



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIEGO ANACLETO DE SOUZA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL DE MALATHION SOBRE O
NEURODESENVOLVIMENTO: POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO CAUSAL COM O
COMPORTAMENTO AUTISTA**

TUBARÃO
2017

DIEGO ANACLETO DE SOUZA

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL DE MALATHION SOBRE O
NEURODESENVOLVIMENTO: POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO CAUSAL COM O
COMPORTAMENTO AUTISTA**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Jucélia Jeremias Fortunato, Dra.

TUBARÃO

2017

Souza, Diego Anacleto de, 1990-
S59 Efeitos da exposição pré e pós-natal de malathion sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista / Diego Anacleto de Souza ; -- 2017.
81 f. il. color. ; 30 cm

Orientadora : Jucélia Jeremias Fortunato.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Transtorno do espectro autista. 2. Sistema nervoso – Doenças. 3. Produtos químicos agrícolas. I. Fortunato, Jucélia Jeremias. II. Universidade do Sul de Santa Catarina – Mestrado Em saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.898

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Efeitos da exposição pré e pós-natal de malathion sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista

DIEGO ANACLETO DE SOUZA

AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 5 de maio de 2017.

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (orientador) Jucélia

Doutora Patrícia Duarte Simões Pires (Avaliador externo-UNESCO) Patricia

Doutora Jostane Somariva Prophiro (avaliador interno) Jostane Somariva Prophiro


Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedico este trabalho a minha mãe Maria da Glória da Silva Anacleto de Souza e, a minha vó, Hilda da Silva Anacleto. Eu as amo, muito!

AGRADECIMENTOS

Ao grande!

Agradeço primeiramente a **Deus**. Ele que é amor, paz e proteção esteve sempre comigo durante esta fase e em toda minha vida.

À Família

Agradeço minha família. Obrigado pela confiança, companheirismo e união. Agradecimento especial a minha vó **Hilda da Silva Anacleto**, minha irmã gêmea **Jolyne Anacleto de Souza** e minha grande inspiradora, minha mãe **Maria da Glória da Silva Anacleto de Souza**. Vocês são a base, a força e o motivo de tudo que faço em minha vida. Por vocês quero sempre ser melhor que ontem. Eu as amo muito!

Aos amigos do PPG-CS

Agradeço meus colegas e amigos do PPG-CS pela convivência e pelo compartilhamento de emoções, aprendizado e, claro, bons e inesquecíveis momentos de risadas e companheirismo. Obrigado **Roberto Beck** e **Fabiana de Medeiros**, vocês tornaram a caminhada até aqui ainda mais prazerosa e especial.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia

Agradecimento especial aos meus amigos do **Laboratório de Anatomia da Unisul**. Obrigado pela convivência diária, pela amizade e compreensão pelos momentos em que estive ausente. Vocês também foram importantes para mim nesta jornada. Os agradeço muito por isso.

Aos amigos do Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios Metabólicos NEUROIMet

Aos meus colegas e amigos por toda a colaboração e dedicação durante período experimental. Em especial aos colaboradores **Eduardo Peretti**, **Ana Olívia Martins Laurentino**, **Naiana da Rosa** e **Juliana de Oliveira**. Vocês foram essenciais.

Aos meus amigos

Aos meus amigos, primos e irmãos dessa família que tanto amo: **Família Silva**. Era em vocês que buscava refúgio nos momentos de fraqueza e dúvidas. Obrigado pelo “gás” de animação e de paz nos dias que mais precisei. Isto, sem vocês saberem...

A minha incrível orientadora

Agradeço a minha orientadora, amiga e colega, professora **Jucélia Jeremias Fortunato**. Dá graduação até aqui me acompanhando e me ensinando, muitas vezes, apenas por seus atos e atitudes, a como ser profissional. Você ama seu ofício e este amor nos contagia e nos faz perceber que: amar é fundamental para sermos felizes na profissão e na vida. Obrigado professora, você foi e é muito especial para mim. Orgulhosamente, me espelho em você.

A minha Esposa

Obrigado, meu amor! Esposa, amiga e companheira **Rafaela da Silva Albino Anacleto**. Obrigado pela compreensão, amor e companheirismo. Por você e por nossa família que embarquei nessa. Tudo o que faço é, e sempre será por nós.

PPG-CS

Agradeço a todo corpo discente e docente do **Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**. Obrigado pelo profissionalismo, competência e atenção.

A todos,

Enfim, agradeços a **todos** que, direta ou indiretamente contribuíram com minha jornada como acadêmico e profissional. O sucesso é um processo contínuo que depende de pessoas engajadas e generosas. Cheguei até aqui com vocês.

Obrigado, muito obrigado!

“ A pior pobreza é a de espírito! ”.

Mauricio Ricardo.

RESUMO

A exposição aos agrotóxicos organofosforados (OFs), incluindo o malathion, vem sendo associado a gênese de doenças neurológicas, como o Transtorno do Espectro Autista (TEA). O TEA é um distúrbio neuropsiquiátrico manifestado por prejuízos qualitativos na interação social recíproca, associado a distúrbios motores como estereotipias e interesse restrito. Devido ao aumento da prevalência do TEA e baseado em estudos que sugerem a contribuição de OF na origem deste transtorno, objetivou-se avaliar os efeitos ontogenéticos e comportamentais da exposição pré e pós-natal ao malathion em ratos Wistar. Para tanto, fêmeas prenhes foram divididas em dois grupos: Pré-natal, receberam malathion (200mg/kg) por gavagem nos dias gestacionais (DG) 06-14 e as que receberam malathion ao longo do período de lactação (21 dias). Os grupos controle receberam veículo no período e volume equivalente. Ao longo dos primeiros 21 dias pós-natais, a prole exposta prenatalmente a malathion foi submetida a análise de parâmetros ontogenéticos e reflexológicos. A sexagem ocorreu logo após término da análise da ontogênese de reflexo. No dia pós-natal (PDN) 30, 45 e 60, os machos expostos tanto no período pré quanto pós-natal foram submetidos a análises de parâmetros comportamentais e cognitivos. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal ao malathion causou alterações comportamentais significativas caracterizadas pela hiperatividade, aumento de movimentos estereotipados e prejuízo social, bem como prejuízos cognitivos relacionados à memória dos animais. Não houve alterações no crescimento físico das proles expostas ao malathion em relação ao grupo controle, sugerindo que o dano provocado pela exposição precoce a malathion seja exclusivamente neurológico. Os parâmetros comportamentais afetados pela exposição pré-natal a malathion também se tornaram prejudicados após exposição pós-natal. As alterações observadas neste estudo são compatíveis com a sintomatologia de pacientes com TEA. A compreensão destes efeitos alerta para o uso deste composto devido ao seu potencial neurotóxico e reforça a contribuição ambiental de OF na fisiopatologia de doenças neurológicas, como o TEA.

Descritores: Neurodesenvolvimento. Organofosforado. TEA.

ABSTRACT

Exposure to organophosphorus pesticides (OPs), including malathion, is associated with the pathophysiology of neurological diseases, such as Autistic Spectrum Disorder (ASD). ASD is a neuropsychiatric disorder manifested by qualitative impairments in reciprocal social interaction, associated with motor disorders such as stereotypies and restricted interest. Due to the increased prevalence of ASD based on studies suggesting the contribution of OP to the pathophysiology of this disorder, it was aimed to evaluate the ontogenetic and behavioral effects of pre and postnatal exposure to malathion in Wistar rats. Pregnant females were divided into two groups: prenatal, received malathion (200mg / kg) per gavage on gestational days (DG) 06-14 and those receiving malathion during the lactation period (21 days). The control groups received vehicle in the period and volume equivalent. During the first 21 postnatal days, the offspring prenatally exposed to malathion were submitted to the analysis of ontogenetic and reflexological parameters. Sexing occurred shortly after the analysis of reflex ontogenesis. In postnatal day (PND) 30, 45 and 60, males exposed in both the pre- and postnatal periods were submitted to behavioral and cognitive parameters analyzes. The results showed that prenatal exposure to malathion caused significant behavioral changes characterized by hyperactivity, increased stereotyped movements and social impairment, as well as cognitive impairment related to animal memory. There were no changes in the physical development of the offspring exposed to malathion in relation to the control group, suggesting that the damage caused by the early exposure to malathion is exclusively neurological. The behavioral parameters affected by prenatal exposure to malathion also became impaired after postnatal exposure. The changes observed in this study are compatible with the symptomatology of patients with ASD. The understanding of these effects alerts to the use of this compound due to its neurotoxic potential and reinforces the environmental contribution of OP in the pathophysiology of neurological diseases, such as ASD.

Keywords: Neurodevelopment. Organophosphorus. ASD.

LISTAS

Lista de abreviaturas

AC – Reação de endireitamento em queda livre

ACA – Abertura do canal auditivo

ACh – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ANOVA – Análise de variância

AO – Abertura do olho

APA – Abertura do pavilhão auditivo

BHE – Barreira hematoencefálica

C.H.A.M.A.C.O.S – do inglês, *Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas*

CC – Comprimento da cauda

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CID-10 – Classificação Internacional de Doenças

CPF – Clorpirifós

CTN – Células tronco neurais

CV – Colocação pelas vibrissas

DG – Dia gestacional

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSM – do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of the American Psychiatric Association*

EAPC – Eixo ântero-posterior do crânio

EL – Eixo longitudinal

ELLC – Eixo latero-lateral do crânio

FISPQ – Ficha de informação de segurança de produtos químicos

GN – Geotaxia negativa

GO – Gavagem

IL – Interleucina

mAChR – Receptor colinérgico muscarínico

MDC – Ácido dicarboxílico

MIA – Morte indolor assistida

MMC – ácido monocarboxílico
nAChR – Receptor colinérgico nicotínico
OF – Organofosforado
PC – Peso corporal
PND – Pós-Natal
PP – Pressão palmar
RD – Recuperação de decúbito
SN – Sistema Nervoso
SNA – Sistema Nervoso Autônomo
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP – Sistema Nervoso Periférico
TDAH – Transtorno de Atenção e hiperatividade
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TNF – α – Factores de Necrose Tumoral Alfa
UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina
UNIVALI – Universidade do Vale do Itajaí
VPA – Ácido Valpróico
ZV – Zona ventricular

Lista de quadros

Quadro 1 – Exposição pré-natal.....	36
Quadro 2 – Parâmetros ontogenéticos.....	36
Quadro 3 – Testes comportamentais.....	33
Quadro 4 – Exposição pós-natal.....	34

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura geral dos OFs..	22
Figura 2 – Representação estrutural do malathion.....	24
Figura 3 – Biotransformação do malathion.....	25
Figura 4 – Ontogênese de reflexo de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	44
Figura 5 – Eixo anteroposterior do crânio de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	45

Figura 6 – Eixo latero-lateral do crânio de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	45
Figura 7 – Comprimento da cauda de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	46
Figura 8 – Eixo longitudinal do corpo de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	47
Figura 9 – Peso corporal de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	48
Figura 10 – Crescimento físico dos ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida.....	49
Figura 11 – Número de <i>grooming</i>	50
Figura 12 – Números de <i>rearing</i>	51
Figura 13 – Números de <i>crossing</i>	51
Figura 14 – Frequência do parâmetro de interação social recíproca: Cheirar.....	53
Figura 15 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Seguir.....	53
Figura 16 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Montar.....	54
Figura 17 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Permitir a monta	54
Figura 18 – Frequência dos parâmetros de memória de reconhecimento social.....	55

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO.....	18
1.2 INTERFERÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DO SNC.....	20
1.3 ORGANOFOSFORADOS	21
1.3.1 Malathion	24
1.4 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	26
1.4.1 Tea e fatores ambientais	27
1.4.2 Tea x acetilcolina	28
1.5 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MÉTODOS	33
3.1 TIPO DE ESTUDO	33
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	33
3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS:.....	33
3.3.1 Acasalamento	33
3.3.2 Padronização da ninhada	34
3.4 MALATHION	34
3.4.1 Intoxicação induzida	34
3.5 DESENHO DE ESTUDO.....	35
3.5.1 Protocolo 1:	35
3.5.2 Protocolo 2:	37
3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO FÍSICO E ONTOGÊNESE DE REFLEXOS.....	38
3.6.1 Crescimento físico	39
3.6.2 Maturação das características físicas	40
3.7 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....	40
3.7.1 Testes de interação social e estereotipia:	41

3.7.2 Memória de reconhecimento social:	41
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA:	42
4. RESULTADOS	43
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO FÍSICO E ONTOGÊNESE DE REFLEXOS	43
4.1.1 Ontogênese de reflexos.....	43
4.1.2 Eixos do crânio.....	44
4.1.4 Eixo longitudinal do corpo	46
4.1.5 Peso corporal	47
4.1.6 Características físicas.....	48
4.2.1 Teste de <i>grooming</i>	49
4.2.2 Teste de <i>rearings</i>	50
4.2.3 Teste de <i>crossing</i>	51
4.2.2 Teste de Interação social recíproca.....	52
4.2.3 Memória de reconhecimento social:.....	54
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	68
ANEXO	69
REFERÊNCIAS.....	70

1.INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do sistema nervoso (SN) inicia no período pré-natal e se estende até o período pós-natal^{1,2}. Ainda que mecanismos de proteção operem em contribuição a esse desenvolvimento, como por exemplo, a placenta e a barreira hematoencefálica (BHE), fatores genéticos e não genéticos podem interferir negativamente nas fases de neurogênese, crescimento tecidual^{3,4} e na expressão de genes-chaves importantes para o desenvolvimento do SN^{5,6}.

Os fatores de risco não genéticos incluindo as interferências ambientais, vem ganhando atenção nos últimos anos^{5,6} e a exposição a agrotóxicos, devido sua propriedade tóxica, tem sido reconhecida como um insulto ambiental responsável por desencadear alterações no desenvolvimento neurológico⁷. Os principais agrotóxicos utilizados são os provenientes de compostos OFs^{7,8}, cujo efeito neurotóxico está na inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) que controla as ações centrais e periféricas do neurotransmissor acetilcolina (ACh)⁹. Estudos experimentais também apontam os agrotóxicos OFs como um insulto ambiental capaz de promover anormalidades no neurodesenvolvimento. O acúmulo de ACh nas sinapses resultantes desta inibição promove a hiperestimulação colinérgica¹⁰.

O uso intensivo de compostos OFs tem resultado em contaminação ambiental grave além de casos agudos e crônicos de intoxicação humana^{10,11}. Dentre a população exposta, gestantes, lactantes e crianças são reconhecidos por apresentarem alta vulnerabilidade à exposição a estes compostos¹². Uma exposição durante umas destas fases de desenvolvimento tem sido associada a déficits no desenvolvimento neurológico, no comportamento durante a infância, bem como por prejuízos na função cognitiva e motora das crianças¹⁰⁻¹³.

Dependendo da dose e/ou intensidade, a intoxicação por OF, pode levar à alterações neurofisiológicas e comportamentais^{11,12,13}, além de promover prejuízos na função sensório-motora e cognitiva de roedores expostos tanto no período pré quanto pós-natal^{10,11,12}.

O malathion é o composto OF mais utilizado na agricultura e em programas de saúde pública¹⁴, no controle de pequenos vetores como mosquitos¹⁵. Neste cenário, o Brasil constitui-se o maior produtor e consumidor de agrotóxicos dos países em desenvolvimento¹⁶. Em Santa Catarina, um estudo realizado em 2012

sobre a realidade das intoxicações humanas por agrotóxicos apontou os compostos OFs¹⁷ como principais contaminantes em casos de intoxicações humanas no Estado¹⁸.

Sendo o malathion um composto OF e tendo por isso o sistema colinérgico como alvo, por meio da inibição de AChE, tem-se sugerido que uma exposição a malathion em fases distintas de desenvolvimento promove disfunções no neurotransmissor ACh¹⁹. O desequilíbrio na homeostasia colinérgica está associado a distúrbios sobre o neurodesenvolvimento com manifestações comportamentais¹⁹. Estudos pré-clínicos utilizando protocolos distintos de exposição/intoxicação²⁰ sugerem ainda a participação dos OFs na gênese de distúrbios neuropsiquiátricos que variam de esquizofrenia²¹, transtorno de déficit de atenção (TDAH)²² e TEA²³.

O TEA representa um grupo de transtornos caracterizados por um espectro compartilhado de prejuízos qualitativos na interação social, associados a comportamentos repetitivos e interesses restritos pronunciados². Diversas linhas de pesquisa atribuem a fatores ambientais a influência no desenvolvimento de anormalidades na circuitaria neural que desencadeia o TEA²⁴ e que algumas variações genéticas conferem vulnerabilidade a esses estressores²⁵ causando alterações fisiológicas no SNC²⁵.

Assim, considerando o potencial neurotóxico de compostos OFs a partir de sua capacidade em promover alterações em diferentes sistemas orgânicos e sua ampla distribuição em ambientes rurais e domésticos, este estudo propõem investigar os efeitos comportamentais da exposição pré e pós-natal ao malathion e a possível relação com o desenvolvimento do comportamento autista.

Tendo em vista a contribuição do sistema colinérgico na mediação de processos neurais complexos e, sendo este sistema alvo de compostos OFs, baseado em evidências clínicas⁷ e experimentais²⁰, é possível que uma exposição ao malathion em fases críticas do neurodesenvolvimento possa estar relacionada com alterações fisiopatológicas semelhantes àquelas encontradas em indivíduos autistas.

1.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO

O desenvolvimento do SN inicia com a concepção e continua durante os períodos pré e pós-natal, incluindo a fase adulta¹. Por meio de programação genética e de processos generativos (nascimento celular e formação de sinapses) e degenerativos (morte celular e poda sináptica) ocorre a modulação das etapas do neurodesenvolvimento em diferentes graus²⁶. O SN maduro é dividido em: Sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP).

O SN surge a partir do ectoderma, camada germinativa¹, que se invagina formando o tubo neural, com duas aberturas: o neuroporo rostral e o neuroporo caudal²⁶. No interior do tubo neural se encontram as células-tronco neurais (CTN)²⁷. A cavidade cilíndrica do tubo neural forma a zona ventricular (ZV) região em que também se encontram as CTN²⁸, as quais fornecerão base para organização do cérebro em desenvolvimento²⁹.

A formação da arquitetura cerebral está associada a eventos que ocorrem ao longo das extremidades do tubo neural⁵. A porção rostral do tubo neural se desenvolve e se diferencia em três unidades estruturais primárias, as vesículas, que determinarão os aspectos estruturais principais do SN: o prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo³⁰. Posteriormente estas estruturas darão origem ao telencéfalo (córtex cerebral e os núcleos de base) e o diencéfalo; mesencéfalo; e o metencéfalo (cerebelo e a ponte) e mielencéfalo (bulbo), respectivamente. A medula espinal se desenvolve a partir da extremidade caudal do tubo neural⁵.

