursor colina é bombeada pelo transportador de colina acoplado ao sódio para dentro do terminal pré-sináptico (DOBRANSKY; RYLETT, 2005).

A AChE é expressa principalmente em tecidos que recebem inervação colinérgica, como neurônios, células musculares e células do sistema nervoso e está presente nas fibras motoras e sensoriais exercendo maior atividade nos neurônios motores do que nos neurônios sensoriais (ZIMMERMAN; SOREQ, 2006). A AChE está presente em menor quantidade na membrana de eritrócitos, linfócitos e plaquetas (ASSIS et al., 2018).

A AChE é o alvo para agrotóxicos como os organofosforados e os carbamatos (KAKANI et al., 2011). Os mesmos causam a inibição da AChE gerando acúmulo de ACh na fenda sináptica, causando estimulação permanente da membrana pós-sináptica e podendo levar à morte (AYGUN et al., 2002). No entanto, os inibidores da AChE também são usados na terapêutica da doença de Alzheimer e *miastenia gravis*, contribuindo para retardar a evolução destas patologias e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (STONE et al., 2011; MEHNDIRATTA; PANDEY; KUNTZER, 2014).

A butirilcolinesterase (BuChE) é a outra enzima da família das colinesterases, também conhecida como pseudocolinesterase ou colinesterase não específica, enquanto a AChE também é chamada de colinesterase verdadeira (POHANKA, 2020). AChE e BuChE têm diferentes papéis no organismo embora possuam similaridade estrutural de 54% (FRANJESEVIC et al., 2019). O papel da AChE está relacionado com a regulação da neurotransmissão e está principalmente presente no sistema nervoso (POHANKA, 2020). A BuChE é sintetizada no

fígado e continuamente exportada para a corrente sanguínea (ASSIS et al., 2018).

O papel da BuChE segue sem ser completamente compreendido, entretanto acredita-se que suas principais funções são a eliminação de substâncias tóxicas e auxílio na transmissão sináptica como *backup* da AChE (MASSON; LOCKRIDGE, 2010). Há outras hipóteses para sua função como na morfogênese, citogênese e tumorgênese, além de converter a proteína β -amilóide em formas mais tóxicas em pacientes com Alzheimer. Entretanto, nenhuma destas funções foi determinada de forma conclusiva (SJÖQVIST, 1960; HOLMSTEDT; SOREQ; LAPIDOT-LIFSON; ZAKUT, 1991; GUILLOZET et al., 1997; GIACOBINI, 2001). A BuChE tem capacidade de metabolizar mais compostos que a AChE pois possui um sítio ativo de 13 Å, enquanto a AChE possui sítio ativo de 6 Å. O sítio ativo da BuChE possui apenas 8 resíduos de aminoácidos aromáticos, enquanto a AChE possui resíduos de 14 aminoácidos aromáticos. (FRANJESEVIC et al., 2019). Além disso, a BuChE está envolvida em reações de detoxificação de fase I e consegue hidrolisar diversos componentes tóxicos como metabolitos de plantas e drogas como cocaína, lidocaína, bupivacaína, succinilcolina e ácido acetilsalicílico (POHANKA, 2020).

CAPÍTULO I (ARTIGO):

**Imidacloprid based commercial pesticide causes behavioral,
biochemical and hematological impairments in Wistar rats.**

A ser submetido para publicação na revista *Toxicology and Applied
Pharmacology*

DISCUSSÃO

A seguinte dissertação avaliou a toxicidade do agrotóxico Much®, cujo componente ativo é IMI, após tratamento subcrônico de 45 dias. Os dados obtidos no teste de atividade locomotora não demonstraram diferença entre os grupos tratados e o grupo controle na locomoção espontânea horizontal, como distância total percorrida e velocidade média. Entretanto o grupo IMI 15 mg/kg apresentou aumento na frequência e duração de *rearing*, que se refere a movimentos verticais quando o animal eleva seu corpo e permanece apenas com as patas traseiras no solo. O aumento ou diminuição na frequência ou tempo dispendido em *rearing* está relacionada com elevação ou diminuição do nível de ansiedade respectivamente. A ansiedade é compreendida biologicamente como a preparação do organismo para enfrentar estímulos ambientes relacionados a sobrevivência, portanto o aumento de *rearing* pode estar relacionado com a observação ampla do ambiente e preparação para possíveis ameaças (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Ratos adultos tratados com agrotóxico comercial contendo IMI nas doses 45 e 90 mg/kg apresentaram diminuição na atividade locomotora horizontal e vertical, ou seja, este tratamento diminuiu o comportamento de *rearing* (LONARE et al., 2014). Diminuição na distância percorrida e tempo de deambulação no teste de atividade locomotora foi observado em ratas Wistar fêmeas tratadas com IMI de grau técnico nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg por 90 dias (BHARDWAJ et al., 2010). Estes dados apontam para diminuição na atividade locomotora relacionado com o aumento da dose de IMI presente em agrotóxico comercial e em IMI de grau técnico em doses similares as utilizadas neste trabalho.

Há dados apontando que o número de *rearings* apresentados por ratos Wistar em um teste de campo aberto apresentou correlação com o aumento de ACh hipocampal durante o teste (THIEL; HUSTON; SCHWARTING, 1998). Animais *knock-out* do receptor muscarínico M1, no qual a ACh liga-se, apresentam comportamento de hiperatividade geral e maior atividade locomotora horizontal e mais eventos de *rearing* (MIYAKAWA et al., 2001). Estes dados demonstram a relevância da quantificação de ACh em estruturas cerebrais, trazendo um campo de estudo a ser explorado.