O interior das vesículas encefálicas primitivas é preenchido por líquido cefalorraquidiano que dará origem aos ventrículos encefálicos e aos canais de comunicação entre eles²⁹. Concomitante ao desenvolvimento do SNC, desenvolve-se o SNP³⁰ cuja maioria de suas estruturas (gânglios e nervos) surge a partir das cristas neurais que se formam nos dois lados do tubo neural, quando este se fecha²⁷.

Tanto o SNC, quanto o SNP originam-se a partir de CTNs que, ainda em período pré-natal, sofrem sucessivas e específicas divisões mitóticas permitindo a origem das células nervosas³. Estas células interagem-se para assegurar a estruturação e função do SN maduro⁴. A proliferação celular, após o fechamento do tubo neural, origina, dentro da matriz germinal, todo o restante funcional estrutural e celular do SN^{4,31}. Embora a produção e a migração de neurônios representem

eventos pré-natais, reconhece-se que continuam durante um período prolongado após o nascimento com diferenciação e maturação durante toda a infância e fase adulta¹.

Após o nascimento, a estrutura morfológica e funcional do encéfalo não está completamente estabelecida³¹. Dois gradientes de desenvolvimento ocorrem durante os primeiros dois anos: o primeiro se refere a ordem em que as áreas funcionais gerais do cérebro se desenvolvem, e o segundo a ordem em que as estruturas se desenvolvem dentro das áreas primitivas correspondentes^{28,32}.

Em geral, primeiro, amadurecem as regiões correspondentes as funções primárias, tais como os sistemas motores e sensoriais. O córtex de associação temporal e parietal, associado às habilidades básicas de linguagem e à atenção espacial, amadurecem em seguida^{28,31,32}. Por último, amadurece o córtex pre-frontal, lateral e temporal, as áreas corticais integradoras de ordem superior, chamadas áreas de associação, que intervêm entre processos sensorimotores e modulam a atenção básica e os processos de linguagem^{28,31,32}.

Entre seis e quinze meses, a taxa de desenvolvimento do SNC humano é acelerada no lobo temporal, no giro do cíngulo e na ínsula, vindo em seguida o lobo occipital, e por último os lobos parietal e frontal, que já passaram pela maior parte do seu desenvolvimento^{26,31}. Por volta dos dois anos, às áreas primárias sensitivas alcançam o desenvolvimento da área motora e há um breve progresso nas áreas de associação²⁶.

O SNC continua a se desenvolver, no nível microscópico, na mesma sequência até a adolescência e possivelmente até a idade adulta²⁶. A mielinização das fibras nervosas é somente um sinal de maturidade e as fibras podem conduzir impulso antes da mielinização⁴. O papel morfogênico adulto ainda necessita de mais estudos, porém evidências sugerem que a neurogênese adulta é fundamental para os processos de memória, plasticidade e por substituição de células após lesão do SNC ou processos neurodegenerativos^{4,5,26}.

O desenvolvimento do SN ocorre tanto no período pré quanto no pós-natal, e requer um ambiente neural adequado¹. Fatores internos ou externos^{33,34} exercem diferentes influências sobre a trajetória de desenvolvimento neurológico^{35,36,37}. Os fatores externos podem agir durante qualquer uma das fases de desenvolvimento e tem sido associados a deformidades físicas em recém-nascidos, além de distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos, tanto em crianças quanto em adultos¹⁻⁵.

1.2 INTERFERÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DO SNC

O desenvolvimento do SNC exige sinalização altamente específica de caminhos biológicos fundamentais⁶. Estas vias regulam cuidadosamente a expressão de genes durante as diferentes etapas de desenvolvimento⁶. As fases iniciais deste processo são as mais sensíveis, pois são períodos em que as bases para a formação do encéfalo estão sendo estabelecidas^{33,34} e o desenvolvimento dos mecanismos de proteção no tecido materno e fetal ainda não estão concluídos³⁵.

Estímulos externos como dieta³⁶, uso de medicamentos, infecções e inflamações maternas e a exposição a diversas substâncias tóxicas durante a gestação são exemplos de perturbações^{36,37} capazes de interromper processos importantes do neurodesenvolvimento como o padrão e o crescimento encefálico, a formação e migração de neurônios, a formação de sinapses, além de alterações no sistema endócrino e na homeostasia do sistema imunológico³⁰.

A exposição a substâncias químicas tem recebido maior atenção devido a sua ampla diversidade^{27,38,39}. A transmissão destes produtos químicos para o corpo pode ocorrer por inalação, ingestão ou contato com a pele, podendo até acumular-se em alguns órgãos e tecidos corporais^{40,41}. Pelo fato dessas interferências ambientais poderem muitas vezes ativar células do sistema imune e fazê-las secretar mediadores imunológicos, como as citocinas, a neuroinflamação foi apontada como capaz de prejudicar o SN em desenvolvimento levando a desordens neuropsiquiátricas⁴².

Neste sentido, estudos epidemiológicos encontraram associação entre inflamação materna durante a gestação e o risco aumentado de ocorrências de distúrbios no SNC^{42,43,44}. O fluxo de sangue, um fator importante na função placentária e crescimento fetal, também é afetado por estressores ambientais⁴⁵. Substâncias tóxicas acumulam-se em tecidos fetais aproximadamente quatro vezes mais do que em tecidos maternos induzindo alterações fisiopatológicas e comprometimento de vias importantes para o desenvolvimento saudável⁴⁵.

O uso de agrotóxicos, principalmente os provenientes de compostos OFs, tem se tornado um preocupante estressor ambiental⁴⁶. Atrelado aos benefícios que estes compostos trazem a agricultura e em áreas urbanas eles geralmente persistem

no ambiente ocasionando poluição ambiental grave e casos agudos e crônicos de intoxicação humana⁴⁶. Os agrotóxicos OFs, durante o neurodesenvolvimento, inibem a função da AChE e conseqüentemente a disposição de ACh⁴⁶. Esses neurotransmissores desempenham papel morfogênico durante o período pré-natal, controlando e coordenando a montagem da arquitetura neural. Toxinas ambientais no início da vida também são conhecidas por afetar a subseqüente expressão gênica no encéfalo^{47,48}.

Além disso, a toxicidade aguda por OF tem sido associada a doenças cardiovasculares, respiratórias, gastrointestinais, e distúrbios sensório-motores⁴⁸. Estes danos fisiológicos podem manifestar-se a longo prazo como prejuízos na memória e transtorno de ansiedade e humor^{35,48}. A exposição crônica ao OF está associada a distúrbios cognitivos e neurocomportamentais, além de prejuízos motores e neurosensoriais^{35,48}. Estes sintomas podem, não necessariamente, ser dependentes da inibição da AChE¹¹. Estudos com animais indicam que tanto exposições crônicas quanto agudas à OF podem resultar em uma variedade de sintomas neurocomportamentais, particularmente relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos^{49,48,49}.

A exposição a OF exerce efeitos negativos sobre o desenvolvimento de células neuronais, à síntese de DNA, a transcrição de genes, a diferenciação celular, e sinaptogênese^{48,49,50}. Além de alvejar outros sistemas neurais, como, sistema dopaminérgico e serotoninérgico^{49,50}.

Embora indivíduos adultos representem uma classe bastante susceptível à exposição a OF, principalmente devido ao seu uso em atividades agrícolas, estudos apontam para crianças e neonatos como grupo etário importante no que se refere à exposição destes compostos^{17,48,49}. Deste modo, tem-se sugerido que a neurotoxicidade de muitos compostos OFs podem estar envolvidas na gênese de neuropatologias durante a fase do neurodesenvolvimento, pois, nesta fase, a susceptibilidade a interferências ambientais é mais severa⁴⁹⁻⁵⁴.

1.3 ORGANOFOSFORADOS

A história dos OFs se inicia em 1937⁵⁴. Um grupo de químicos alemães liderados por Gerhard Scharader na Farben Fabriken Bayer, sintetizaram os

primeiros OFs em substituição aos organoclorados, já que esses últimos apresentavam características indesejáveis, como a bioacumulação^{53,54}.

Estruturalmente os OFs podem ser derivados do ácido fosfórico, tiofosfórico, ditiofosfórico e fosfônico (Figura 1)⁵³. A inserção dos OFs no mercado é datada das décadas de 60 a 80 e no ano de 1999 estes compostos já respondiam 40% do mercado mundial de agrotóxicos⁵⁴. O sucesso comercial se explica pela alta efetividade contra pragas⁵⁴.

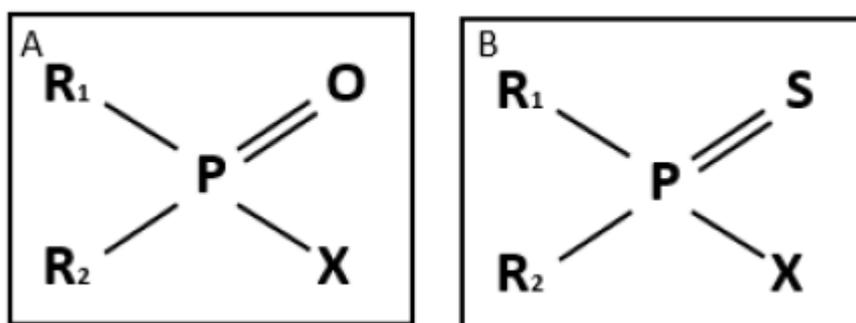


Figura 1 – Estrutura geral dos OFs. (A) O átomo de fósforo (P) pode estar ligado através de uma dupla ligação com o oxigênio (O) ou (B) com o enxofre (S). R1 e R2 representam os grupos alcoxil. X= grupo substituível. Adaptado de Costa, 2006⁵⁵.

Os OFs podem ser comercializados como pós, granulados, líquidos, pastilhas, emulsões e aerossóis⁵³. São utilizados tanto no meio laboratorial como doméstico, estendendo seu emprego no controle de pragas na agricultura, em diversas indústrias, na medicina e inclusive no armamento químico⁵⁴. Estes agrotóxicos são pouco hidrossolúveis e de acordo com a dose utilizada, podem exercer ação antiparasitária, inseticida⁵⁵ ou tóxica¹⁶, pois são solúveis em solventes orgânicos e lipídios, veículos que podem facilitar a absorção cutânea destes compostos^{53,56,57}.

O Brasil ocupa o primeiro lugar no mercado consumidor mundial de agrotóxicos⁵⁸. No país, estão autorizados 37 ingredientes ativos do grupo químico dos OFs⁵⁹. Dez recebem a classificação toxicológica I (extremamente tóxico), dezesseis a classificação II (altamente tóxico), nove a classificação III (medianamente tóxico) e um a classificação IV (pouco tóxico)⁵⁹. É importante destacar que 70,3% estão entre a classificação I e II, extremamente e altamente

tóxico para o ser humano⁵⁹. De acordo a ficha de informação de segurança de produtos químicos (FISPQ), o malathion ocupa a classificação toxicológica II.

Após absorvidos, estes compostos são distribuídos para todos os tecidos e são metabolizados a nível hepático⁵³. Os metabólitos podem ser ativados (pela oxidação do grupo P=S ou P=O) ou inativados, sendo este último causado por transformações bioquímicas estruturais ou pela ligação a certos sítios no organismo⁵³.

Os OFs exercem sua ação neurotóxica através da inibição funcional das enzimas: AChE, encontrada nas sinapses do SNC, SNP, parassimpático e nas junções neuromusculares; e da enzima butirilcolinesterase ou AChE inespecífica encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração, em outros tipos de tecidos⁵³.

A inibição irreversível da AChE ocorre através da fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima⁵³. Essa inativação ocasiona prejuízo na hidrólise da ACh, ocasionando a acumulação desse neurotransmissor nas sinapses do SNC e SNP⁴⁶. A hiperestimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) e nicotínicos (nAChR) desencadeia manifestações clínicas caracterizada como síndrome colinérgica⁴⁶.

Os OFs interferem também no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas, incluindo efeito na secreção de insulina pelas células beta-pancreáticas, e contribuem para o desencadeamento do estresse oxidativo⁵⁰. O estresse oxidativo desencadeado pelos OFs ocorre durante os processos metabólicos de degradação do composto, principalmente, devido à geração de radicais livres e à alteração no sistema de enzimas antioxidantes, através da diminuição da atividade de enzimas antioxidantes importantes durante as reações degradadoras⁵⁰.

A inibição crônica da AChE no tecido nervoso por OF e consequente desregulação do sistema colinérgico tem sido associada a doenças neurológicas devido a déficits em eventos celulares específicos durante o neurodesenvolvimento^{51,52}. Estudos clínicos⁴⁹ e pré-clínicos²³ sugerem a exposição a agrotóxicos como um fator ambiental que contribui para perturbações no neurodesenvolvimento e alterações neurobiológicas, tais como: TEA²³.

As inúmeras agressões à saúde humana decorrentes da utilização de agrotóxicos durante períodos agudos ou crônicos podem desencadear uma série de alterações que vão desde desordens neurocomportamentais, efeitos teratogênicos a

até a morte^{62,63}. Esta variedade de efeitos sugere que os mecanismos de ação através dos quais estas substâncias atuam podem ir além, ou ainda, serem independentes da inibição da AChE⁶³.

1.3.1 Malathion

Dentre os compostos OFs mais utilizados no mundo, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil, destaca-se o malathion (éster dietil dimetoxifosfotiol), por ser um agrotóxico usado em áreas rurais e urbanas em uma variedade de situações que inclui produtos farmacêuticos (Figura 2)²². O malathion é um produto químico fabricado em duas formas: uma pura que constitui um líquido incolor e uma solução de grau técnico (líquido amarelo acastanhado), que contém o malathion (superior a 90%)⁶⁴.

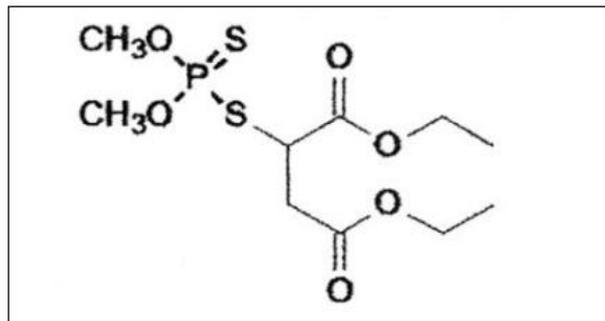


Figura 2 – Representação estrutural do malathion. Adaptado de WHO, 2003⁶⁵.

O malathion é um agrotóxico com alto potencial de exposição humana^{62,65}. O malathion, após absorção, é oxidado no fígado por enzimas do Citocromo P-450. O malaoxon, metabólito resultante, é o responsável pelos efeitos tóxicos observados⁶⁵. O metabolismo do malathion também se dá através de uma enzima carboxilesterase hepática que catalisa a degradação do malathion a derivados como o malathion ácido monocarboxílico (MMC) e malathion ácido dicarboxílico (MDC)(Figura 3)⁶⁶.

malathion pode induzir inúmeros distúrbios neuroquímicos e neurocomportamentais como aqueles envolvidos na gênese do TEA⁷¹.

1.4 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O TEA é uma condição complexa de desordens do neurodesenvolvimento⁷². Com base a 5ª edição do *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-5), os critérios diagnósticos que definem o TEA incluem: déficit nas habilidades sociais de comunicação verbal e não verbal associados a comportamentos, interesses ou atividades restritivas e repetitivas. O TEA é uma das comorbidades infantis mais comuns, apresentando graus variados de severidade representando um problema de saúde pública².

Pacientes com TEA apresentam grandes variações individuais, necessitando de cuidados extensivos e compromissos permanentes das famílias^{73,74,75}. Estas alterações podem ser detectadas nos três primeiros anos de vida e persistem até a vida adulta^{2,76}. O TEA é de 4-5 vezes mais prevalente em homens que em mulheres^{2,77}. A causa dessa diferença não é bem compreendida^{74,77,78}. Entretanto, sugere-se o envolvimento de cromossomo sexuais e a influências hormonais no útero^{74,78,79} como fator de proteção aos insultos que desencadeiam o TEA.

Os critérios que definem o TEA têm evoluído ao longo dos anos^{2,75}. A primeira definição prática apareceu no DSM-III, e foi influenciada pela conceptualização de prejuízo no desenvolvimento social e insistência na monotonia do desenvolvimento comunicativo e surgimento antes de 30 meses de idade^{80,81,82}.

As revisões posteriores da quarta edição (DSM-IV) e da 10ª revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10), em que o TEA foi referido como Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, enfatizou uma tríade de características: deficiências na ação social; deficiências na comunicação; comportamento, repetitivos e estereotipados e de interesses e atividades restrito^{83,84,85}.

A última revisão, DSM-5, publicado em maio, 2013, adotou o TEA. Um termo “guarda-chuva” de distúrbio sem uma definição de subtipos, e reorganizou a tríade em uma tríade: dificuldades na comunicação social, e interação social; e comportamento restrito e repetitivo, interesses ou atividades^{86,87}. Os novos critérios dão melhores descrições e organização dos principais recursos, de enfatizar a natureza dimensional do autismo, fornecer um rótulo diagnóstico individualizado, e

permitir uma avaliação do indivíduo de necessidade de apoio ajudando prestação de serviços clínicos⁸⁸.

A etiologia do TEA permanece desconhecida. Entretanto, sugere-se que o espectro de sintomas deste transtorno e as condições médicas associadas, sejam decorrentes de disfunções no SNC, que levam a uma desordem no padrão do desenvolvimento neural e comportamental da criança. Os mecanismos propostos responsáveis por tal fisiopatogênese, inclui a participação de fatores ambientais e/ou predisposições genéticas^{78,79}.

1.4.1 Tea e fatores ambientais

A compreensão do autismo evoluiu consideravelmente nos últimos 70 anos, com um crescimento exponencial na pesquisa desde meados da década de 90⁸⁹. Os estudos mostram que o conjunto de condições de desenvolvimento neurológico presentes no TEA pode ser atribuído a fatores etiológicos distintos⁸⁹, provavelmente, resultado de complexas interações entre fatores de risco genéticos e não genéticos⁸⁹.

Um estudo realizado em 2011 por Hallmayer e colaboradores, sugere que fatores genéticos são responsáveis por 35-40% dos elementos que contribuem⁹⁰, o 60-65% restante é provavelmente devido a exposição a fatores ambientais durante os períodos pré, peri e pós-natais^{91,92}. Neste sentido, tem-se atribuído a influências de fatores ambientais, como exposição a produtos químicos⁹³⁻⁹⁷, a responsabilidade por afetar o desenvolvimento neurológico⁹⁸.

As alterações fisiopatológicas observadas envolvem estresse oxidativo, distúrbios bioquímicos e ativação inadequada de citocinas pró-inflamatórias⁹⁹⁻¹⁰². A respeito da ativação imune, a resposta inflamatória inclui a participação de citocinas como Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF α) e interleucina 1 beta IL-1 β ¹⁰³, citocinas conhecidas por causar neurotoxicidade e danos neuronais^{43,44}.

Tanto infecções, quanto exposição química podem desencadear uma resposta inflamatória, como é o caso da exposição a agrotóxicos^{10,104,105}. A inflamação desencadeada por fatores ambientais pode contribuir para a deterioração das barreiras biológicas, como a BHE, o que conduz à subsequente liberação de mediadores pró-inflamatório e ativação microglial^{43,44}.

Estudos experimentais e clínicos têm sugerido que a inflamação pode promover alterações cerebrais associadas a fisiopatologia de doenças neurológicas como o TEA⁴². Por exemplo, a inflamação perinatal foi associada a alterações sobre o sistema glutamatérgico e Gabaérgicos⁴² e desequilíbrio da regulação de dopamina. Além disso, o dano associado pode manifestar-se por meio de mudanças comportamentais como, dificuldades de aprendizagem e prejuízos no comportamento social⁴².

Alguns agrotóxicos são conhecidos por prejudicar a função tireoidiana materna durante a gravidez, alterar o equilíbrio cérebro excitatório/inibitório afetando a função mitocondrial ou estresse oxidativo, terminando com um fenótipo autista (às vezes sem grandes anomalias noutros sistemas corporais)²⁵. Um estudo realizado em 2014 relatou um aumento do risco de diagnóstico TEA em crianças cujas mães viviam durante a gravidez perto dos campos onde foram aplicados agrotóxicos OFs⁷.

Sendo o sistema colinérgico alvo destes compostos, e tendo por isso a disposição adequada de ACh, é possível que a exposição precoce a agrotóxicos OFs eleva os níveis de ACh durante o desenvolvimento do SNC, resultando em incoerências no desenvolvimento de vias neurais importantes na manutenção da saúde do indivíduo^{106,107}. Em períodos vulneráveis de desenvolvimento, a totalidade ou parte de tais mecanismos poderiam desencadear as vias fisiopatológicas que conduzem a doenças que acometem o SNC, como o TEA^{107,108}.

1.4.2 Tea x acetilcolina

A ACh é um mediador químico de sinapses no SNC, no SNP e também na junção neuromuscular^{108,109}. A ACh, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica¹¹⁰.

No SNC, a ACh apresenta inúmeras funções, estando implicada no processo cognitivo (atenção, aprendizado e memória), na motivação e recompensa, no processamento de estímulos, além da participação no processo de sono e vigília¹¹¹. Além disso, a ACh desempenha importantes papéis tróficos no desenvolvimento do SNC durante o período embriológico participando de eventos celulares tais como a diferenciação neuronal e formação de sinapses⁷⁰. Sabe-se que uma variedade de

doenças neurológicas tem sido relacionadas a alterações nestes importantes eventos celulares durante o neurodesenvolvimento¹¹¹.

A ACh age sobre canais de receptores distribuídos no SNC, sendo expressos em neurônios e células não neuronais, como astrócitos, microglia, células precursoras de oligodendrócitos e células endoteliais¹⁰⁹. A desregulação da neurotransmissão colinérgica tem sido associada a várias condições fisiopatológicas¹⁰⁹, incluindo esquizofrenia¹¹¹, doença de Alzheimer¹¹³ e TEA^{112, 114}.

Um dos mecanismos sugeridos em relação à associação entre sistema colinérgico e TEA aponta diferenças no tamanho, número e estrutura de neurônios do núcleo basal colinérgico do cérebro de crianças autistas¹¹⁵. A diminuição das concentrações de colina, um precursor da ACh, e de nAChR foram observados em pacientes com TEA¹¹⁶, além disso, baixos níveis de colina citosólica foram correlacionados com a gravidade desta síndrome¹¹⁷ e a lesão de células colinérgicas¹¹⁸ pode conduzir comportamentos típicos do TEA em roedores¹¹².

A ACh também está envolvida no mecanismo de reconhecimento de faces¹¹⁷. Pacientes autistas apresentam prejuízo no contato visual efetivo⁸⁰. Ao analisar os mecanismos envolvidos no reconhecimento e contato visual, incluindo a implicação de neurotransmissores no córtex visual, é observado uma importante contribuição de ACh nas propriedades biofísicas dos neurônios e em sua eficácia sináptica¹¹⁷. Conseqüentemente, um déficit em inervações colinérgicas no giro fusiforme (região consistentemente ativa durante visualização do rosto em indivíduos com desenvolvimento típico) pode ser observado em indivíduos adultos com TEA⁷⁰.

A transmissão de ACh é mediada pelos receptores: mAChR (acoplados à proteína G) e nAChRs (canais ionotrópicos). Os nAChRs são mais expressos em ambas as células: diferenciadas e indiferenciadas do SNC, e são conhecidos por influenciar o desenvolvimento e modular múltiplas vias de neurogênese tais como vias de sinal de crescimento celular e também medeiam a síntese e libertação de neurotransmissores estimuladores e inibitórios induzidos pelos seus agonistas durante o desenvolvimento cerebral^{118,119}.

Em um estudo realizado em cérebros de autistas adultos *post-mortem*, verificou-se que houve uma redução de nAChR uma característica importante da fisiopatologia neuroquímica do TEA¹²⁰. Ainda, estudos de imuno-histoquímica *post-mortem* revelaram redução das várias subunidades de nAChR e de mAChR no neocórtex, cerebelo, tálamo e corpo estriado de pacientes com TEA^{114, 121}.

Neste contexto, a importância desse sistema tem sido significativamente evidenciada¹¹¹ e os dados sugerem que o envolvimento fisiopatológico pode variar de núcleos colinérgicos e expressão alterada de receptores de ACh a disfunções dos receptores colinérgicos^{111,114} e as alterações comportamentais podem, da mesma forma, ter um envolvimento considerável no quadro clínico do TEA¹²¹.

1.5 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

Em estudos acerca do desenvolvimento do SNC, além de análises em respostas comportamentais, tem-se observado em modelos animais parâmetros ontogenéticos e reflexológicos^{122,123}. Um reflexo é uma resposta motora estereotipada do SNC frente a estímulos internos ou externos¹²⁴. Estas respostas podem ser inconscientes e servem como mecanismos de proteção ou de sobrevivência¹²⁵. Os reflexos representam uma das expressões comportamentais da função cerebral¹²³ e o aparecimento de cada reflexo pode estar relacionado com taxa de desenvolvimento de regiões específicas do SNC¹²⁶.

O SNC apresenta um período de crescimento rápido ou um período vulnerável que corresponde à maior taxa de diferenciação e migração celular, neurogênese, sinaptogênese, maturação e mielinização das vias de neurotransmissores^{6,33,34}. Dependendo das espécies de animais, este período crítico de desenvolvimento neural ocorre em fases diferentes na vida⁶. Em ratos, a maioria dos eventos relacionados com o período crítico de desenvolvimento ocorre durante os primeiros 21 dias pós-natais, o que corresponde ao período de amamentação¹²³.

Em modelos animais, esta evolução neurocomportamental pode ser acompanhada por meio da utilização de testes sensório-motores (reflexos) desde o nascimento até o desmame¹²⁶. Estes testes podem ser úteis para avaliar alterações induzidas por agentes farmacológicos e/ou toxicológicos em pequenos roedores durante as fases iniciais de desenvolvimento¹²⁷.

Algumas respostas comportamentais, assim como reflexos, tais como, preensão palmar, endireitamento ou recuperação do decúbito, mostram regularidade em seu tempo de aparecimento e subsequente maturação¹²². Neste sentido, modelos animais vêm se tornando uma ferramenta confiável para avaliar anormalidades no neurodesenvolvimento frente a um estímulo externo, como por exemplo, a exposição a substâncias químicas^{14,128}. A exposição prolongada e as

formas de composição destes compostos elegem os agrotóxicos, principalmente aqueles provenientes de compostos OFs, como um importante agressor sobre o SNC¹²⁸.

No que diz respeito o efeito da exposição a OF sobre parâmetros sensórios motores, o período pré e pós-natal são reconhecidos como sensíveis a essas injúrias¹²⁹. Em ratos, por exemplo, a exposição crônica de OF durante a gestação tardia foi relacionada a prejuízos em parâmetros reflexológico: recuperação ao decúbito e aversão ao precipício¹³⁰.

Em consonância com dados pré-clínicos, evidências epidemiológicas têm demonstrado o papel dos OFs na gênese de anormalidades sensório-motoras^{131,132}. Em um estudo de corte que leva o nome de C.H.A.M.A.C.O.S (do inglês, *Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas*), que incluía gestantes residentes em uma grande área de produção agrícola, a presença de OF na urina ou no sangue materno foi associada a deficiências no funcionamento de reflexo em lactentes¹³². Dados semelhantes foram relatados por Engel e colaboradores¹³³. Os autores demonstraram que níveis elevados de OF no sangue do cordão umbilical foi associado a problemas mentais e prejuízos psicomotor de desempenho e atenção em crianças avaliadas nos 12, 24 e 36 meses de vida¹³⁴.

Deste modo, considerando o aumento significativo no número de casos de doenças neurológicas e psiquiátricas^{21,135}, e sendo exposição a OF um preocupante estressor ambiental cujo exposição crônica e aguda está relacionado a inúmeras disfunções neurológicas, propõe-se investigar através deste estudo os efeitos causados pela exposição pré e pós-natal ao OF malathion sobre o crescimento físico e ontogênese de reflexo de uma prole de ratos Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição pré e pós-natal do organofosforado malathion sobre o neurodesenvolvimento de ratos Wistar e a possível relação com o comportamento autista.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar, na prole, o efeito da exposição pré-natal do malathion sobre:

- Avaliação da maturação dos reflexos;
- Crescimento físico;
- A maturação das características físicas.

Investigar os efeitos da exposição pré e pós-natal do malathion sobre os seguintes parâmetros comportamentais:

- Parâmetros de estereotipia (PND30-60);
- Parâmetros de interação social (PND30-60);
- Memória de reconhecimento social (PND45).

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

É um estudo experimental utilizando modelo animal.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

A utilização de animais neste estudo seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (*Principles of Laboratory Animal Care*, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NIH, publicação número 80-23, revisada em 1996) e os procedimentos experimentais foram realizados após aprovação da Comissão de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina sob protocolo: 16.036.2.10.IV (Anexo). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclos de luz artificial respeitado (12 horas claro/escuro), recebendo ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

3.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS:

Foram utilizadas 06 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (60 dias), virgens, pesando entre 250/300g, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, que de acordo com o desenho de estudo foram acasaladas com 03 machos da mesma linhagem e idade. Cada ninhada resulta em média oito filhotes com distribuição equivalente entre os gêneros, (quatro filhotes machos e quatro filhotes fêmeas) totalizando o número amostral de animais necessários ao estudo.

3.3.1 Acasalamento

Para o acasalamento, as fêmeas foram introduzidas ao final do período de luz (19h00min) nas gaiolas dos machos, na proporção de duas fêmeas para cada macho. Às 7 horas da manhã do dia posterior foi verificada a possibilidade de

preñez por meio do esfregaço vaginal, que consiste na introdução de cloreto de sódio através de uma pipeta plástica no canal vaginal da fêmea, coletando secreção para análise em microscópio óptico a procura de espermatozoides junto ao material biológico do animal¹³⁶. Quando verificada a presença de espermatozoides, considerou-se como o dia gestacional (DG) zero daquela fêmea¹³⁷. As fêmeas prenhes, também chamadas de matrizes, foram separadas aleatoriamente caracterizando o grupo experimental e o controle, sendo colocadas individualmente na gaiola moradia onde permaneceram durante todo o período gestacional¹³⁶.

3.3.2 Padronização da ninhada

Os partos aconteceram de forma natural e durante os primeiros 21 dias pós-natal foi realizado na prole análise do parâmetro de ontogênese de reflexo e crescimento físico. Foi utilizado neste período descendente de ambos os sexos (machos e fêmeas) expostos pré-natalmente ao malathion (ou controle). O desmame e a diferenciação entre os gêneros (machos e fêmeas), aconteceu no PND21 e foi realizada através da verificação da diferença visual relacionada à distância anogenital, que é perceptivelmente maior em machos¹³⁸. Logo após, foi realizada a padronização da quantidade de 10 filhotes machos por grupo de tratamento (malathion e controle) os quais foram submetidos a testes comportamentais realizados no PND30, PND45 e PND60. Os testes estão descritos no item 3.5.

3.4 MALATHION

A escolha das doses do malathion foi baseado em trabalhos anteriores calculada diretamente a partir da classe comercial e corresponde a 1/10 de dose letal (DL)₅₀ (desde DL₅₀ = 2000 mg / kg de peso corporal para o rato)^{139,140}.

3.4.1 Intoxicação induzida

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: (a) **Grupo Malathion** e (b) **Grupo Controle**. O período de exposição ao OF obedeceu às janelas de desenvolvimento do SNC. Assim, este estudo teve 02 protocolos

experimentais de exposição ao malathion: protocolo 1 (exposição pré-natal) e protocolo 2 (exposição pós-natal).

3.5 DESENHO DE ESTUDO

3.5.1 Protocolo 1:

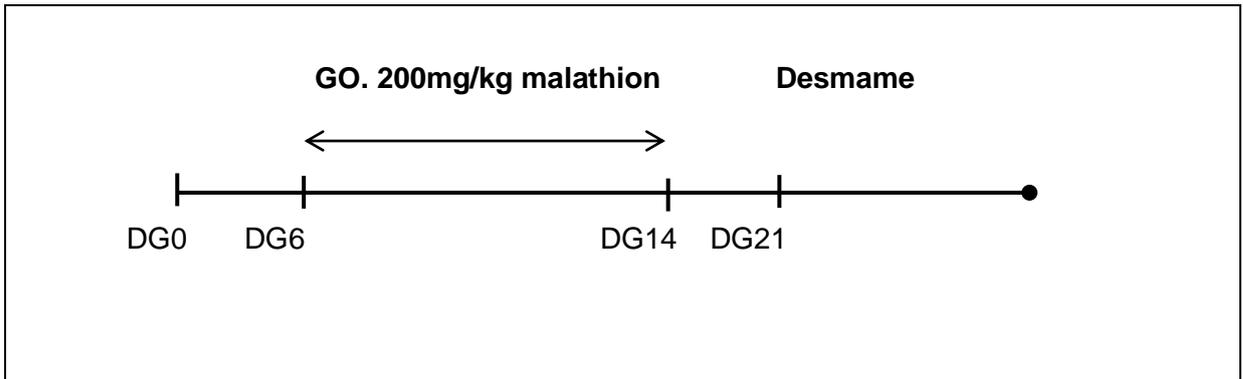
As matrizes do grupo malathion (n=03) receberam administração via gavagem (GO), a partir do DG6 até o DG14 de malathion na dose de 200 mg/kg¹⁴¹. Durante este período de exposição, eventos críticos do neurodesenvolvimento, principalmente o fechamento do tubo neural, estão sendo realizados (Quadro 1)¹⁴². A exposição pré-natal contou com 06 ratas prenhas, sendo 03 expostas a malathion, na já mencionada dosagem, e 03 ratas expostas a óleo de milho no volume e período equivalente ao grupo malathion perfazendo o grupo controle.

Após o nascimento, a prole foi mantida com suas matrizes durante todo período de lactação (21 dias). Ao longo desta fase foram realizadas análises referentes ao crescimento físico e ontogênese de reflexos da prole. Nestes testes foram utilizados descendentes de ambos os sexos (machos e fêmeas) (Quadro 2).

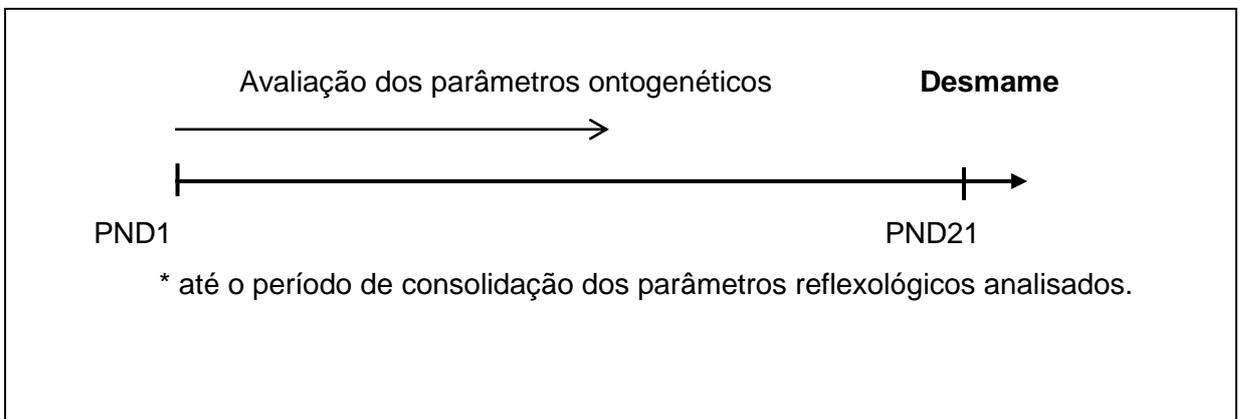
No PND22, após a sexagem, as fêmeas foram encaminhadas a morte indolor assistida (MIA) e os machos foram submetidos à padronização da quantidade de 10 filhotes por grupo de tratamento (grupo malathion e grupo controle) os quais foram submetidos a testes comportamentais realizados no PND30, PND45 e PND60 (Quadro 3).

Ao total, considerando as matrizes e proles foram utilizados 29 animais.