O teste do campo aberto é utilizado para diversas avaliações de comportamento animal e dentre estas também para avaliar a ansiedade. Em

roedores, o comportamento do tipo ansiedade é descrito como menos tempo gasto no centro do aparelho do campo aberto (CONTÓ; DE CARVALHO; BENEDITO, 2005). O teste de atividade locomotora realizado neste estudo é muito semelhante ao teste do campo aberto, a principal diferença consiste em um software conectado com barras com sensores de infravermelho que capturam os movimentos do animal e convertem em dados. Ratos Sprague Dawley adultos machos tratados com 0,5 e 1 mg/kg de IMI de grau técnico por 60 dias passaram menos tempo gasto no centro da arena de campo aberto (KHALIL et al., 2017). Dados semelhantes foram observados neste estudo com os grupos tratados com IMI 1,5 e 5 mg/kg, apontando evidências para um comportamento de ansiedade causado pelo IMI em baixas doses após tratamento subcrônico.

O labirinto aquático de Morris é um dos testes desenvolvido por Richard Morris em 1981 para avaliação de aprendizado e memória espacial, no qual o animal localiza um objeto baseado em pistas distais localizadas no ambiente, e que não foi explorado anteriormente por visão, audição ou olfato. Este teste foi aplicado em camundongos tratados com IMI em grau técnico nas doses de 5 e 20 mg/kg por 28 dias. O período de aprendizado utilizado foi de seis dias e no sétimo dia foi realizado o teste, não sendo observada diferença entre os grupos (ZHENG et al., 2020). A diferença do resultado deste estudo e dos achados no teste do OX Maze pode estar relacionado com o menor tempo de aquisição do aprendizado no labirinto aquático de Morris.

O teste do OX Maze foi utilizado neste estudo para avaliar aprendizado e atenção após tratamento subcrônico de ratos com IMI na dose de 1,5, 5 e 15 mg/kg. Até então existem somente quatro artigos publicados com este teste. A primeira publicação foi de Wood (2011) com objetivo de utilizar o OX Maze como um enriquecimento ambiental para camundongos modelo de Doença de Huntington pois uma das manifestações desta doença é a degeneração progressiva do estriado e do córtex causando perda de função cognitiva e motora (REDDY; HEMACHANDRA; TAGLE, 1999). Então este teste foi adaptado por Rojas et al. (2015) para avaliação de memória e aprendizado em ratos modelos para hipóxia isquêmica neonatal. Posteriormente Deniz et al. (2018) que utilizou para o teste para mesma finalidade. O último trabalho publicado com o teste do

OX Maze foi de Costa-Valle et al. (2018) que avaliou aprendizado, atenção e memória de ratos adultos submetidos a tratamento com bebida energética (Red Bull®) e seus constituintes. Este foi o trabalho mais similar em relação ao teste do OX Maze realizado em nosso estudo por utilizar ratos Wistar adultos saudáveis, porém não foi utilizado IMI ou outro inseticida neonicotinoide com mecanismo de ação similar.

As variáveis previamente citadas trazem desafios para comparação e discussão dos resultados obtidos com o OX Maze, pois os dados já publicados pouco se assemelham com os resultados deste estudo. Entretanto é importante ressaltar que este trabalho é o primeiro a avaliar atenção e aprendizado de ratos pelo teste do OX Maze após tratamento subcrônico de agrotóxico comercial contendo IMI como ingrediente ativo até a presente data.

Neste trabalho, os ratos tratados com IMI 5 mg/kg encontraram as quatro recompensas do teste mais rápido que os outros grupos, portanto, completaram a tarefa em menos tempo. Um padrão semelhante foi encontrado em ratos que receberam cafeína e taurina isoladas e em combinação (Valle et al. 2018), sugerindo, junto com os resultados do campo aberto, que o IMI em uma dose de 5 mg/kg poderia auxiliar na cognição e no aprendizado. Entretanto este comportamento não foi observado no grupo de 15 mg/kg, mesmo com o aumento de 3 vezes na dose.

O teste *hole-board* foi empregado para avaliação de ansiedade em ratos Sprague Dawley que receberam 1 mg/kg de IMI de grau técnico por 30 dias (ABD-ELHAKIM; MOHAMMED; MOHAMED, 2018). O teste consiste em avaliar a exploração nas aberturas de um tabuleiro horizontal no qual o animal é posicionado, portanto animais que exploram menos as aberturas são considerados mais ansiosos (PELLOW et al., 1985; KARL; PABST; VON HÖRSTEN, 2003). A utilização de agentes ansiolíticos aumenta significativamente o número de aberturas exploradas no teste pelos animais (PELLOW et al., 1985). Os animais tratados com IMI exploraram menos o tabuleiro, portanto, apresentaram mais ansiedade que os animais do grupo controle. Embora trate-se de um teste diferente dos realizados neste trabalho e de uma dose menor por um período inferior de tempo, é importante ressaltar que

foi observado mais ansiedade nos animais tratados com IMI assim como no teste de OX Maze.