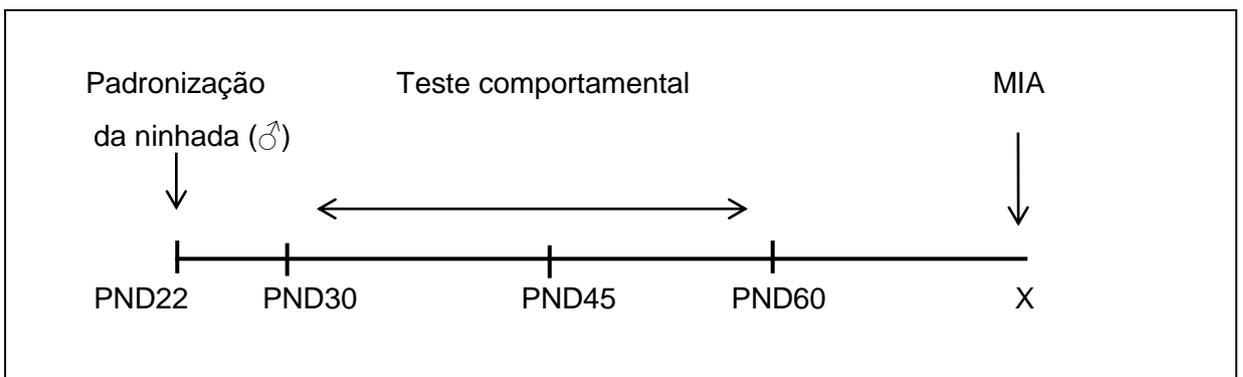
Quadro 1- Exposição pré-natal



Quadro 2 – Parâmetros ontogenéticos



Quadro 3 – Testes comportamentais



3.5.2 Protocolo 2:

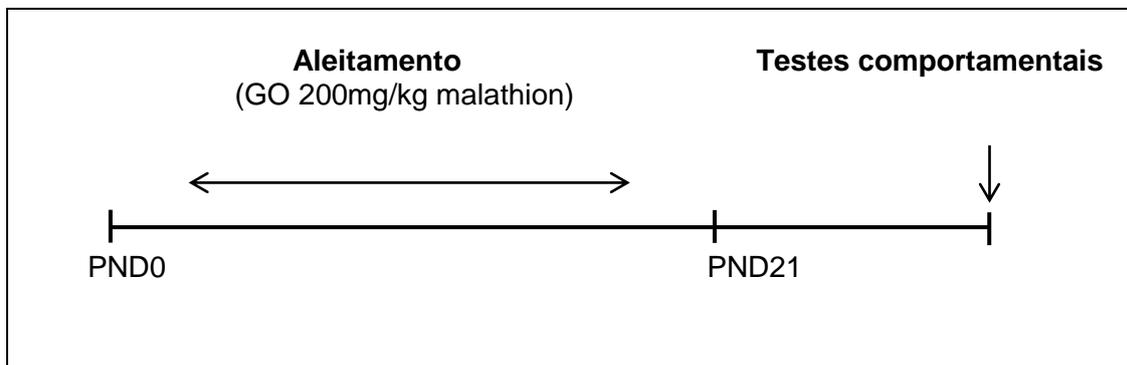
Embora a injeção subcutânea pudesse imitar a exposição cutânea, ela não considera adequadamente a disposição e o metabolismo do agrotóxico quanto à penetração através da pele e a influência do contato materno¹⁴³. Assim, a via oral foi selecionada para exposição das matrizes.

Deste modo, para o protocolo 2, o malathion na dose 200mg/kg foi administrado (GO) as matrizes (n=03) durante todo o período de aleitamento (21 dias)¹⁴⁴. Para o grupo controle (n=03) administrou-se apenas o veículo, óleo de milho, no volume e período equivalente ao grupo malathion¹⁴⁵ (Quadro 4).

O volume de injeção foi de 1 mL / kg de peso corporal¹⁴⁴ e para garantir a amamentação adequada e uniforme, ou seja, respeitando a quantidade de mamas das matrizes, a ninhada das matrizes foi padronizada a quantidade de 08 animais.

Após o desmame (PND21) foi padronizado 10 filhotes por grupo de tratamento: grupo malathion e grupo controle, e designados aos testes comportamentais realizados no PND30, PND45 e PND60.

Quadro 4 – Exposição pós-natal (via lactação materna)



3.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO FÍSICO E ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

Em cada animal dos dois grupos que permaneceram até o desmame foi analisada a ontogenia reflexa. Os reflexos foram investigados desde o 1º dia de vida do animal até o dia de sua consolidação. As análises foram feitas entre 9:00 às 11:00 horas da manhã¹⁴⁶. O reflexo foi considerado consolidado quando a resposta total foi observada de maneira inequívoca durante 03 dias consecutivos¹⁴⁶. As avaliações foram procedidas utilizando-se instrumentos elaborados ou existentes no laboratório. Abaixo estão descritos os reflexos que foram avaliados¹⁴⁶.

Preensão Palmar (PP) – Quando a pata anterior é acariciada com um instrumento metálico, o membro estimulado tende a ser flexionado para agarrar o instrumento. Este reflexo é primitivo e inato, sendo sua presença indicativa de imaturidade do SNC, ou seja, com a maturação ocorre inibição deste reflexo. Foi registrado, portanto, o dia do seu desaparecimento como positivo (P)¹⁴⁶.

Recuperação de Decúbito (RD) - Quando o animal é colocado em decúbito dorsal (de costas) ele imediatamente se vira para descansar na posição normal com todos os quatro pés no solo. Durante 10 segundos é observado esta eventual resposta parcial ou total do endireitamento corporal. Considerado, portanto, uma resposta Neg, quando o animal não conseguir sair da postura em que for colocado; P, quando o animal girar o corpo e assumir o decúbito ventral¹⁴⁶.

Colocação pelas Vibrissas (CV) - O rato é suspenso pela cauda de tal forma que suas vibrissas toquem levemente a borda de uma mesa, sendo assim mantido, o animal tende a elevar sua cabeça e estender seus membros anteriores com o objetivo de apoiar-se sobre a superfície da mesa ou iniciar a caminhada. Serão consideradas como respostas: Neg, a ausência de orientação de movimentos em direção ao apoio; P, quando o animal colocará as duas patas anteriores sobre a mesa e realizar movimentos de marcha, associados com extensão do tronco, dentro de no máximo de 10 segundos¹⁴⁶.

Aversão ao precipício (AP) - Quando o rato é colocado na borda de uma superfície do tipo “precipício” ou tampo da mesa com as patas dianteiras e face sobre a borda, ele irá girar e rastejar longe da queda do penhasco. A resposta é considerada P quando o animal, no tempo máximo de 10 segundos, se deslocar para um dos lados (num ângulo de pelo menos 90 graus) e caminhar em sentido

contrário à borda, caracterizando a aversão ao precipício. A resposta Neg é caracterizada pela ausência de qualquer reação e/ou queda do animal¹⁴⁶.

Geotaxia Negativa (GN) - Quando o animal é colocado em uma inclinação de ângulo 45 graus com a cabeça apontando para baixo de inclinação, ele vai virar e rastejar até a inclinação. Considera-se como respostas: P, se o animal, num período máximo de 10 segundos, girar aproximadamente 140 graus, posicionando a cabeça em sentido ascendente; abaixo deste ângulo, será considerada resposta Neg¹⁴⁶.

Reação de Endireitamento em Queda Livre (AC) - O rato será segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano, servirá como guia). O animal é então solto sobre um leito de espuma sintética e sua queda livre será observada. A resposta é considerada P, quando o animal realizar uma rotação do corpo, voltando o ventre para baixo e caindo na superfície do leito apoiado sobre as quatro patas¹⁴⁶.

3.6.1 Crescimento físico

A análise do crescimento físico da prole foi obtida por meio de observações do peso corporal (PC), da medição do comprimento corporal (EL), comprimento da cauda (CC), eixos do crânio: eixo latero-lateral do crânio (ELLC) e ântero-posterior do crânio (EAPC). Essas medições foram feitas a partir do PND1 e a cada dois dias até o PND21.

A análise foi realizada sempre no mesmo horário, período matutino. Nos testes foram utilizados uma balança eletrônica (*Fanem*®, precisão de 100 mg) e um paquímetro (STARRET®, 0,05 precisão mm).

Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC): Para a medida do eixo ântero-posterior do crânio, tomar-se como referência a linha média que vai da extremidade do focinho até o ponto de interseção com outra linha perpendicular imaginária. Essa linha passa tangencialmente às extremidades posteriores dos pavilhões auriculares.

¹⁴⁶.

Eixo latero-lateral do crânio (ELLC): Este eixo é representado pela linha imaginária perpendicular ao eixo longitudinal do crânio, dividindo os pavilhões auriculares ao meio¹⁴⁹.

Comprimento da cauda (CC): o animal é contido delicadamente com uma das mãos do pesquisador. Posteriormente a cauda do animal é estendida e marcado

com uma caneta na mesa o início e fim da cauda. E posteriormente realiza-se a medida¹⁴⁶.

Eixo longitudinal (EL): O eixo longitudinal foi medido contendo o animal delicadamente. Em seguida era realizada marcas na mesa coincidentes com o focinho e a base da cauda do animal. A partir daí era procedido a medida da distância em *mm* entre os pontos obtidos.

Peso corporal (PC): O peso corporal da prole foi medido com uma balança eletrônica (Marte, modelo S-100 com uma sensibilidade de 0,01 g).

3.6.2 Maturação das características físicas

As observações das características físicas foram realizadas diariamente durante todo o período de aleitamento, sempre no turno matutino (09h00min-10h00min). As características físicas observadas foram:

- Desdobramento das orelhas externa (APA);
- Abertura do canal auditivo (ACA);
- Abertura do olho (AO).

A idade de maturação destas características foi definida como o dia em que ocorreu pela primeira vez.

3.7 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em PN30, PND45 e PND60 com o objetivo de avaliar o efeito da exposição ao OF sobre parâmetros comportamentais da prole expostas durante o período pré e pós-natal a malathion. Todos os testes foram conduzidos entre o período das 9:00 às 13:00 horas, em baixa iluminação e monitorados com câmera de vídeo. O pesquisador não permaneceu na sala de experimentação para evitar qualquer interferência na resposta comportamental dos animais. Antes de qualquer um dos procedimentos de avaliação comportamental, os animais foram levados em suas gaiolas-moradia à sala de experimentação com 1 hora de antecedência – representando o período de habituação. Todos os equipamentos foram limpos com álcool 70% após o teste de cada animal, impedindo a permanência de odores.

3.7.1 Testes de interação social e estereotipia:

Os testes de interação social e estereotipia foram realizados no trigésimo e sexagésimo dia pós-natal. O teste de interação social é baseado na tendência natural dos roedores em investigar com maior dedicação um indivíduo intruso que lhe for apresentado pela primeira¹⁴⁷.

No teste de interação social os animais foram submetidos a interagir, individualmente, por 05 minutos, com um outro animal desconhecido do mesmo sexo e da mesma faixa etária. O aparato utilizado consistiu em uma caixa de madeira (60x60x30 cm) com 3 paredes laterais de madeira e uma parede de vidro transparente que permitisse a visualização do comportamento do animal.

A análise realizada no teste de interação social seguiu as descrições de Moreira e colaboradores¹⁴⁸ e compreendeu a quantificação do número de vezes dos seguintes comportamentos sociais: cheirar, seguir, montar ou permitir a monta do animal intruso.

O teste de estereotipia seguiu as descrições de Battisti e colaboradores¹⁴⁹. O comportamento estereotipado é bem definido pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros dianteiros. O teste foi realizado durante 5 minutos¹⁴⁹.

3.7.2 Memória de reconhecimento social:

O teste de reconhecimento social vem sendo utilizado como um modelo válido para o estudo da memória de curta duração, utilizado para demonstrar possíveis efeitos “amnésicos” de diferentes substâncias e procedimentos sobre a memória social^{150,151}. O teste consiste em duas apresentações sucessivas de 5 minutos cada, sendo que a segunda apresentação é feita após um intervalo de tempo de 30 minutos.

Inicialmente todos os animais que participaram do experimento, foram separados em caixas individuais 24 horas antes do teste para que fossem habituados somente com seus próprios odores, sem a interferência dos odores de seus coespecíficos. Os animais mantidos nestas condições foram considerados “residentes”. Na primeira apresentação, um animal (intruso) foi introduzido na caixa de um animal residente, e observou-se durante 5 minutos o tempo que o animal

residente gastou investigando o rato intruso. Por investigação social entendem-se os atos de cheirar, montar, permitir a monta e seguir, que são medidos em número de vezes.

Após o final da primeira apresentação, o animal jovem foi retirado da caixa, e então o rato adulto ficou isolado por 30 minutos. Após este intervalo de tempo, o mesmo rato jovem foi reapresentado ao rato adulto por mais 5 minutos, e então, o tempo de investigação foi novamente registrado. A diminuição do tempo de investigação na segunda apresentação demonstra o reconhecimento social, já que reconhecendo o animal jovem, o rato adulto tende a perder o interesse em investigá-lo novamente.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si com *pos-hoc* de *Tukey*. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. O número de animais em cada grupo está baseado em estudos prévios.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CRESCIMENTO FÍSICO E ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

4.1.1 Ontogênese de reflexos

A exposição a agrotóxicos, como OF, durante período crítico do neurodesenvolvimento em humanos tem sido considerada um fator ambiental que contribui para perturbações no neurodesenvolvimento e para o desenvolvimento de distúrbios neurobiológicas como o TEA²³. As anormalidades neurocomportamentais podem ser observadas pela taxa de crescimento físico e maturação dos reflexos neurológicos desde o nascimento até o desmame¹⁵². Deste modo, animais expostos durante o período pré-natal ao malathion e seu respectivo controle foram submetidos a análise da maturação da ontogênese de reflexos e das características físicas durante o período de lactação (1^o ao 21^o dia pós-natal).

Os resultados da análise do parâmetro de ontogênese de reflexo demonstraram que os reflexos: RD, AP, GN e AC da prole do grupo malathion apareceram significativamente ($p < 0,05$) mais tarde em comparação com os filhotes do grupo controle. Não houve diferença significativa na maturação dos reflexos PP e CV do grupo malathion em comparação com o grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 4).

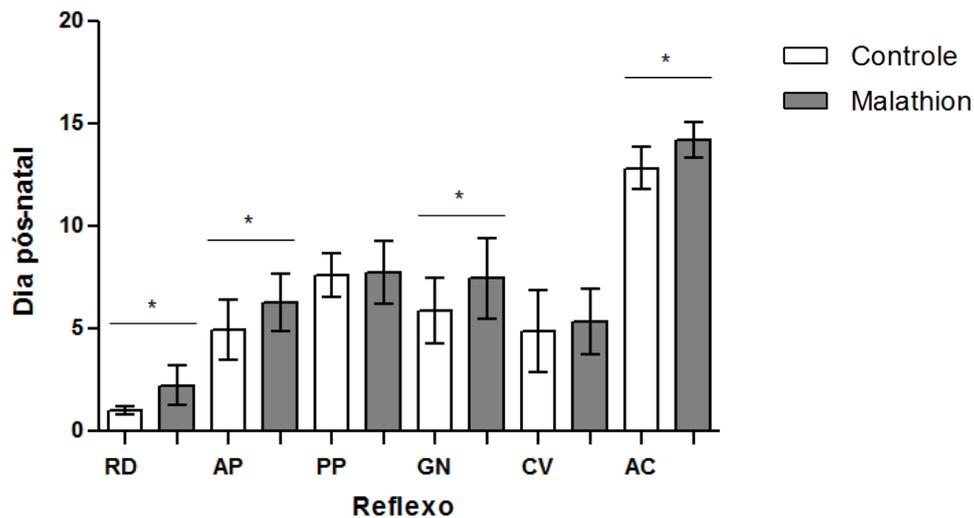


Figura 4– Ontogênese de reflexo de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1^o ao 21^o dia de vida. RD (recuperação em decúbito); AP (aversão ao precipício), PP (pressão palmar), GN (geotaxia negativa), CV (colocação de vibrissas), AC (recuperação em queda livre). Dados apresentados em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.1.2 Eixos do crânio

Com relação à análise do crescimento físico, na comparação realizada entre os indicadores: eixos do crânio (EAPC e ELLC), a prole das matrizes do grupo malathion não apresentou déficit no crescimento destes parâmetros quando comparado com a prole do grupo controle ($p > 0,05$) (Figuras 5 e 6).

Com base nesta observação, sabe-se que crianças com TEA apresentam um tamanho normal da cabeça no nascimento, mas que em seguida é possível observar comportamentos sociais atípicos quando comparado com crianças sem o transtorno¹⁵³.

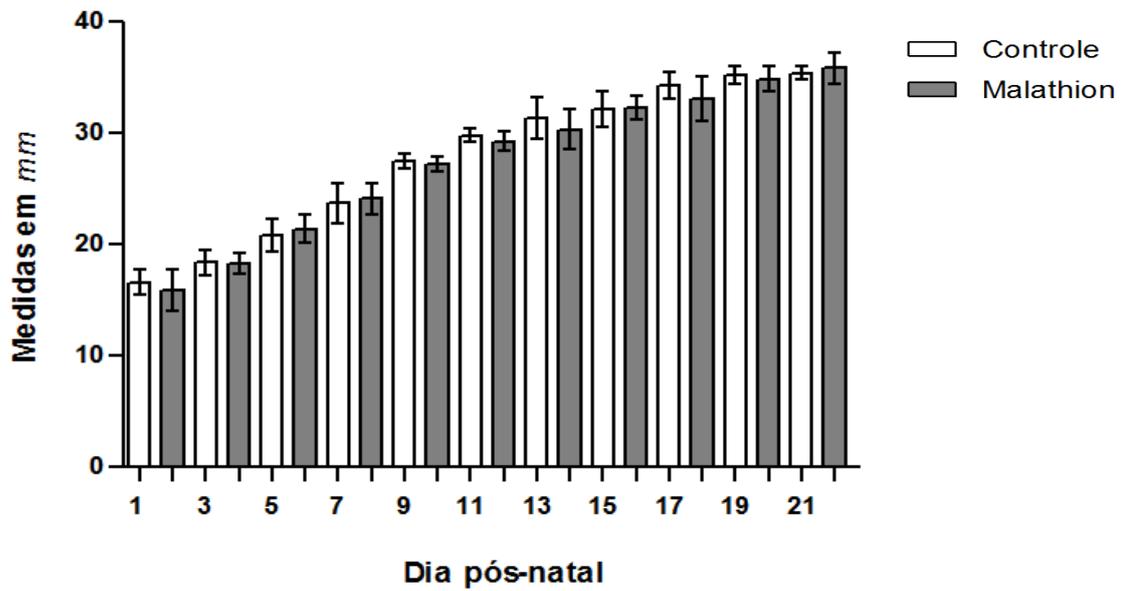


Figura 5 – Eixo anteroposterior do crânio de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

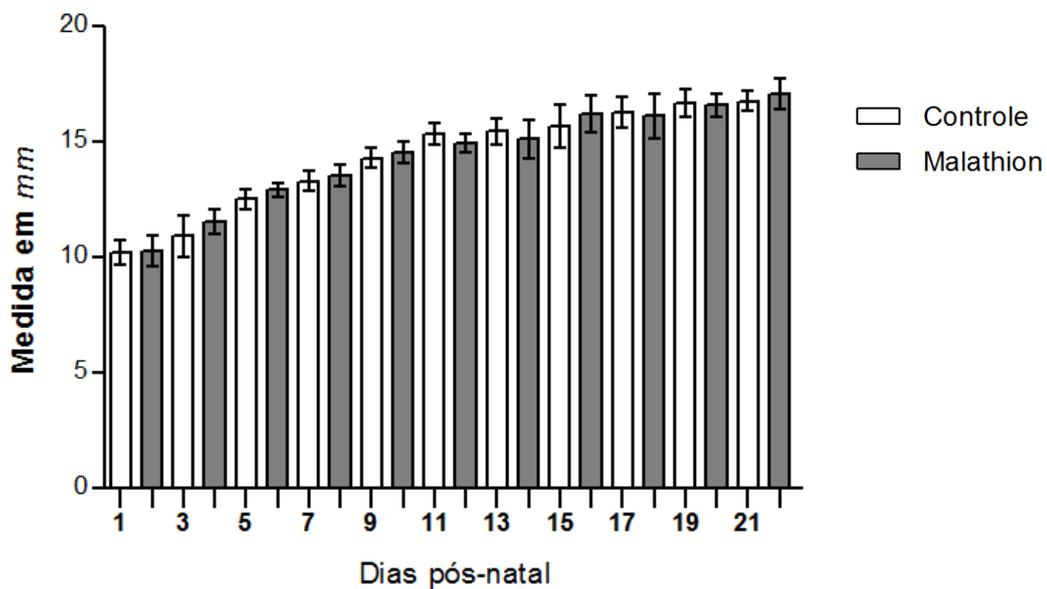


Figura 6 – Eixo latero-lateral do crânio de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.1.3 Comprimento da cauda

Quanto ao comprimento da cauda, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação das medidas do grupo malathion comparado com o grupo controle durante os primeiros 21 dias pós-natal ($p > 0,05$) (Figura 7).