A massa corporal dos animais tratados com IMI presente na formulação comercial Much® 600 nas doses de 1,5; 5 e 15 mg/kg não foi afetada durante os 45 dias de teste. Porém há relatos de menor ganho de massa corporal em ratos tratados com 2,25 mg/kg de IMI em grau técnico por 28 dias (KATIĆ et al., 2021). Bem como em ratos tratados com doses elevadas, 45 e 90 mg/kg, de uma formulação comercial contendo IMI por 45 dias (EL-ELA; ABO; ABDEL-AZIZ, 2019). Estes dados sugerem maior impacto no ganho de massa corporal com a utilização de IMI em grau técnico mesmo em doses baixas. Entretanto há indícios que formulações comerciais impactam na massa corporal quando administradas em maiores doses.

A hemoglobina (Hb) é uma proteína globular tetramérica que possui quatro cadeias e cada uma destas possui um grupamento heme, onde o oxigênio se liga. Esta estrutura e conformação é essencial para desempenhar o transporte de oxigênio do pulmão para os tecidos periféricos e transporte de dióxido de carbono dos tecidos periféricos para o pulmão (PERUTZ et al., 1987). A interação da Hb com IMI foi estudada usando espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, demonstrando que ocorre alterações estruturais e funcionais na Hb, impactando seu estado fisiológico e conseqüentemente em seu funcionamento (DING et al., 2010). Posteriormente, observou-se que o IMI induz uma perda parcial da α -hélice, alterando sua conformação (DING; PENG, 2015). Estes dados podem explicar a redução significativa dependente da dose no HCM em todos os grupos tratados e no CHCM na dose mais elevada.

Parâmetros hematológicos como Hb, eritrócitos e hematócrito de ratas Wistar fêmeas não apresentaram diferença do grupo controle após tratamento com IMI em grau técnico nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg por 90 dias (BHARDWAJ et al., 2010). O maior tempo de tratamento e a pureza do IMI em grau técnico surpreendentemente não afetaram os parâmetros hematológicos em contraste com os achados deste estudo que utilizaram IMI presente em formulação comercial e com tratamento de menor duração. Entretanto, os animais tratados com IMI de grau técnico por 90 dias apresentaram claros sinais de toxicidade

como diarreia, salivação, dispneia, piloereção e perda de peso, especialmente na dose de 20 mg/kg.

A avaliação de parâmetros hematológicos após administração de IMI foi realizada com outras espécies. Peixe Carpa Rohu (*Labeo rohita*) foi exposto a doses subletais na concentração de 120 mg/L por 2, 4, 8, 16, 32 e 64 dias. Os peixes expostos por 8 dias apresentaram diminuição na Hb e em eritrócitos, porém não apresentaram alteração em HCM e CHCM (QADIR et al., 2014). Os outros grupos expostos por diferentes tempos não apresentaram alterações hematológicas. Os parâmetros hematológicos após administração de IMI em galos filhotes nas doses de 1.25; 1.67 e 2.5 mg/kg por 28 dias não apresentaram alterações (BALANI; AGRAWAL; THAKER, 2011).

Malondialdeído (MDA) é um produto de lipoperoxidação utilizado habitualmente como biomarcador de estresse oxidativo (BARRERA et al., 2018). A reação de MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) forma substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), cromógeno de cor rosada, que pode ser quantificado por colorimetria. MDA pode ser quantificado pela técnica de TBARS assim como foi realizado neste trabalho. Aumento no nível de MDA em plasma e tecido hepático foi observado após tratamento de ratas Wistar fêmeas adultas com IMI de grau técnico via intraperitoneal em dose única de 26 mg/kg (DUZGUNER; ERDOGAN, 2010). Em contraste com estes achados, não foi observado alteração no TBARS plasmático em nosso estudo, porém a administração por via intravenosa e a pureza do IMI em grau técnico pode ter acentuado a possível toxicidade do IMI.

Ratos tratados com IMI em grau técnico por 28 dias com a dose de 0,06 mg/kg apresentaram aumento no TBARS plasmático, contudo os animais que receberam as doses de 0,8 e 2,25 mg/kg não apresentaram tal alteração (KATIC et al., 2021). Este achado corrobora nossos resultados pois a dose na qual foi observada elevação em TBARS é menor do que a mínima dose utilizada em nosso estudo, que é 1,5 mg/kg. O mesmo estudo não observou alteração em tióis totais sanguíneos, assim como nossos resultados.

Há diversos relatos de aumento de AST, ALT, LDH e FAL em roedores tratados com IMI de grau técnico em doses altas, médias e baixas e por

diferentes períodos de tempo (LONARE et al., 2014; VOHRA; KHERA; SANGHA, 2014; KHALIL et al., 2017; MAHAJAN et al., 2018; EL-ELA; ABO; ABDEL-AZIZ, 2019; NDONWI et al., 2019; ZHENG et al., 2020). Estes parâmetros bioquímicos não apresentaram alteração neste estudo, sendo assim, há indícios que IMI em grau técnico tem mais impacto em marcadores bioquímicos assim como tem maior impacto em ganho de massa corporal.

Há relato de aumento em na atividade da AST em ratas fêmeas tratadas com o agrotóxico comercial Confidor® em doses de 9 e 45 mg/kg (TOOR; SANGHA; KHERA, 2013). Aumento no LDH foi observado em ratos adultos machos tratados com 10 e 20 mg/kg de Confidor® por 60 dias e aumento de AST, ALT e FAL na dose de 20mg/kg (CHAKROUN et al., 2017). Apesar da similaridade de doses, estes estudos utilizaram um agrotóxico que contém um ingrediente ativo além do IMI, o piretróide ciflutrina, e além disso pode conter diferentes adjuvantes na sua formulação, justificando a diferença entre estes resultados e nossos achados.

O principal mecanismo de ação do IMI está relacionado com a neurotransmissão colinérgica que é responsável por funções fisiológicas como contração muscular, secreção glandular periférica, cognição e comportamento. Esta neurotransmissão é baseada na ligação da ACh em receptores nicotínicos e muscarínicos de ACh. A ACh é hidrolisada preferencialmente pela AChE porém pode também ser hidrolisada pela BuChE, após seu desligamento dos receptores (NORDBERG et al., 2013). A principal atividade do BuChE em humanos e ratos permanece desconhecida, embora uma função importante seja a desintoxicação de diversos compostos prejudiciais, como drogas e metabólitos vegetais e, portanto, está presente principalmente na corrente sanguínea (POHANKA, 2020). Entretanto, há estudos demonstrando sua presença em diversas regiões cerebrais em humanos como hipocampo e córtex, porém em menor concentração do que a AChE, mas apontando novamente para um possível papel na neurotransmissão (MESULAM; GEULA, 1991; MASSON; LOCKRIDGE, 2010;; NORDBERG et al., 2013).

O mecanismo de ação do IMI é baseado na ligação e bloqueio de receptores pós-sinápticos de acetilcolina no sistema nervoso (DÉGLISE; GRÜNEWALD; GAUTHIER, 2002). Portanto, o neurotransmissor ACh possui

menos receptores para se ligar, acumulando-se na fenda sináptica. Conseqüentemente, o aumento da atividade da BuChE sérica ocorre para metabolizar o excesso de acetilcolina.

Estudos de *docking* molecular identificaram que o IMI e outros seis inseticidas neonicotinoides se conectam com o sítio ativo da BuChE humana, que é 200 Å maior que a AChE humana, podendo justificar sua maior afinidade por ligação com BuChE (SAXENA et al., 1997; TERALI, 2018). Embora existam estudos demonstrando diferenças entre o sítio ativo de BuChE humana e de ratos (BOECK; SCHOPFER; LOCKRIDGE, 2002), não há dados de docking molecular de IMI e outros inseticidas neonicotinoides com a BuChE de ratos.

Há dados demonstrando que não há alteração em BuChE sérica em ratos tratados com 0,06 mg/kg, 0,8 mg/kg e 2,25 mg/kg de IMI por 28 dias (KATIC et al., 2021), porém estas doses administradas são mais baixas do que a dose de 15 mg/kg que apresentou aumento na atividade de BuChE neste estudo. Há inclusive relatos de aumento de BuChE sérica em ratos machos adolescentes proveniente de prole de fêmeas tratadas com injeção intraperitoneal de 337 mg/kg de IMI (ABOU-DONIA et al., 2008), apontando para consequências transgeracionais. Ratas fêmeas apresentaram diminuição na atividade da AChE no soro e em homogeneizado de cérebro, apontando para uma possível inibição da mesma, após tratamento com IMI em grau técnico na dose de 20 mg/kg por 90 dias (BHARDWAJ et al., 2010). A inibição da AChE pode estar relacionada com o aumento da expressão da BuChE e o aumento da sua atividade no soro como foi observado nos resultados deste trabalho.

Há estudos demonstrando que o soro e cérebro de ratos possuem aproximadamente a mesma quantidade de AChE e BuChE (BOECK; SCHOPFER; LOCKRIDGE, 2002) e que ocorre aumento na expressão de AChE em situações de estresse oxidativo e processo apoptótico (XI et al., 2015), porém não existem estudos demonstrando se estes achados podem ser extrapolados para BuChE em ratos. Embora as quantificações de AChE sérica e cerebral e de BuChE cerebral não foram realizadas neste trabalho, estes dados demonstram a importância de realizar estas avaliações em estudos futuros.

O papel próximo e complementar de AChE e BuChE na neurotransmissão anteriormente citada demonstra a importância da avaliação da atividade destas duas enzimas em estruturas cerebrais isoladas de ratos para elucidar o papel de ambas e como o IMI pode afetar as sinapses colinérgicas. Estas avaliações inclusive ajudariam a esclarecer os achados comportamentais já citados neste trabalho.

Nosso estudo tem algumas limitações, porém fornece uma visão geral de efeitos neurotóxicos e sistêmicos de uma formulação comercial contendo IMI como ingrediente ativo. A principal limitação é a falta de informações sobre os outros componentes da formulação comercial, pois estas poderiam aumentar ou diminuir a toxicidade. Portanto, a discussão dos nossos resultados com estudos realizados com IMI padrão também é um desafio e uma limitação. Embora estudos com agrotóxicos comerciais são escassos, é importante ressaltar a sua importância tendo em vista sua utilização na agricultura e em outras aplicações anteriormente citadas.