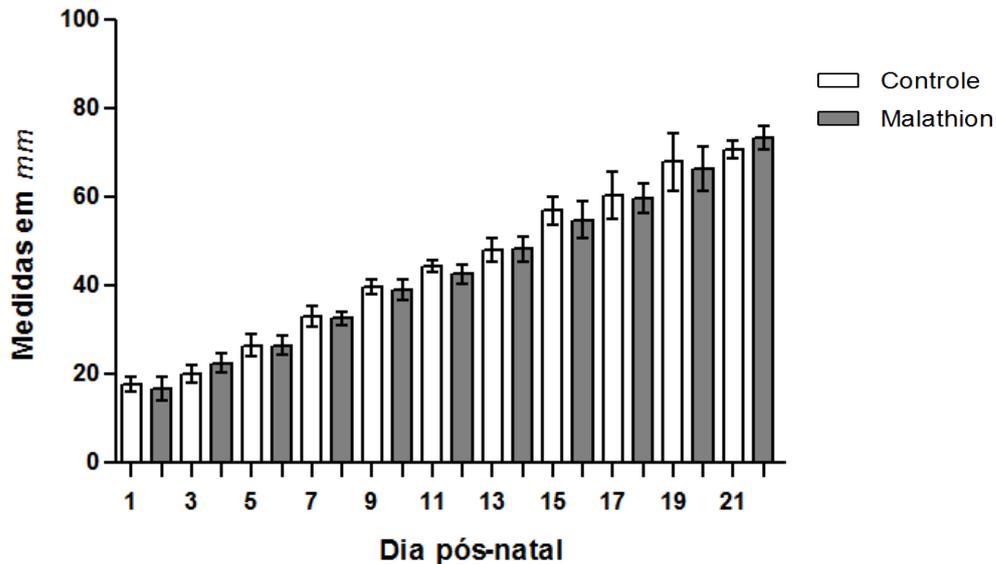


Figura 7 – Comprimento da cauda de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.1.4 Eixo longitudinal do corpo

Assim como o comprimento da cauda, o crescimento do eixo longitudinal do corpo da prole do grupo malathion não apresentou diferença significativa durante os primeiros 21 dias pós-natal quando comparado com o grupo malathion ($p > 0,05$) (Figura 8).

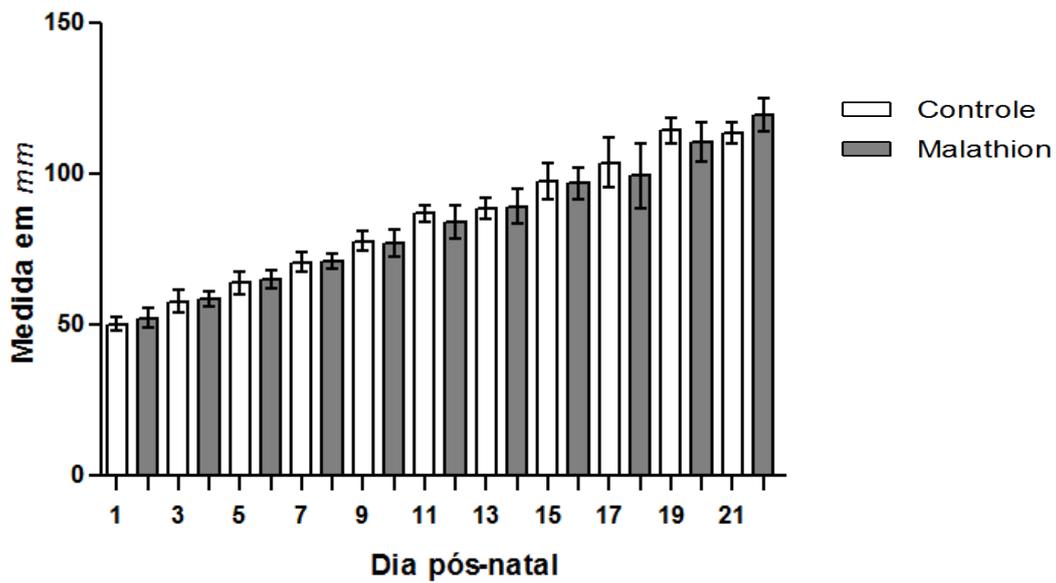


Figura 8 – Eixo longitudinal do corpo de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.1.5 Peso corporal

Quanto ao peso corporal da prole, um indicador útil do crescimento físico, os resultados demonstram que não houve diferença significativa na evolução ponderal da prole do grupo malathion em relação aos filhotes do grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 9).

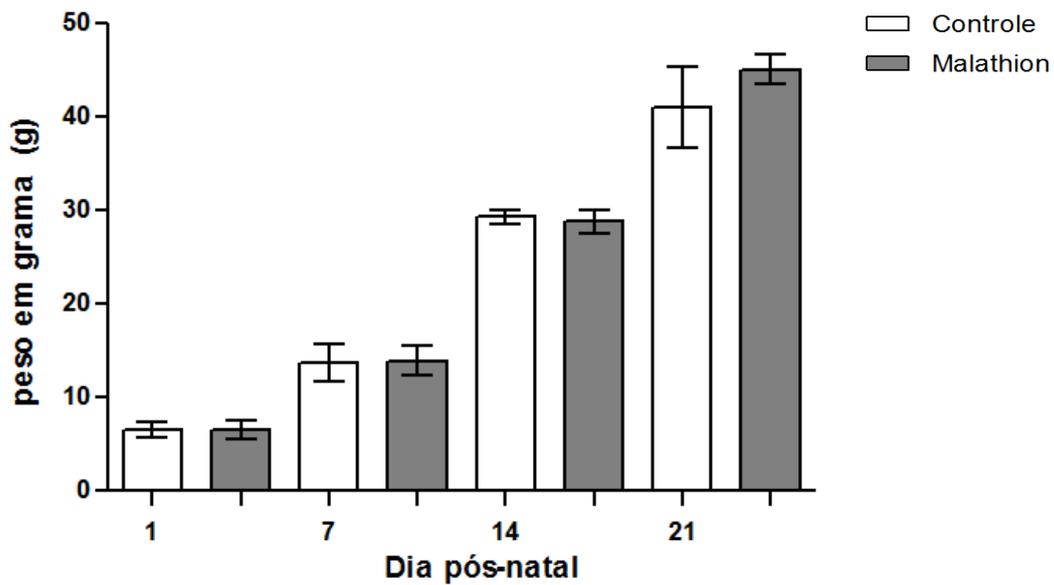


Figura 9 – Peso corporal de ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1^o ao 21^o dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.1.6 Características físicas

Com relação aos parâmetros de maturação das características físicas analisadas (APA, ACA, CA e AO), evidenciou-se que o período de amadurecimento destas características no grupo malathion não apresentou diferença quando comparado com o grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 10).

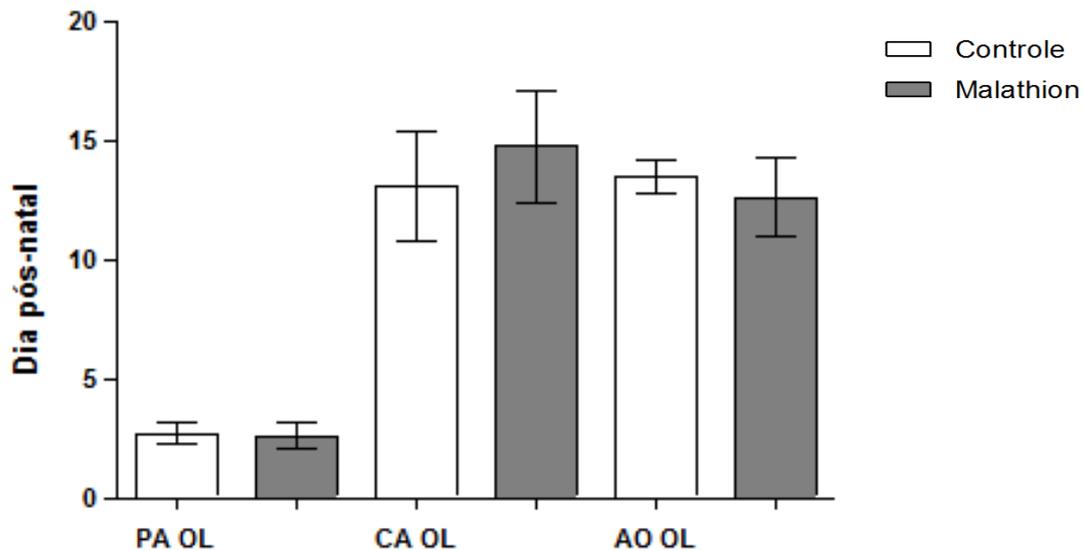


Figura 10 – Crescimento físico dos ratos neonatos avaliados durante o período de aleitamento: 1º ao 21º dia de vida. Dados apresentados em média \pm S.D. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL E PÓS-NATAL AO MALATHION

Os animais foram submetidos ao teste de habituação ao campo aberto para avaliar os parâmetros de *grooming*, *rearing* e *crossing*. O teste foi realizado no PND30 e PND60. Participaram deste protocolo filhotes machos expostos ao malathion ou óleo de milho (grupo controle) durante o período pré e pós-natal.

4.2.1 Teste de *grooming*

O parâmetro *grooming* corresponde aos movimentos estereotipados¹⁵². O aumento de episódios deste parâmetro em roedores se assemelha e está associado com o comportamento repetitivo apresentado por indivíduos com TEA^{153,154}.

Quando avaliados no PND30, a análise do parâmetro de *grooming* mostrou que a prole do grupo malathion exposto tanto no período pré quanto pós-natal apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) deste parâmetro quando comparado com o grupo controle (Figura 11).

Além disso, no PND60 pode-se notar uma tendência ao aumento neste parâmetro em ambos os protocolos de exposição ao malathion quando comparados aos animais do grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 9).

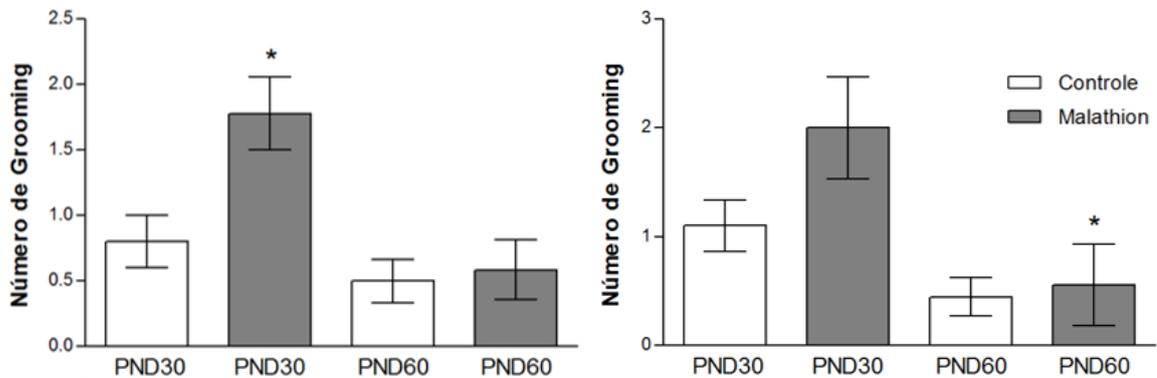


Figura 11 – Número de *grooming* mensurados durante 5 min. (A) exposição pré-natal; (B) exposição pós-natal. Os dados foram expressos em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.2.2 Teste de *rearings*

O parâmetro *rearing* é considerado um comportamento exploratório (ou de atividade locomotora)¹⁴⁹. Uma alteração neste comportamento pode estar relacionado a um quadro de hiperatividade e ansiedade, comorbidades que integram as manifestações clínicas de indivíduos com TEA⁸¹.

Os resultados da análise de *rearing* demonstram que tanto o grupo malathion, quanto o grupo controle expostos durante o período pré e pós-natal, não apresentaram episódios de *rearing* no PND30.

Entretanto, no PND60, pode-se perceber na prole pré-natalmente exposta ao malathion um aumento significativo deste parâmetro quando comparado com seu respectivo controle ($p < 0,05$) (Figura 12). Não houve diferença significativa na frequência de *rearings* dos animais na comparação dos animais de ambos os grupos pós-natalmente.

Os resultados sugerem que a exposição pré e pós-natal ao malathion causou um comportamento hiperativo nos animais e que este comportamento é semelhante ao que consistentemente coocorre em indivíduos com TEA¹⁶².

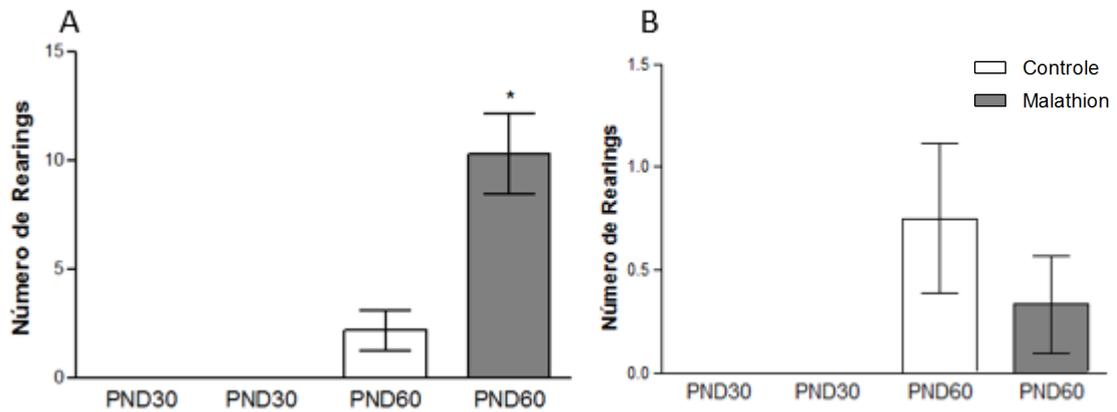


Figura 12 – Números de *rearing* mensurados durante 5 min. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. Os dados foram expressos em média \pm SD*. $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.2.3 Teste de crossing

Assim como o *rearing*, por meio da análise do número de *crossing* é possível aferir o índice de atividade locomotora como indicativo de comportamento de ansiedade e hiperatividade, comorbidades presente em muitos pacientes autistas¹⁰¹.

Os resultados da análise de *crossing* demonstraram que no PND30 os grupos pré e pós-natalmente expostos ao malathion apresentaram um aumento não significativo deste parâmetro exploratório quando comparado aos seus respectivos controles ($p > 0,05$) (Figura 13).

No PND60, o grupo exposto durante o período pré-natal a malathion apresentou um aumento significativo de *crossing* quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Porém, a prole exposta ao malathion durante a lactação apresentou diminuição significativa no número de *crossing* quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

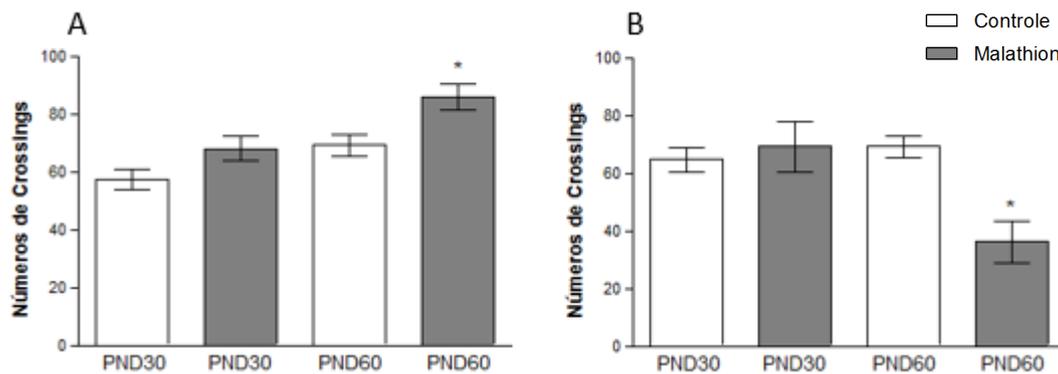


Figura 13 – Números de *crossing* mensurados durante 5 min. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. Os dados foram expressos em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.2.2 Teste de Interação social recíproca

O teste de interação social recíproca tem por objetivo avaliar o comportamento social do animal¹⁴⁷. Prejuízos na interação social é uma das características mais proeminentes do TEA, podendo manifestar-se através do isolamento ou manifestações inadequadas de relacionamento social. Devido à exposição a OF estar associada à doenças que causam comportamentos sociais atípicos, o teste de interação social recíproca foi realizada¹⁰¹.

Os resultados do parâmetro de interação social demonstram que a exposição pré e pós-natal ao malathion foi capaz de promover prejuízos no comportamento social das proles resultantes a esta exposição. Os resultados do parâmetro de cheirar demonstraram que o grupo malathion de ambos protocolos de exposição (pré e pós-natal) apresentaram uma redução significativa neste parâmetro quando comparado com os grupos controles ($p < 0,05$).

Diferença significativa também foi observada no parâmetro seguir do grupo malathion exposto pré-natalmente comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). E um uma diminuição expressiva no comportamento: permitir a monta do grupo malathion exposto durante o aleitamento comparado com o grupo controle ($p < 0,05$).

Os demais parâmetros analisados demonstram que houve uma tendência à redução no comportamento social no grupo malathion comparado com o grupo controle ($p > 0,05$). Estes resultados permitem sugerir que a exposição pré e pós-

natal ao OF malathion foi capaz de causar prejuízos no comportamento social dos animais (Figuras 14,15,16,17).

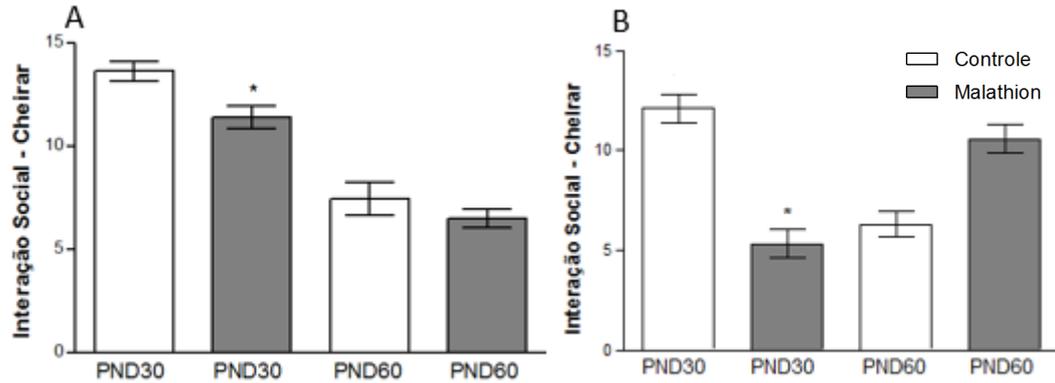


Figura 94 – Frequência do parâmetro de interação social recíproca: Cheirar. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. Os dados foram expressos em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

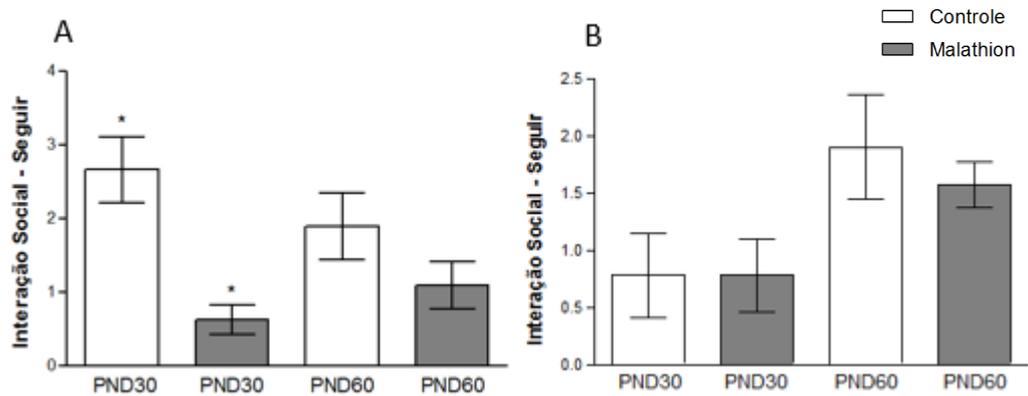


Figura 105 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Seguir. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. Os dados foram expressos em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

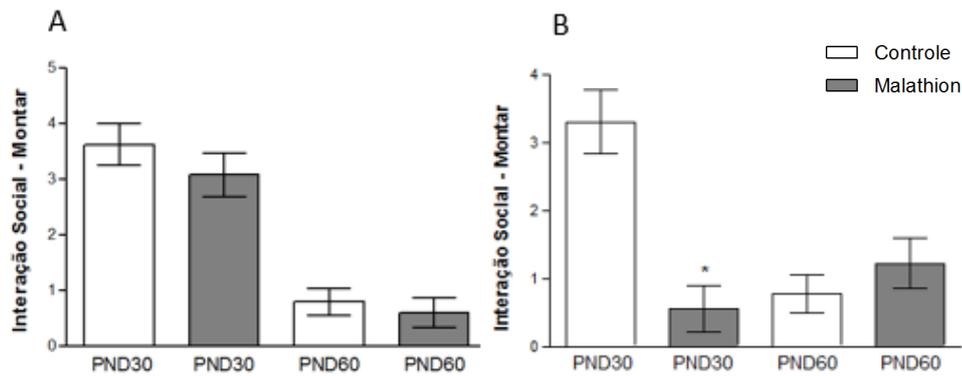


Figura 116 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Montar. Os dados foram expressos em média \pm SD. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

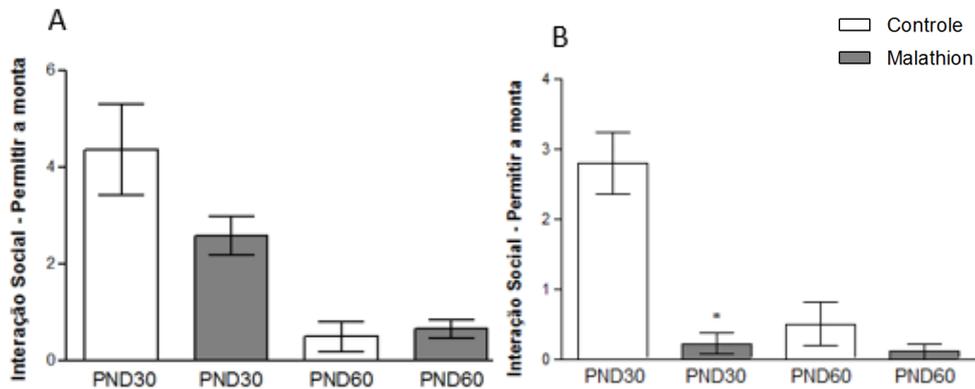


Figura 127 – Frequência dos parâmetros de interação social recíproca: Permitir a monta. Dados foram expressos em média \pm SD. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

4.2.3 Memória de reconhecimento social:

A perda de memória de reconhecimento social é uma das anormalidades funcionais do SN associada a exposição precoce de OF¹⁵⁵. A memória de reconhecimento é extremamente importante para a sobrevivência dos animais, pois se refere à capacidade que eles têm de identificar e distinguir entre odores e faces, seres familiares e não familiares¹⁵⁵.

Considerando que o reconhecimento de um indivíduo é construído e mantido a partir das interações sociais e, sendo este comportamento deficiente em indivíduos com TEA¹⁰¹, o teste de memória de reconhecimento social foi selecionado.

Os resultados do teste de memória de reconhecimento social demonstraram que os animais do grupo malathion de ambos protocolos de exposição, em comparação com os seus respectivos controles, tenderam a explorar com mais frequência o intruso que havia sido previamente colocado na gaiola (Figura 18).

Estes resultados sugerem que os animais do grupo controle apresentaram um comportamento típico, tendendo a explorar menos vezes o intruso previamente apresentado. Com base aos resultados do grupo malathion, pode-se sugerir que houve prejuízo na memória social causado pela exposição pré-natal ao malathion.

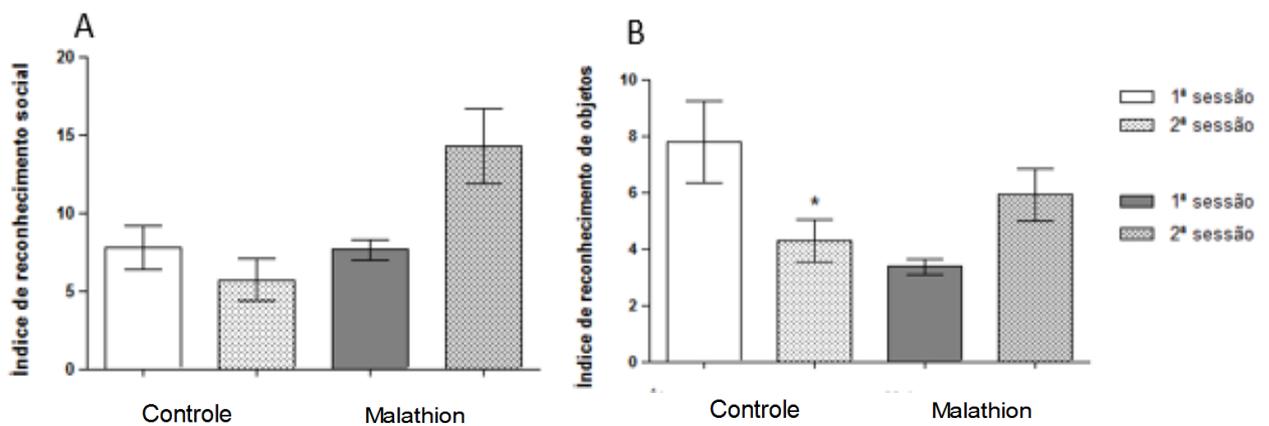


Figura 138 – Frequência dos parâmetros de memória de reconhecimento social. (A) pré-natal exposto (B) pós-natal exposto. Dados foram expressos em média \pm SD. * $p < 0,05$. Malathion vs controle. (ANOVA + post hoc Tuckey).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento do SNC ocorre tanto no período pré-natal quanto após o nascimento e requer um ambiente adequado¹. Fatores genéticos, bem como ambientais podem agir durante qualquer uma das fases do neurodesenvolvimento e capaz de comprometer o desenvolvimento normal e ameaçar o bem-estar futuro do indivíduo^{3,4}. Estudos epidemiológicos e experimentais apontam os agrotóxicos como um importante insulto ambiental capaz promover alteração sobre o desenvolvimento neurológico^{5,6,7}.

Agrotóxicos provenientes de compostos OFs são os mais utilizados no mundo^{7,8} e, conseqüentemente, responsáveis pelo maior índice de intoxicações e óbitos tanto em humanos quanto em animais, além de causar danos ao ambiente⁶³. As alterações no SNC provenientes de exposições a OFs podem ser diversas, incluindo, alterações comportamentais e sociais severas, danos na aprendizagem e na memória^{155,156}. A utilização de OF têm se tornado bastante frequente no Brasil, tanto no âmbito urbano quanto no rural¹⁶. O malathion é um dos compostos OFs mais utilizados e dentre as principais vias de exposição humana incluem a via oral através de ingestões de alimentos contaminados⁶².

A exposição a OF tem sido considerada fator de risco para várias doenças crônicas como o Alzheimer, TDAH e TEA^{21,22,23}. A condição fenotípica que compreende o TEA envolve uma série de comportamentos atípicos tais como: prejuízos qualitativos na interação social, associados a comportamentos repetitivos e interesses restritos²⁵. Este repertório comportamental específico de indivíduos autistas vem sendo associado a alterações neurobiológicas que ocorreram durante o período de desenvolvimento, possivelmente após exposição a neurotóxicos, como o OF²⁴.

Neste contexto, a luz do conhecimento sobre o amplo uso de compostos OFs no Brasil e considerando os efeitos tóxicos que ele pode causar na organogênese, especialmente para o desenvolvimento do SNC²³, buscou-se investigar os efeitos da exposição pré e pós-natal de OF malathion sobre o neurodesenvolvimento de ratos Wistar e a possível relação com o comportamento autista. Para tanto, avaliou-se os parâmetros de crescimento físico e de ontogênese

de reflexos de ratos expostos a OF durante fases iniciais de desenvolvimento, bem como parâmetros comportamentais de exploração, estereotipia e interação social.

Os resultados das análises dos parâmetros de crescimento físico demonstram que não houve diferenças no desenvolvimento físico dos animais expostos pré-natalmente ao malathion em comparação com o grupo controle. No peso corporal, quando comparado com o grupo controle, também não houve diferença significativa na evolução ponderal da prole de ratas expostas durante o período gestacional ao malathion. Entretanto, os resultados da ontogenia dos padrões de comportamento motor mostram que, em relação ao grupo controle, os animais do grupo malathion apresentaram retardo no amadurecimento das respostas sensorio motoras: recuperação em decúbito, aversão ao precipício, geotaxia negativa e reação de endireitamento.

Em consonância com estes resultados, Lazarini e colaboradores¹⁵⁷, relataram, através de um estudo pré-clínico, que a exposição gestacional a Diclorvós, um OF, não induziu diferenças no crescimento físico e no peso corporal de roedores. Da mesma forma, Johnson e colaboradores¹⁵⁸, ao avaliar o efeito da exposição pós-natal de dois compostos OF (CPF e metil parathion) não evidenciaram alterações somáticas na prole resultante a esta interferência. Sugerindo uma falta de efeitos da exposição precoce a OF sobre parâmetros de crescimento físico.

O comprometimento motor, manifestado pelo atraso das respostas reflexológicas evidenciado neste estudo, foi também evidenciado por Dam e colaboradores¹⁵⁹. Na oportunidade, os autores sugeriram que, além do comprometimento no amadurecimento dos reflexos, o dano ocasionado pela exposição a OF em fase precoce de desenvolvimento pode exercer uma seletividade nas respostas ontogenéticas, sendo maior incidência no atraso destas respostas em roedores machos¹⁵⁹.

O período fetal bem como infância são fases particularmente suscetíveis aos efeitos prejudiciais de compostos OFs, pois são momentos em que o SN desenvolve-se e adquire a base estrutural e funcional para o indivíduo adulto⁴⁹. O sistema colinérgico exerce grandes contribuições neste processo¹¹¹. Considerando que uma anormalidade nas respostas reflexológicas constitui um indicativo de interferência no neurodesenvolvimento¹²⁶, é possível sugerir que a exposição pré-natal a OF malathion pode ter desencadeado um comprometimento em inervações

colinérgicas em diferentes áreas cerebrais ocasionando alteração no desenvolvimento encefálico.

Segundo De Silva¹⁶⁰, os efeitos desta exposição podem ter comprometido eventos celulares neurais importantes tais como a cascatas de sinalização celular, diminuição no número de células neurais, na comunicação sináptica e proliferação da célula da glia. Este autor ressalta, ainda, que tais modificações além de trazer estas desordens neurocomportamentais, como aquelas observadas neste estudo, está envolvido na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos, como o TEA¹⁶⁰.

De uma perspectiva translacional, estes resultados estão de acordo com pesquisas clínicas que sugerem a participação de neurotóxicantes, como compostos OFs, na gênese de prejuízos no desenvolvimento neurocomportamental^{132,135}. Engel e colaboradores¹³⁴, em um estudo de coorte, descobriram evidências de que níveis pré-natais de metabólitos OF estão associados a anormalidades em reflexos primitivos, um marcador crítico de integridade neurológica¹³³.

Somando-se a isso, Young e colaboradores,¹³³ ao avaliar a relação entre exposição pré-natal a OF e o comportamento neurológico neonatal humano, evidenciaram que lactantes provenientes de mãe residentes de regiões agrícolas exibiam prejuízos em parâmetros reflexológicos e que isto estava inversamente associado com alterações no crescimento físico das pessoas. Considerou-se, então, uma associação significativa entre a exposição precoce a OF e alteração no desenvolvimento neurocomportamental humano¹³³.

A exposição a OF alveja o sistema colinérgico pela inibição da AChE⁹. O neurotransmissor ACh e seus receptores estão presentes no organismo desde fases precoces de desenvolvimento e não estão necessariamente ligados à sua função na sinalização sináptica⁷⁰. Este neurotransmissor fornece sinais neurotróficos participando de eventos celulares importantes para o desenvolvimento estrutural e funcional do SN.

Baseado nisso, pode-se inferir que as alterações neurocomportamentais observadas neste estudo possam estar relacionadas a déficits nas funções celulares, particularmente em regiões ricas de projeções colinérgicas no neurodesenvolvimento⁶⁹. Evidentemente, mudanças no desenvolvimento de padrões estruturais influenciados pelo sistema colinérgico, podem ser compatíveis com mudanças na velocidade do desenvolvimento e nas funções sensório motora⁷⁰.

A exposição a OF também tem como alvo outros sistemas neurais e neuroendócrinos, incluindo aqueles envolvidos na fisiopatologia de diversos transtornos de neurodesenvolvimento, como TDAH, esquizofrenia e TEA⁴⁸. Estes transtornos compartilham alguns aspectos em comuns, dentre eles, a ausência de anormalidades físicas⁴⁸.

O TEA é uma doença crônica e refere-se a um transtorno que afeta a maneira como as pessoas se comunicam, se comportam ou interagem com os outros⁸³. Indivíduos com TEA apresentam um crescimento normal ao longo dos primeiros meses ou anos de suas vidas e, em seguida, começam a mostrar os sintomas⁸³. Baseando-se nestas manifestações comportamentais que o diagnóstico de TEA é alcançado⁸³.

Embora indivíduos com TEA apresentem aparência física normal, sabe-se que as anormalidades comportamentais observadas são resultantes de disfunção neurológica. Este funcionamento inadequado pode ser acompanhado por prejuízos na maturação das habilidades motoras^{158,159}. Assim, irregularidades sutis nos movimentos gerais dos bebês (deitar, sentar e caminhar) podem ser indicativos de distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos posteriores, além de servir como marcadores precoces para o diagnóstico de TEA¹⁶⁰.

Os danos causados por neurotóxicos, como OF, pode promover alterações em respostas reflexológicas distintas. A persistência de padrões motores imaturos resultantes a essa exposição são também observados em vários modelos animais validados com comportamento autista, tais como *Mecp2*¹⁶¹, camundongos *Reelin*¹⁶² e ratos submetidos a exposição gestacional ao ácido valpróico (VPA)¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Diante disso, sugere-se que a exposição pré-natal a OF malathion se constitui um insulto ambiental capaz de promover alterações neurológicas, manifestadas pelo retardo no desenvolvimento de reflexos¹⁶⁴, e ausência de alteração no crescimento físico da prole. Sugere-se ainda, que este comprometido pode estar relacionado a alterações em eventos celulares neurais importantes para estruturação e função normal do SNC¹⁶⁴. Em conjunto, a manifestação neurocomportamental observadas neste estudo podem estar associados a fisiopatologia do TEA¹⁶⁴.

A exposição crônica a OF durante o período pré e pós-natal está associada a distúrbios cognitivos, neurocomportamentais e prejuízos motores⁶. Essas condições podem manifestar-se a longo prazo sobre o cérebro e comportamento¹⁶⁵.

Devido a imaturidade dos mecanismos de defesa, gestantes e lactentes são criticamente vulneráveis aos efeitos do OF¹⁶⁶.

Frente ao exposto, buscou-se avaliar na prole o efeito da exposição pré e pós-natal do OF malathion sobre os parâmetros comportamentais de exploração e parâmetro de interação social recíproca no teste de campo aberto (PND30/PND60). Foi analisado a frequência de *grooming*, de *rearing* e número de *crossing*, bem como o comportamento de interação social recíproca da prole.

Os resultados da avaliação do parâmetro de *grooming* mostrou um aumento significativo no número deste parâmetro (PND30) no grupo malathion quando comparado com o grupo controle, bem como uma tendência ao aumento da frequência deste parâmetro no PND60. Resultados semelhantes foram observados na prole exposta a malathion durante o período de aleitamento.