CONCLUSÃO

- A administração subcrônica de agrotóxico comercial MUCH® na dose de 15 mg/kg por 45 dias causa aumento no número de eventos e tempo total de *rearing*, indicando efeito tipo-ansiolítico nesses ratos;
- A administração de 1,5 mg/kg e 5 mg/kg do agrotóxico comercial MUCH® por 45 dias diminuiu o tempo de permanência no centro do aparato no teste de atividade locomotora, indicando efeito tipo-ansiolítico nesses ratos;
- Os ratos tratados com 5 mg/kg do agrotóxico comercial MUCH® por 45 dias apresentaram menor tempo médio global para finalizar a tarefa do OX Maze, indicando melhora na atenção e cognição destes animais;
- Foi observado aumento de duas vezes na atividade da BuChE sérica no grupo tratado com 15 mg/kg do agrotóxico comercial MUCH® por 45 dias, que poderia ser correlacionada com níveis de AChE no SNC e estar relacionada com alterações de comportamento nessas doses de modo diferente que as outras duas doses;
- Foi observado diminuição na HCM em todos os grupos tratados com o agrotóxico comercial MUCH® por 45 dias, podendo estar relacionada a alterações que levam a anemia;
- Foi observado diminuição de CHCM no grupo tratado com 15 mg/kg do agrotóxico comercial MUCH® por 45 dias, podendo estar relacionada a alterações que levam a anemia;

PERSPECTIVAS

- Avaliar níveis de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), acetilcolina, dopamina, GABA, glutamato, glutamina e serotonina em amostras de cerebelo, hipocampo, hipotálamo e córtex por cromatografia líquida em tandem acoplada a espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade da cadeia respiratória mitocondrial em tecido cerebral e hepático;
- Avaliar dano ao DNA por ensaio de micronúcleo e cometa alcalino;
- Avaliar estresse oxidativo em baço, coração, fígado e rins;
- Avaliar histologia de baço, cérebro, coração, fígado e rins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELHAKIM, Y. M.; MOHAMMED, H. H.; MOHAMED, W. A. M. Imidacloprid Impacts on Neurobehavioral Performance, Oxidative Stress, and Apoptotic Events in the Brain of Adolescent and Adult Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 51, p. 13513–13524, 2018.

ABOU-DONIA, M. B. et al. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 71, n. 2, p. 119–130, jan. 2008.

ANDRABI, S. S. et al. Reversal of Schizophrenia-like Symptoms and Cholinergic Alterations by Melatonin. **Archives of Medical Research**, v. 50, p. 295–303, 2019.

ANDREWS, J. S. et al. Performance of four different rat strains in the autoshaping, two-object discrimination, and swim maze tests of learning and memory. **Physiology & Behavior**, v. 57, n. 4, p. 785–790, 1995.

ANVISA. **Programa De Análise De Resíduos De Agrotóxicos Em Alimentos – PARA**. Brasília, 22 set. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>

ASSIS, C. R. D. et al. Erythrocyte acetylcholinesterase as biomarker of pesticide exposure : new and forgotten insights. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18364–18376, 2018.

AYGUN, D. et al. Serum acetylcholinesterase and prognosis of acute organophosphate poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 903–910, 2002.

BALANI, T.; AGRAWAL, S.; THAKER, A. M. Hematological and biochemical changes due to short-term oral administration of imidacloprid. **Toxicology International**, v. 18, n. 1, p. 2, 2011.

BARRERA, G. et al. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes , 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.

BASS, C. et al. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 78–87, 2015.

BERNIERI, T. et al. Occupational exposure to pesticides and thyroid function in Brazilian soybean farmers. **Chemosphere**, v. 218, p. 425–429, 2019.

BERTAINA-ANGLADE, V. et al. Memory facilitating effects of agomelatine in the novel object recognition memory paradigm in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, n. 4, p. 511–517, 2011.

BERTRAND, D.; WALLACE, T. L. A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders. **Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System**, p. 1–28, 2020.

BHARDWAJ, S. et al. A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats:

Morphological, biochemical and histopathological evaluations. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1185–1190, 2010.

BLUSZTAJN, J. K.; BERSE, B. The cholinergic neuronal phenotype in alzheimer's disease. **Metabolic brain disease**, v. 15, n. 1, p. 45–64, 2000.

BOECK, A. T.; SCHOPFER, L. M.; LOCKRIDGE, O. DNA sequence of butyrylcholinesterase from the rat: expression of the protein and characterization of the properties of rat butyrylcholinesterase. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 2101–2110, 2002.

BOLLES, R. C. Grooming behavior in the rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 53, n. 3, p. 306, 1960.

BUCKINGHAM, S. et al. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 21, p. 2685–2692, 1997.

CHAKROUN, S. et al. Imidacloprid enhances liver damage in Wistar rats: Biochemical, oxidative damage and histological assessment. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 5, n. 12, p. 540–546, 2017.

CHANGEUX, J. P. Allosteric receptors: from electric organ to cognition. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 1–38, 2010.

CHAO, S. L.; CASIDA, J. E. Interaction of Imidacloprid Metabolites and Analogs with the Nicotinic Acetylcholine Receptor of Mouse Brain in Relation to Toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 58, n. 1, p. 77–88, 1997.

CONNER, J. M.; CHIBA, A. A.; TUSZYNSKI, M. H. The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. **Neuron**, v. 46, n. 2, p. 173–179, 2005.

CONTÓ, M. B.; DE CARVALHO, J. G. B.; BENEDITO, M. A. C. Behavioral differences between subgroups of rats with high and low threshold to clonic convulsions induced by DMCM, a benzodiazepine inverse agonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 82, n. 3, p. 417–426, 2005.

COSTA-VALLE, M. T. et al. Energy drink and alcohol combination leads to kidney and liver alterations in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 355, p. 138–146, 2018.

CRAWLEY, J. N. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: Experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. **Brain Research**, v. 835, n. 1, p. 18–26, 1999.

CREMONESE, C. et al. Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. **Reproductive Toxicology**, v. 67, p. 174–185, 2017.

CROSBY, E. B. et al. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 49, p. 81–90, 2015.