Ricceri e colaboradores¹⁶⁷ demonstraram da mesma forma que, após exposição pré e pós-natal, a dose subtóxica de OF (CPF), induziu estereotípias em camundongos no teste de habituação ao campo aberto. Dam e colaboradores também chegaram a essa conclusão e sugeriram que as alterações comportamentais nos animais resultantes, mimetizam às manifestações clínicas de doenças neurológicas, como o TEA¹⁵⁷.

Neste contexto, Quaak e colaboradores¹⁶⁸, evidenciaram que a exposição gestacional a OF pode, além do sistema colinérgico, alterar os sistemas GABAérgico, dopaminérgico e serotoninérgico, sistemas importantes para o desenvolvimento neurológico normal. Os autores afirmaram ainda que alterações nestes sistemas podem estar contribuindo para o aparecimento das manifestações clínicas características do TEA¹⁶⁸. Shelton *et al.*⁷, em um estudo clínico, já haviam relatado esta associação ao verificar maior risco de desenvolvimento das manifestações clínicas do TEA em filhos de mães em que durante gestação viveram em áreas rurais onde havia aplicação frequente de agrotóxicos, principalmente proveniente de composto OF.

Em face a estas alterações, Stiles¹ nos mostra que a vulnerabilidade do SNC inicia no período pré-natal e continua mesmo após o nascimento e se estende durante meses ao longo do aleitamento. Diante disso, a susceptibilidade dos lactentes e crianças à exposição a OF é bastante reconhecida. Battu e colaboradores¹⁶⁹ mostram que muitos agrotóxicos, como o OF, podem ser excretados através do leite materno. Sanghi e colaboradores¹⁶, por exemplo,

identificaram a presença de OF, incluindo malathion, no leite humano, mostrando a relevância em termos de preocupação com a saúde humana.

O comportamento *grooming* é frequentemente exibido por roedores¹⁵². Uma anormalidade nesta resposta comportamental geralmente está associada a incoerências no neurodesenvolvimento^{152,153,154}. Este parâmetro mimetiza comportamentos estereotipados manifestado por pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos, como a esquizofrenia e o TEA^{153,154}.

De acordo com o DSM-V, o TEA é diagnosticado com base disfunção em domínios principais de sintomas, entre eles, o comportamento estereotipado. Esta manifestação refere-se a comportamentos motores ou verbais repetitivos, ou comportamentos sensoriais anormais^{153,154}.

O comportamento estereotipado no TEA tem sido associado a disfunções em áreas corticais, especialmente no lobo frontal do cérebro. Estas regiões encefálicas apresentam inervações colinérgicas e exercem funções importantes relacionadas a habilidade de planejar, raciocinar e organizar ações específicas¹⁷⁰.

Tendo em vista a contribuição do sistema colinérgico sobre o desenvolvimento do SNC, incluindo a participação de seus receptores, a base biológica que explica o comportamento estereotipado observado neste estudo, refere-se à alteração no desenvolvimento do SNC, especialmente no lobo frontal, e a desregulação nos receptores muscarínicos devido a sua função estar intimamente relacionada ao comportamento motor, diferente dos receptores nicotínicos¹⁷⁰.

Os resultados das análises dos parâmetros exploratórios demonstraram que em ambos os protocolos de exposição (pré e pós-natal), no PND30, não houve um aumento significativo no número de *crossing* no grupo malathion comparado com o grupo controle. Esta diferença tornou-se significativa no PND60 em que animais expostos pré-natalmente a malathion exibiram maior número de *crossing* em comparação com o grupo controle.

A ausência da frequência de *rearing* foi observada em ambos os grupos (malathion e controle), assim como nos diferentes protocolos de exposição (pré e pós-natal) no PND30. Entretanto, no PND60 o grupo malathion pré-natal apresentou um aumento significativo no episódio de *rearing* em comparação com o grupo controle. Estes resultados, segundo Rice e Barone¹⁶⁴, devem-se ao fato de que muitos insultos ambientais, como exposição a OF, são capazes de afetar o

desenvolvimento do SN cujo consequência pode manifestar-se mais tarde ao longo da vida do indivíduo.

Assim, considerando que o protocolo de exposição deste estudo abrangeu o desenvolvimento da área motora em roedores, isto é, correspondente a região posterior do encéfalo da prole (tronco encefálico, cerebelo, medula espinal)⁶⁷, seguida pela estrutura anterior como neocórtex e hipocampo⁶⁷, é possível sugerir que a inibição da AChE interrompeu a homeostasia colinérgica afetando os processos de desenvolvimento destas áreas cerebrais envolvidas no comportamento de *rearing*.

Dentre essas áreas, o hipocampo, além de estar envolvido na geração do comportamento *rearing*, processando principalmente informações espaciais e contextuais¹⁶⁴ é uma estrutura encefálica reconhecida por conter inúmeros receptores colinérgicos¹¹². Ainda, estudo utilizando ressonância magnética indicam que alterações nesta estrutura encefálica está relacionada com a fisiopatologia TEA¹⁷¹.

A prole resultante a exposição pós-natal não apresentou diferença significativa neste parâmetro, apesar de exibir uma tendência maior na frequência de *rearing*. De modo geral, os aumentos observados tanto na frequência de *crossing*, quando de *rearing*, demonstram que a exposição pré-natal ao malathion foi capaz de causar um comportamento hiperativo nos animais.

Em acordo com estes resultados, DAM e colaboradores¹⁵⁹ relataram através de um estudo experimental que a exposição pós-natal a um OF também foi capaz de causar um comportamento mais hiperativo nos animais quando avaliados utilizando o teste de habituação ao campo aberto. Esta hiperatividade foi evidenciada através do aumento no número de *rearing*, e uma tendência ao aumento do parâmetro de *crossings* no grupo OF em comparação com as proles do grupo controle.

Além disso, um estudo desenvolvido por Ricceri e colaboradores¹⁶⁷, utilizando um protocolo de exposição a CPF, mostrou que houve um aumento significativo do número de *crossing* dos animais expostos quando comparados com os animais dos grupos controle. Os autores concluem que a exposição ao composto OF induz efeitos a longo prazo sobre o cérebro e o comportamento e que este composto é capaz de causar um comportamento hiperativo nos animais. Com efeito, a hiperatividade é reconhecida como uma das manifestações clínicas presente em indivíduos com TEA⁸⁰, assim como também característica comum em paciente com

TDAH. Ambos os transtornos afetam o comportamento, o aprendizado e a socialização.

O TDAH é definido como uma doença neurobiológica caracterizada por comportamentos hiperativos e impulsivos e por déficits de atenção¹⁷⁰. Este transtorno exibe condições semelhantes ao autismo compreendendo o fenótipo mais amplo do TEA¹⁰¹. Estudos tem demonstrado que este transtorno se faz presente como comorbidades em mais de 70% de pacientes com TEA manifestando-se em graus variados de severidade^{172,173}. O comportamento anormal observado em indivíduos com TDAH e TEA são em partes associados a danos no lobo frontal e pela desregulação dos sistemas de neurotransmissão colinérgica^{172,173}.

Com relação a hiperatividade observada neste estudo, Qiao et al.¹⁷⁴, explicaram que a exposição pré-natal a OF interfere no desenvolvimento da função sináptica colinérgica e conseqüentemente refletindo no comportamento dos animais. E que a exposição pós-natal, pode interferir o desenvolvimento de percursos colinérgicos no cérebro, além de interferir a modulação da excitação e inibição^{174,175}.

O sistema colinérgico é composto pelos seus receptores nicotínicos e muscarínicos e pelo aparato enzimático, como a AChE que é responsável por hidrolisar a ACh¹⁷⁶. A ACh é um neurotransmissor importante do SNC e está intimamente relacionada a processos cognitivos e emocionais¹¹².

Os receptores nicotínicos estão associados com a mediação de transmissões excitatórias rápidas, com a regulação da liberação de glutamato, dopamina e serotonina e com processos de aprendizagem, desenvolvimento neurológico e memória¹⁷⁶. Os receptores muscarínicos atuam em regiões encefálicas correspondentes ao sistema límbico como o hipocampo e amígdalas, e possuem funções neurológicas associadas as respostas emocionais, cognitivas e à modulação do estresse¹⁷⁶.

Sendo assim, com base nas alterações comportamentais relacionadas aos parâmetros exploratórios e os achados que suportam a hipótese de que o OF representa um fator de risco para aumento da vulnerabilidade a distúrbios do neurodesenvolvimento em seres humanos como TDHA e TEA, é possível sugerir que a exposição pré-natal e pós-natal ao malathion foi capaz de causar alterações no comportamento exploratório dos animais e que estas alterações mimetizam a

sintomatologia de indivíduos que apresentam clinicamente diagnosticado com TEA^{170,172}.

O TEA é caracterizado por déficits persistentes na comunicação social e na interação, bem como por comportamentos restritos e repetitivos¹⁰¹. Deficiência na interação social, por sua vez, é um dos sintomas mais relevantes do TEA¹⁰¹. Considerando que fatores ambientais são agentes etiológicos potenciais dessa doença, estudos pré-clínicos e clínicos têm associado a participação destas interferências em alterações biológicas que causam prejuízos comportamentais e sociais severos^{7,175}.

Os dados da avaliação dos parâmetros de interação social recíproca mostraram uma diminuição significativa do parâmetro de cheirar e seguir do grupo exposto pré-natalmente a malathion e seu respectivo controle. Foi possível observar também que, a prole exposta durante o período de aleitamento apresentou menor frequência no número de montas e permitir a montas em relação à prole do grupo controle. Cabe ressaltar ainda que os outros parâmetros analisados durante a interação social recíproca, embora sem diferença significativa na comparação com o grupo controle, mostraram uma tendência a diminuição no comportamento social.

Apoiando estes dados, Venerosi e colaboradores¹⁷⁷, em seu estudo mostraram que a exposição pré e pós-natal à OF alterou negativamente o comportamento social de roedores através da diminuição da atividade social. Laugeray *et al*¹⁷⁸ em um estudo mais recente também chegaram a conclusões semelhantes. Após avaliarem ratos expostos pré-natalmente a um composto OF indicaram que esta exposição foi capaz de causar danos na comunicação entre os animais e no comportamento social. Ambas características são semelhantes as manifestações clínicas de pacientes diagnosticados com TEA¹⁷⁸.

Em consonância com resultados de estudos experimentais, Furlong e colaboradores¹⁷⁹ em um estudo de coorte prospectivo na cidade de Nova York associaram a exposição pré-natal a OF com déficits no funcionamento social entre meninos. Bruckner¹⁸⁰, por sua vez, explica que esta anormalidade na interação social pode ser resultante a exposição tóxica também no período pós-natal, pois os mecanismos de defesa tanto fetal quanto a lactentes são imaturos e o corpo materno acumula muita gordura, veículo esse que facilita a intoxicação e consequente transferência.

Desta forma, os resultados dos parâmetros de interação social permitem sugerir que a exposição gestacional e durante a lactação ao malathion pode ter causado alteração no desenvolvimento e na função dos receptores colinérgicos, principalmente os receptores muscarínicos. E em decorrência desta interferência ter causado prejuízos no desenvolvimento neurológico em áreas encefálicas onde estes receptores atuaram (hipocampo e amígdalas), áreas reconhecidas como responsáveis pelo comportamento social e pelos processos cognitivos¹⁷⁰.

Além dos déficits comportamentais e sociais, compostos OF podem causar prejuízos em processos de aprendizagem e memória^{5,6}. Pessoas com TEA exibem estes déficits cognitivos, além de prejuízos no comportamento social^{5,6}. Diante disto, buscou-se avaliar a memória social dos animais através do teste reconhecimento social.

Os resultados da análise dos parâmetros cognitivos evidenciaram que os animais expostos ao malathion tanto no período pré-natal quanto pós-natal apresentaram uma tendência não significativa a explorarem o intruso já conhecido em comparação com seus respectivos controles. Pode-se sugerir, assim, que a exposição ao malathion foi capaz de gerar um prejuízo cognitivo apesar de não significativo, caracterizado pelo tempo dispendido na exploração do intruso anteriormente exposto.

De Felice²³, em um estudo pré-clínico, chegou a conclusões semelhantes. Em seu trabalho o autor avaliou os efeitos da exposição a um OF durante período gestacional sobre a discriminação social em roedores adultos de ambos os sexos. Os resultados deste estudo demonstraram que a exposição durante período crítico de desenvolvimento foi capaz de prejudicar os processos cognitivos de machos e fêmeas relacionados a memória de comportamento sociais²³. Complementando estes autores, além da exposição pré-natal, Venerosi e colaboradores¹⁸¹, avaliaram os efeitos comportamentais da exposição pré e pós-natal (lactação) a OF (CPF) em doses subtóxicas. Os dados encontrados indicaram que a exposição ao OF afeta a memória de reconhecimento social do rato e interfere com o desenvolvimento de vias neuroendócrinas¹⁸¹.

Do mesmo modo, Scattoni e colaboradores¹³⁶ em um estudo experimental também avaliaram os efeitos comportamentais da exposição pré e pós-natal a OF. No estudo, esses autores demonstraram, por meio da análise das vocalizações de ultrassom (USVs) emitidas por fêmeas, prejuízos no reconhecimento social em

detrimento da exposição precoce a OF. Dahlgren et al.¹⁸⁴, em um estudo clínico, mostraram que os membros de uma família expostos acidentalmente ao OF diazinon apresentaram perda de memória, diminuição da concentração e dificuldade de aprendizagem. Ao mesmo tempo, dois estudos de coorte encontraram uma forte associação entre déficits na memória de trabalho e a exposição precoce a OF em crianças de 7 anos de idade¹⁸⁴. De forma semelhante, um estudo realizado com trabalhadores que possuíam histórico de exposição a OF relatou déficits de atenção e comprometimento da memória anos após a exposição¹⁸⁵.

Além dos prejuízos cognitivos caracterizado por prejuízos na memória social, o quadro clínico resultante a exposição precoce a OF, compõe o fenótipo de diversas alterações no desenvolvimento neurológico, como o TEA¹⁸⁴. Embora indivíduos com TEA geralmente são descritos como tendo pontos fortes na memória de rotina ou memória de curto prazo e habilidades de memória associativa, isto não representa um bom desempenho, visto que outros aspectos se apresentam prejudicados como o aprendizado, função adaptativa e reconhecimento de faces¹⁸⁴.

Somando-se a isto, evidências pré-clínicas e clínicas suportam a hipótese de que o OF durante o desenvolvimento pode comprometer o comportamento social, além de representar um fator de risco para aumentar a vulnerabilidade a distúrbios do neurodesenvolvimento em seres humanos, como o TEA^{186,187}. O comportamento social é a base para a formação de grupos sociais. Neste processo, o reconhecimento social é fundamental¹⁸⁷. Em roedores, aspectos da sociabilidade como: a formação de pares, reconhecimento familiar, gestação seletiva e dominância hierárquica dependem da capacidade de memorização social de cada indivíduo¹⁸⁷. E no contexto translacional, as interações sociais são importantes para o desenvolvimento cognitivo das pessoas.

Sendo assim, os resultados da análise dos parâmetros cognitivos indicam que a exposição ao malathion foi capaz de afetar a formação e manutenção de memórias sociais¹⁷⁰. Este prejuízo provavelmente está relacionado com a desregulação colinérgica causada pelos OF, principalmente dos receptores nicotínicos, visto que estes estão relacionados com a formação de memórias e com o aprendizado¹⁷⁰.

Em conclusão, as alterações comportamentais e cognitivas encontradas neste estudo sugerem que a exposição pré e pós-natal ao malathion foi capaz de promover danos no desenvolvimento neurológico, sem comprometimento no

crescimento físico dos animais. Este dano pode estar relacionado a desregulação do sistema colinérgico, em receptores muscarínicos e nicotínicos. E que, além disso, as anormalidades comportamentais observadas, como hiperatividade, comportamento estereotipado e prejuízos no comportamento social são semelhantes aquelas que integram as manifestações clínicas de indivíduos com TEA.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo, conclui-se que a exposição pré e pós-natal ao malathion foi capaz de alterar o desenvolvimento neurológico da prole refletindo em um fenótipo comportamental semelhante aqueles observados em pacientes com TEA. As observações incluem:

- Ausência de alteração em parâmetro de crescimento físico;
- Aumento da frequência de *crossing*, *rearing* e *grooming* no teste de habituação ao campo aberto;
- Prejuízos nos parâmetros interação social recíproca como: cheirar, montar, permitir a monta e seguir;
- Prejuízo na memória de reconhecimento social

Os resultados destes estudos trazem um alerta social sobre a utilização de compostos OFs, especialmente do malathion e de seus efeitos sobre o neurodesenvolvimento, além de sua contribuição como insulto ambiental envolvido na fisiopatologia do TEA.

São necessários, porém, mais estudos utilizando protocolos distintos de exposição que envolvam outros períodos de desenvolvimento, bem como outras vias de exposição para confirmar a relação com a etiologia dessa doença que acomete o neurodesenvolvimento.

ANEXO

ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comissão de Ética no uso de animais do projeto intitulado “Efeitos da exposição pré e pós-natal de malathion sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista”.



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Palhoça, 13 de dezembro de 2016

CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada “Efeitos da exposição pré e pós-natal de malathion sobre o neurodesenvolvimento: possível associação causal com o comportamento autista.”, registrada com o no 16.036.2.10.IV, sob a responsabilidade de Jucélia Jeremias Fortunato - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 13 de dezembro de 2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro de 2016 a março de 2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus birvegicus</i> , ratos Wistar
No de animais	114
Peso/Idade	250 a 300g – 60 dias 10 a 20g neonatos
Sexo	ambos
Origem	Biotério da Universidade do Vale do Itajaí



Prof. Sandro Melim Sgrott
Coordenador da Comissão

REFERÊNCIAS

1. Stiles J, Terry LJ. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(4):327–348.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Dsm-5)*: Washington, DC; 2013. p.9-50.
3. DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial–cell specification *Nature.* 2010 11;468:214–222.
4. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Progress in Neurobiology.* 2009;88(1):41–63.
5. Morton MC, Feliciano DM. Neurovesicles in Brain Development. *Cellular and Molecular.* 2016;36;409–416.
6. Charron F, Tessier-Lavigne M. Novel brain wiring functions for classical morphogens: a role as graded positional cues in axon guidance. *Development.* 2005;132(10);2251-62.
7. Shelton JF , Geraghty EM , Tancredi DJ , Delwiche LD , Schmidt RJ , Ritz B, et ai. Neurodevelopmental disorders and pre-natal residential proximity to agricultural pesticides: The CHARGE Study. *Environ Health Perspect.* 2014;122(10):1103-09.
8. Meyer-Baron M, Knapp G, Schäper M, van Thriel C. Meta-analysis on occupational exposure to pesticides – Neurobehavioral impact and dose–response relationships. *Environmental Research.* 2015; 136:234-245
9. DuBois KP. The toxicity of organophosphorus compounds to mammals. *Bull World Health Organ.* 1971;44(1):233-240.
10. Saunders M, Magnanti BL, Correia Carreira S, et al. Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environmental Health.* 2012;1:511.
11. Slotkin TA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of organophosphates targets cell cycle and apoptosis, revealed by transcriptional profiles in vivo and in vitro. *Neurotoxicol Teratol.* 2012;34:232–41.
12. González-Alzaga B, Lacasaña M, Aguilar-Garduño C, Rodríguez-Barranco M, Ballester F, Rebagliato M. A systematic review of neurodevelopmental effects of prenatal and postnatal organophosphate pesticide exposure. *Toxicology Letters.* 2014;230;2 15:104-121.
13. Colborn T. A case for revisiting the safety of pesticides: a closer look at neurodevelopment. *Environ. Health Perspect.* 2006;114(1):10–17.

14. Tchounwou PB, Patlolla AK, Yedjou CG, Moore PD. Environmental Exposure and Health Effects Associated with Malathion Toxicity. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. 2015; 51:2145-9.
15. Kesavaraju B, Alto B, Afify A, Gaugler R. Malathion Influences Competition Between *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus*. *J Med Entomol*. 2010;47(6): 1011-1018.
16. Cavalcanti LPAN, Aguiar AP, Lima JA, Lima ALS. Intoxicação por Organofosforados: Tratamento e Metodologias Analíticas Empregadas na Avaliação da Reativação e Inibição da Acetilcolinesterase. *Revista Virtual de Química*. 2016;8:739-766.
17. Centro de Informações Toxicológicas (CIT/SC). CIT aponta agrotóxico como principal causa de morte por intoxicação em SC. Universidade do Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2012.
18. CIT/SC – Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina (CIT/SC) – Departamento de Estatística, 2005.
19. Shelton JF, Hertz-Picciotto I, Pessah IN. Tipping the balance of autism risk: potential mechanisms linking pesticides and autism. *Environ Health Perspect*. 2012;120(7):944-51.
20. Salama M, Lotfy A, Fathy K, Makar M, El-Emam M, El-Gamal A, et al. Neurotoxic effects on the development of Malathion in the neurosphere 3D system. *Applied & Translational Genomics*. 2015;7;12:13-18.
21. Ayhan Y, Farland RMC, Pletnikov MV. Animal models of gene–environment interaction in schizophrenia: A dimensional perspective. *Progress in Neurobiology*. 2016;136:1–27.
22. Levin E, Hall B, Cauley M. Neurotoxic effects on attention deficit and hyperactivity in rodent models. *Neurotoxicology and Teratology*. 2015;49:116.
23. De Felice A, Venerosi A, Ricceri L, Sabbioni M, Scattoni ML, Chiarotti F, Calamandrea G. Sex-dimorphic effects of gestational exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on social investigation in mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 2014;46:32–39.
24. Schaafsma SM, Pfaff DW. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):255-71.
25. Barbaro J, Dissanayake C. Autism Spectrum Disorders in infancy and toddlerhood: A review of the evidence on early signs, early identification tool, and early diagnosis. *J Dev Behav Pediatr*. 2009;30(5):447-59.
26. de Lahunta A, Glass EN, Kent M. Embryonic Development of the Central Nervous System, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2016 3;46(2): 193-216,

27. Franco SJ, Muller U. Shaping our minds: stem and progenitor cell diversity in the mammalian neocortex. *Neuron*. 2013;77:19–34.
28. de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M. Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? *Early Human Development*. 2006;82:257–266.
29. Pereira JA, Lebrun FJ, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends in Neurosciences*. 2012;35:123–134.
30. Xiangning J, Jeannette N. Cellular and molecular introduction to brain development *Neurobiology of Disease*. 2016;92:3-17.
31. Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*. 2011;333:1456–1458.
32. Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, et al. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:16480–85.
33. Dzwilewski Kelsey LC, Schantz Susan L. Prenatal chemical exposures and child language development Review. *Journal of Communication Disorders*. 2015;57;41–65.
34. Tannahill D, Harris LW, Keynes R. Role of morphogens in brain growth. *J. Neurobiol*. 2005;09;64(4):367–375.
35. Wong CT, Wais J, Crawford DA. Prenatal exposure to common environmental factors affects brain lipids and increases risk of developing autism spectrum disorders. *Eur J Neurosci*. 2015(42);2742–60.
36. Fox E, Amaral D, Van de Water J. Maternal and fetal antibrain antibodies in development and disease. *Dev Neurobiol*. 2012;72:1327-34.
37. Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive toxicology*. 2015;09:155 – 69.
38. Mychasiuk R, Harker A, Ilnytsky S, Gibb R. Paternal stress prior to conception alters DNA methylation and behaviour of developing rat offspring. *Neuroscience*. 2013;241:100–105.
39. Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2003;27:3-18.
40. Johnson-Restrepo B, Kannan K, Rapaport DP, Rodan BD. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from New York. *Environ. Sci. Technol*. 2005;39:5177–82.

41. Calderon-Garciduenas L, Kulesza RJ, Doty RL, D'Angiulli A, Torres-Jardon R. Megacities air pollution problems: Mexico City Metropolitan Area critical issues on the central nervous system pediatric impact. *Environ. Res.* 2014;137:157–169.
42. Ashwood P, Van de Water J. A review of autism and the immune response. *Clin. Dev. Immunol.* 2004;11:165–174.
43. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, Van Oosten M, de Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD, et al. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J. Neuroimmunol.* 1996;64:37–43.
44. de Vries HE, Kuiper J, de Boer AG, Van Berkel TJ, Breimer DD. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 1997;49:143–55.
45. Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev.* 2010;(1):56-79.
46. Fiedler N, Rohitrattana J, Siritwong W, Suttiwan P, Ohman Strickland P, Ryan PB, et al. Neurobehavioral effects of exposure to organophosphates and pyrethroid pesticides among Thai children. *Neurotoxicology.* 2015;(48):90–9.
47. Gomes PT, Lima LH, Bueno MK, Araújo LA, Souza NM. Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. *J Pediatr.* 2015;23(91):111–21.
48. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *The lancet neurology.* 2014;13:330–338.
49. London L, Beseler CF, Bouchard MC, Bellinger DC, Colosio C, et al. Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *NeuroToxicology.* 2012;3:887–896.
50. Naseha M, Vatanparasta J, Baniasadia M, Hamidib GA. Alterations in nitric oxide synthase-expressing neurons in the forebrain regions of rats after developmental exposure to organophosphates. *Neurotoxicology and Teratology.* 2013;37;23–32.
51. Giri S, Prasad SB, Giri A, Sharma GD. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2001;514:223-31.
52. Li D, Huang Q, Lu M, Zhang L, Yang Z, Zong M, Tao L. The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere.* 2015;135:387–393.
53. Rocha LCS, Spinosa HS. Praguicidas organofosforados e carbamatos: algumas considerações. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.* 1992;16:41-44.

54. Benedico EC. Insecticidas organofosforados: de la guerra química al riesgo laboral y doméstico. *Medifam*. 2002;12:333-340.
55. Costa, LG. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*. 2006;366(1-2):1-13.
56. Repetto GR, Martinez D, Repetto M. Malathion and dichlorvos after the oral administration so malathion and trichorfon. *Veterinary and Human Toxicology*. 1995;37:306-309.
57. Associação nacional de defesa vegetal (ANDEF) Tecnologia em primeiro lugar: o Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. *Revista Defesa Vegetal*. Maio de 2009.
58. Rigotto RM, Vasconcelos PD, Rocha MM. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 2014;30(7):1-3.
59. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil). Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012. Brasília, DF, 2012.
60. Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.
61. Wang LM, Ye WH, Zhou SS, Lin KD, Zhao MR, Liu WP. Acute and chronic toxicity of organophosphate monocrotophos to *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Science and Health*. 2009;44:38- 43.
62. Roberts DM, Aaron CK. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *BMJ*. 2007;03;334(7594):629-34.
63. Sánchez-Santeda F, Colomina MT, Herrero Hernández E. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*. 2016;74:417–426.
64. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for malathion. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2003.
65. WHO – World Organization of Health. Toxicological Profile for Malathion. Agency for toxic substances and disease registry, 2003.
66. Buratti FM, Leoni C, Testai E. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol Lett*. 2006;67:245- 55.
67. N’Go PK, Azzaoui FZ, Ahami AOT, Soro PR, Najimi M, Chigr F. Developmental effects of Malathion exposure on locomotor activity and anxiety-like behavior in Wistar rat. *Health*. 2013;5:603-611.

68. Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilho FC, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Malathion-induced Oxidative Stress in Rat Brain Regions. *Neurochemical Research*. 2006; 31;5:671-678.
69. Possamai FP, Fortunato JJ , Feier G , Agostinho FR , Quevedo J , Wilhelm Filho D , Dal-Pizzol F . Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;23(2):198-204.
70. Valvassori SS , Fortunato JJ , Gomes KM , Réus GZ , Martins MR , Gavioli CE , Schetinger MR , Dal-Pizzol F , Quevedo J . Acute and subacute exposure to malathion impairs aversive but not non-associative memory in rats. *Neurotox Res*. 2007 Jul;12(1):71-9.
71. Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Tsujii M, Futatsubashi M. Reduced Acetylcholinesterase Activity in the Fusiform Gyrus in Adults With Autism Spectrum Disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2011;68(3):306-313
72. Wing, L. The history of ideas on autism: legends, myths and reality. *Autism*. 1997; 1:13-23.
73. Goldberg K. Dossiê autismo: uma perspectiva histórica – evolutiva. 2005; 6:6
74. Kanner, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*. 1943;2:217-250.
75. H Asperger. "Psicopatia autista" na infância *Autismo e síndrome de Asperger*, Reino Unido: pp. 37-92 U Frith (Ed.); 1991.
76. Dawson G, Burner K. Intervenções comportamentais em crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo: revisão de achados recentes. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23:616-620.
77. LA Vismara, SJ Rogers. Behavioral Treatments in Autism Spectrum Disorder: What We Know? *Annu Rev Clin Psychol*. 2010;6:447-468.
78. Maglione MA, Gans D, Das L, Timbie J, Kasari C. Nonmedical Interventions for Children With ASD: Recommended Guidelines and Further Research Needs. *Pediatrics*. 2012;130:169-78
79. Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci*. 2012;14:281-292.
80. Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Cohen D, Bronsard G S, et al. Gene x environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front. Psychiatry*. 2014;5:53.
81. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th. ed.* Arlington, VA: American Psychiatric Publishing;2013

82. Pereira A, Pegoraro LF, Cendes F. Autism and epilepsy: models and mechanisms. *J. epilepsy clin. Neurophysiol.* 2012;18:92-96.
83. Schmidt C, Bosa C. A Investigação do Impacto do Autismo na Família: Revisão Crítica da Literatura e Proposta de Um Novo modelo. *Interação em Psicologia.* 2003;7;2:111-120.
84. Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autism and pervasive developmental disorders. *J Pediatr.* 2004;80:83-94.
85. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators [Internet]. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network 11 sites, United States, 2010 Morbidity and mortality weekly report *Surveill. Summ.* 63 (Suppl. 2) 2014.
86. Carvalho G, Avelar T. *Linguagem e Autismo: Fatos e Controvérsias.* S. Paulo: Editora Escuta. 2007.
87. Brentani H, Silvestre de PC, Bordini D, Rolim D, Sato F, Portolese J, et al. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2013;(35):62-72.
88. Centers for Disease Control and Prevention (United States), Department of Health and Human Services. Prevalence of Autism Spectrum Disorders — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2012.
89. Lai MC, Lombardo MV, Chakrabarti B, Baron-Cohen S. Subgrouping o autismo "espectro": reflexões sobre DSM-5. *PLoS Biol.* 2013;11:1001544.
90. Meng-Chuan L, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autismo. *The lancet.* 2014; 383: 896-910.
91. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2011;68;(11):1095-102.
92. Froehlich-Santinoa W, Londono Tobona A, Clevelanda S, Torresa A, Phillipsa J, Cohen B. Prenatal and perinatal risk factors in a twin study of autism spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research.* 2014;54:100–108.
93. Brown AS, Sourander A, Hinkka-Yli-Salomaki S, McKeague IW, Sundvall J, Surcel HM. Elevated maternal C-reactive protein and autism in a national birth cohort. *Mol Psychiatry.* 2014;19(2):259-64.
94. Hertz B, Rodier PM. Environmental exposures that increase the risk of autism spectrum disorders. DG Amaral, G Dawson, DH Geschwind (Eds.), *Autism spectrum disorders*, Oxford University Press, New York, NY. 2011:863–874.

95. Volk HE, Lurmann F, Penfold Picciotto I, McConnell R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry*. 2013;70:71–77.
96. Roberts EM, English PB, Grether JK, Windham GC, Somberg L, Wolff C. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environ Health Perspect*. 2007;115:1482–1489.
97. Christensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013;309:1696–1703.
98. Rai D, Lee BK, Dalman C, Golding J, Lewis G, Magnusson C. Parental depression, maternal antidepressant use during pregnancy, and risk of autism spectrum disorders: population based case-control study. 2013;346:2059.
99. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: A comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 2011;128:344–355.
100. Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2004;137:29-34.
101. Atladóttir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*. 2010;40(12):1423.
102. Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. *Rev Neurocienc*. 2012;20(1):117-27.
103. Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T, Matsuishi T. Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *J Autism Dev Disord*. 2003;33:455-9.
104. Dalton P, Deacon R, Blamire A, Pike M, McKinlay I, Stein J, et al. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. *Ann Neurol*. 2003;53:533-7.
105. Eskenazi B, Marks AR, Bradman A, Harley K, Barr DB, Johnson C, et al. Exposure to organophosphate pesticides and neuropsychomotor development in young Mexican American children. *Environ Saude Perspect*. 2007;115(5):792–798.
106. Roberts, et al. Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the Central Valley of California. *Environ Health Perspect*. 2007;115(10):1482-89.

107. Berger-Sweeney J. The effects of neonatal basal forebrain lesions on cognition: Towards understanding the developmental role of the cholinergic basal forebrain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998;16:603–612.
108. Carr RL, Chambers HW, Guarisco JA, Richardson JR, Tang J, Chambers JE. Effects of Repeated Oral Postnatal Exposure to Chlorpyrifos on Open-Field Behavior in Juvenile Rats. *Toxicological Sciences.* 2000; 59:260-267.
109. Penzola MJ, Pinaa L, Moreno C, González-Vioquea E, Zalsmanb G, Arangoa C. The neurobiology of autism spectrum disorders. *European Psychiatry.* 2014;29:11–19.
110. Dineley KT, Anshul AP, Yakel JL. Review Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2015; 36;2:96–108.
111. Pepeu G, Giovannini MG. Changes in extracellular levels of acetylcholine during cognitive processes. *Learn Mem.* 2004;11:21-27.
112. Ventura ALM, Abreu PA, Freitas RCC, Sathler PC, Loureiro N, Castro HC. Colinergeric system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. Ventura ALM, et al. / *Rev Psiq Clín.* 2010;37(2):66-72.
113. Golan Karvat; Tali Kimchi. Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(4):831–840.
114. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 2009;89(1):73-120.
115. Deutsch SI, Urbano MR, Neumann SA, Burket JA, anormalidades Katz E. colinérgicos no autismo. *Neurofarmacol Clínica.* 2010;33:114-120.
116. Kemper TL, Bauman M. neuropatologia do autismo infantil. *J Neuropathol Experimental Neurol.* 1998;57:645-652.
117. Friedman SD, Shaw DWW, Artru AA, Dawson G, Petropoulos H, Dager SR. Gray and White Matter Brain Chemistry in Young Children With Autism. *Arch Gen Psychiatry.* 2006;63(7):786-794.
118. Gu Q Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience.* 2002;111(4)815- 835.
119. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tschlis PN, Hay N: The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 1997,11:701-713.

120. Cui QL, Fogle E, Almazan G: Muscarinic acetylcholine receptors mediate oligodendrocyte progenitor survival through Src-like tyrosine kinases and PI3K/Akt pathways. *Neurochem Int.* 2006;48:383-393.
121. Song G, Ouyang G, Bao S: The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9:59-71.
122. Mukaetova-Ladinska EB, Westwood J, Perry EK. Cholinergic component of autism spectrum disorder. *The Neurochemical Basis of Autism.* 2010;129–161.
123. Deiró TCB, Carvalho J, Nascimento E, Medeiros JMB, Cajuhi F, Ferraz-Pereira KN et. al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2008;66(3b):736-740.
124. Khalki H, Khalki L, Aboufatima R, Ouachrif A, Mountassir M, Benharref A, Chait A. Prenatal exposure to tobacco extract containing nicotinic alkaloids produces morphological and behavioral changes in newborn rats, *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2012;101;(3):342-47.
125. Zehr E, Stein R. What functions do reflexes serve during human locomotion *Progress in Neurobiology.* 1998;58:185–205.
126. Swerdlow N, Mark A. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin.* 1998;24(2): 285–301.
127. Allam, A. Effect of acrylamide on the development of nervous system in albino rat. PhD Thesis. Faculty of Science, Beni-Suef University, Egypt. 2008.
128. Tem V, Bradley-Moore M, Gingrich J, Stark R, Pinsky D. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behavioural Brain Research.* 2003;145:209–219.
129. Dykens EM. Family adjustment and interventions in neurodevelopmental disorders. *Current opinion in psychiatry.* 2015;28:121-126.
130. Lee I, Eriksson P, Fredriksson A, Buratovic S, Viberg H. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2015;288;(3): 429-438.
131. Chanda SM, o Papa CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996;04;53(4):771-6.
132. S Chen Y. Organophosphate-induced brain damage: Mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *NeuroToxicology.* 2012;33:391–400.

133. Young JG, Eskenazi B, Gladstone EA, Bradman A, Pedersen L, Johnson C, Barr DB, Furlong CE, Holland NT. Association between in útero organophosphate pesticide exposure and abnormal reflexes in neonates. *Neurotoxicology*. 2005;26:199–209.
134. Engel SM, Berkowitz GS, Barr DB, Teitelbaum SL, Siskind J, Meisel SJ, Wetmur JG, Wolff MS. Prenatal organophosphate metabolite and organochlorine levels and performance on the Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic pregnancy cohort. *Am J Epidemiol*. 2007;165:1397–404.
135. Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, Whitehead R, Tang D, et ai. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*. 2006;118:1845–59.
136. Venerosi A, Ricceri L, Scattoni ML, Calamandrei G. Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in cd-1 mouse pups. *Environmental Health*. 2009;8:12.
137. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4):609-1.
138. Leite LG, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Piacent A, Aragão M, Schons SV. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por Ateleia glazioviana. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2002;22(2):73-8.
139. Meguid NA, Dardir AA, Abdel-Raouf ER, Hashish A. Evaluation of oxidative stress