CURZON, P. et al. The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the

Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking. In: Buccafusco JJ, editor. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 8.

DAISLEY, B. A. et al. Neonicotinoid-induced pathogen susceptibility is mitigated by *Lactobacillus plantarum* immune stimulation in a *Drosophila melanogaster* model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 6, n. 2, p. 147–190, 1914.

DAMALAS, C. A. ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 5, p. 1402–1419, 2011.

DARWIN, C. R. The expression of the emotions in man and animals. 1. ed. London: **John Murray**, 1872.

DÉGLISE, P.; GRÜNEWALD, B.; GAUTHIER, M. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. **Neuroscience Letters**, v. 321, n. 1–2, p. 13–16, 2002.

DELLU, F. et al. A two-trial memory task with automated recording: study in young and aged rats. **Brain Research**, v. 588, n. 1, p. 132–139, 1992.

DENIZ, B. F. et al. Gestational folic acid supplementation does not affect the maternal behavior and the early development of rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia but the high supplementation impairs the dam's memory and the Na⁺, K⁺-ATPase activity in the pup's. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 71, p. 181–192, 2018.

DI PRISCO, G. et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18466–18471, 2013.

DING, F. et al. Interaction of imidacloprid with hemoglobin by fluorescence and circular dichroism. **Journal of Fluorescence**, v. 20, n. 3, p. 753–762, 2010.

DING, F.; PENG, W. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Biological assessment of neonicotinoids imidacloprid and its major metabolites for potentially human health using globular proteins as a model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 147, p. 24–36, 2015.

DOBRAŃSKY, T.; RYLETT, R. J. A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, p. 305–313, 2005.

DUZGÜNER, V.; ERDOĞAN, S. Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid on the mammalian central nervous system and liver in rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, n. 1, p. 13–18, 2010.

EL-ELA, F.; ABO, I.; ABDEL-AZIZ, A. M. Investigating the potential protective effects of natural product quercetin against imidacloprid-induced biochemical toxicity and DNA damage in adult rats. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 727–735,

2019.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 11, p. 1099–1105, 2008.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47–59, 1988.

FOLEY, K. P. et al. Long term but not short term exposure to obesity related microbiota promotes host insulin resistance. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2018.

FRANJESEVIC, A. J. et al. **Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Chemistry - A European Journal**, 2019.

GIACOBINI, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase. **Drugs & aging**, v. 18, n. 12, p. 891–898, 2001.

GIBBONS, D.; MORRISSEY, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 103–118, 2015.

GRAY, A.; MCNAUGHTON, N. *The Neuropsychology of Anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system*. 1. ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2000.

GUILLOZET, A. L. et al. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 42, n. 6, p. 909–918, 1997.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385, 1934.

HALLMANN, C. A. et al. Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 341–343, 2014.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 2012.

HOCINE, L. et al. The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 134, p. 49–54, 2016.

HOLMSTEDT, B.; SJÖQVIST, F. Distribution of acetylcholinesterase in the ganglion cells of various sympathetic ganglia. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 47, n. 2–3, p. 284–296, 1960.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Avaliação de Risco Ambiental do Ingrediente Ativo IMI para Insetos Polinizadores - Parecer Técnico Nº Sei Ibama 6220406**. 2019. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/notas->

tecnicas/2019-10-25-Ibama-Parecer-IMI-CP_17-OUT-19.pdf> Acessado em 13 de ago. 2021.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Boletins Anuais de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**. 2019. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>> Acessado em 12 de ago. 2021.

JESCHKE, P. et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2897–2908, 2011.

JIN, C. et al. Chronic exposure of mice to low doses of imazalil induces hepatotoxicity at the physiological, biochemical, and transcriptomic levels. **Environmental toxicology**, v. 33, n. 6, p. 650–658, 2018.

JIN, Y. et al. Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. **Environment international**, v. 42, p. 144–151, 2012.

JIN, Y. et al. Embryonic exposure to cis-bifenthrin enantioselectively induces the transcription of genes related to oxidative stress, apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 2, p. 717–723, 2013.

JONES, B. J.; ROBERTS, D. J. A Rotarod Suitable for Quantitative Measurements of Motor Incoordination in Naive Mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 259, n. 2, p. 211, 1968.

KAKANI, E. G. et al. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 150–158, 2011.

KARL, T.; PABST, R.; VON HÖRSTEN, S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 55, n. 1, p. 69–83, 2003.

KATIĆ, A. et al. Effects of low-level imidacloprid oral exposure on cholinesterase activity, oxidative stress responses, and primary DNA damage in the blood and brain of male Wistar rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 338, p. 109287, 2021.

KHALIL, S. R. et al. Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 165–174, 2017.

KIM, K.-H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525–535, 2017.

KIMURA-KURODA, J. et al. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32432, 2012.

KINNAVANE, L.; ALBASSER, M. M.; AGGLETON, J. P. Advances in the

behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 67–78, 2015.

KOTHARI, M. J. Myasthenia gravis. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, n. 9, p. 377–384, 2004.

LAURENTINO, A. O. M. et al. Levamisole, a cocaine cutting agent, induces acute and subchronic systemic alterations in Wistar rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 426, p. 115649, 2021.

LEUNG-GURUNG, L. et al. Methoxychlor metabolite HPTE alters viability and differentiation of embryonic thymocytes from C57BL/6 mice. **Journal of immunotoxicology**, v. 15, n. 1, p. 104–118, 2018.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Reviews in the Neurosciences**, v. 17, p. 111–133, 2006.

LI, P.; ANN, J.; AKK, G. Activation and modulation of human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors by the neonicotinoids clothianidin and imidacloprid. **Journal of Neuroscience Research**, v. 89, n. 8, p. 1295–1301, 2011.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321–340, 1990.

LIU, Z.; FU, Z.; JIN, Y. Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 166, p. 212–220, 2017.

LOEWI, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. **Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 189, n. 1, p. 239–242, 1921.

LONARE, M. et al. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 122–129, 2014.

LUO, T.; WANG, X.; YUANXIANG, J. Low concentrations of imidacloprid exposure induced gut toxicity in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 241, p. 108972, 2021.

MACIEL, É. S. et al. Subchronic oral administration of Benzo[a]pyrene impairs motor and cognitive behavior and modulates S100B levels and MAPKs in rats. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 4, p. 731–740, 2014.

MAHAJAN, L. et al. Toxic effects of imidacloprid combined with arsenic: Oxidative stress in rat liver. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 10, p. 726–735, 2018.

MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. **Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior** *Archives of Biochemistry and Biophysics* Elsevier Inc., , 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.005>>

MATSUO, H.; TOMIZAWA, M.; YAMAMOTO, I. Structure-Activity Relationships

of Acyclic Nicotinoids and Neonicotinoids for Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor/Ion Channel Complex. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 17–23, 1998.

MCMAHON, H. T. et al. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. **Cell**, v. 83, n. 1, p. 111–119, 1995.

MEHNDIRATTA, M. M.; PANDEY, S.; KUNTZER, T. Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 10, 2014.

MESULAM, M. M. et al. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1–Ch6). **Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 1185–1201, 1983.

MESULAM, M. M.; GEULA, C. Acetylcholinesterase-rich neurons of the human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. **Journal of Comparative Neurology**, v. 306, n. 2, p. 193–220, 1991.

MIYAKAWA, T. et al. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 14, p. 5239–5250, 2001.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, v. 12, n. 2, p. 239–260, 1981.

NAGATA, K. et al. Modulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by the nitromethylene heterocycle imidacloprid. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, n. 2, p. 731–738, 1998.

NAUEN, R.; JESCHKE, P.; COPPING, L. In Focus: Neonicotinoid insecticides. **Pest Management Science**, v. 64, n. 11, p. 1081, 2008.

NDONWI, E. N. et al. Gestational Exposure to Pesticides Induces Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Offspring that Persist at Adult Age in an Animal Model. **Toxicological Research**, v. 35, n. 3, p. 241–248, 2019.

NORDBERG, A. et al. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. **The Primary Care Companion for CNS Disorders**, v. 15, n. 2, 2013.

OLIVEIRA, S. E. et al. Atrazine promotes immunomodulation by melanomacrophage centre alterations in spleen and vascular disorders in gills from *Oreochromis niloticus*. **Aquatic toxicology**, v. 202, p. 57–64, 2018.

PARKINSON, R. H.; GRAY, J. R. Neural conduction, visual motion detection, and insect flight behaviour are disrupted by low doses of imidacloprid and its metabolites. **NeuroToxicology**, v. 72, p. 107–113, 2019.

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.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Changes in Acetylcholine Extracellular Levels During Cognitive Processes. **Learning & Memory**, v. 11, n. 1, p. 21–27, 2004.

- PERUTZ, M. F. et al. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. **Accounts of Chemical Research**, v. 20, n. 9, p. 309–321, 1987.
- PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 68–102, 2015.
- POHANKA, M. Diagnoses of Pathological States Based on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 18, p. 2994–3011, 2020.
- QADIR, S. et al. Effects of Imidacloprid on the Hematological and Serum Biochemical Profile of *Labeo rohita*. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n. 4, p. 1085–1090, 2014.
- RABY, M. et al. Chronic effects of an environmentally-relevant, short-term neonicotinoid insecticide pulse on four aquatic invertebrates. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 1543–1552, 2018.
- REDDY, P.; HEMACHANDRA, M. W.; TAGLE, D. A. Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease. **Trends in neurosciences**, v. 22, n. 6, p. 248–255, 1999.
- ROJAS, J. J. et al. Environmental stimulation improves performance in the ox-maze task and recovers Na⁺, K⁺-ATPase activity in the hippocampus of hypoxic-ischemic rats. **Neuroscience**, v. 291, p. 118–127, 2015.
- RUSSELL, R. W.; FLATTAU, P. E.; POPE, A. M. (Ed.). **Behavioral measures of neurotoxicity**. National Academies Press, 1990.
- RUSSEL, R. Essential roles for animal models in understanding human toxicities. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 15, p. 7–11, 1991.
- SAMTANI, R.; SHARMA, N.; GARG, D. Effects of endocrine-disrupting chemicals and epigenetic modifications in ovarian cancer: a review. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 1, p. 7–18, 2018.
- SAXENA, A. et al. Differences in Active Site Gorge Dimensions of Cholinesterases Revealed by Binding of Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase †. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 14642–14651, 1997.
- SEARL, T. J.; SILINSKY, E. M. Modulation of calcium-dependent and-independent acetylcholine release from motor nerve endings. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 30, n. 1–2, p. 215, 2006.
- SHARRAD, D. F.; GAI, W. P.; BROOKES, S. J. Selective coexpression of synaptic proteins, α -synuclein, cysteine string protein- α , synaptophysin, synaptotagmin-1, and synaptobrevin-2 in vesicular acetylcholine transporter-immunoreactive axons in the guinea pig ileum. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 11, p. 2523–2537, 2013.
- SIMON-DELSO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.
- SKINNER, B. F. The Operant Side of Behavior therapy. **Journal of behavior**

- therapy and experimental psychiatry**, v. 19, n. 3, p. 171–179, 1988.
- SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y.; ZAKUT, H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v. 3, n. 12, p. 511–516, 1991.
- SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological reviews**, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.
- STONE, J. G. et al. Frontiers in Alzheimer's disease therapeutics. **Therapeutic Advances in Chronic Disease**, v. 2, n. 1, p. 9–23, 2011.
- TANSEY, E. M. Henry Dale and the discovery of acetylcholine. **Comptes rendus biologies**, v. 329, n. 5–6, p. 419–425, 2006.
- TERALI, K. An evaluation of neonicotinoids' potential to inhibit human cholinesterases: Proteineligand docking and interaction profiling studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 84, p. 54–63, 2018.
- THIEL, C.; HUSTON, J.; SCHWARTING, R. Hippocampal Acetylcholine and Habituation Learning. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1253–62, 1998.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247–268, 2005.
- TOOR, H. K.; SANGHA, G. K.; KHERA, K. S. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, n. 1, p. 1–4, 2013.
- VALLE, M. T. C. et al. Energy drinks and their component modulate attention, memory, and antioxidant defences in rats. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 7, p. 2501–2511, 2018.
- VERMA, S. et al. Muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor agonists: current scenario in Alzheimer's disease therapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 985–993, 2018.
- VIJVER, M. G.; BRINK, P. J. VAN DEN. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid: a rebuttal and some new analyses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- VOHRA, P.; KHERA, K. S.; SANGHA, G. K. Physiological, biochemical and histological alterations induced by administration of imidacloprid in female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 110, p. 50–56, 2014.
- VOPHAM, T. et al. Pesticide exposure and liver cancer: a review. **Cancer Causes & Control**, v. 28, n. 3, p. 177–190, 2017.
- WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: A critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482, 1976.
- WANG, L. et al. Occurrence and Profile Characteristics of the Pesticide Imidacloprid, Preservative Parabens, and Their Metabolites in Human Urine from Rural and Urban China. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 24, p. 14633–14640, 2015.
- WANG, Y. et al. The metabolism distribution and effect of imidacloprid in chinese

lizards (*Eremias argus*) following oral exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 165, p. 476–483, 2018.

WHITEHORN, P. R. et al. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 351–352, 2012.

WOOD, N. I.; GLYNN, D.; MORTON, A. J. “Brain training” improves cognitive performance and survival in a transgenic mouse model of Huntington’s disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 427–437, 2011.

XI, H. et al. Role of acetylcholinesterase in lung cancer. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 4, p. 390–398, 2015.

YAMAMOTO, I. et al. Molecular Mechanism for Selective Toxicity of Nicotinoids and Neonicotinoids. **Journal of Pesticide Science**, v. 20, n. 1, p. 33–40, 1995.

YUAN, X. et al. Gut microbiota: an underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity. **Chemosphere**, v. 227, p. 425–434, 2019.

ZHANG, A. et al. Insect nicotinic acetylcholine receptor: Conserved neonicotinoid specificity of [3H]imidacloprid binding site. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 1294–1303, 2000.

ZHANG, J.; KONG, Q. Locomotor activity : A distinctive index in morphine self-administration in rats. p. 1–13, 2017.

ZHANG, Q. et al. Simultaneous determination of nine neonicotinoids in human urine using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 647–652, 2018.

ZHAO, B. et al. Exposure to organochlorine pesticides is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma: a case–control study. **Journal of exposure science & environmental epidemiology**, v. 22, n. 6, p. 541–548, 2012.

ZHENG, M. et al. Metabolic disturbance in hippocampus and liver of mice: A primary response to imidacloprid exposure. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020.

ZIMMERMAN, G.; SOREQ, H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. **Cell and tissue research**, v. 326, n. 2, p. 655–669, 2006.



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37572

Título: Avaliação de mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados a neurotoxicidade de inseticidas neonicotinoides e herbicidas utilizados no RS

Vigência: 06/01/2020 à 30/12/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO DUTRA ARBO - coordenador desde 06/01/2020
MIRNA BAINY LEAL - pesquisador desde 06/01/2020
SOLANGE CRISTINA GARCIA - pesquisador desde 06/01/2020
Gabriela Göethel - pesquisador desde 06/01/2020
BRUNA DUCATTI TONIETTO - Aluno de Mestrado desde 06/01/2020
NÍCOLAS GUIMARÃES DOS SANTOS - Aluno de Especialização desde 06/01/2020
YASMIN VENDRUSCOLO PITON - Aluno de Especialização desde 06/01/2020
Larissa Vivian Cestonaro - Aluno de Doutorado desde 06/01/2020

Equipe Externa:

Diana Dias da Silva - pesquisador desde 06/01/2020
Bruno Dutra Arbo - pesquisador desde 06/01/2020
Eliane Dallegrave - pesquisador desde 06/01/2020
Luciana Grazziotin Rossato-Grando - pesquisador desde 06/01/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 14/10/2019 - Sala 56 do prédio 11209-Salas de aula do Campus Centro UFRGS - R. Sarmiento Leite, 425 - Centro Histórico, Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 48 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), 60 dias, machos, provenientes de Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do CEUA e do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 31 de Outubro de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética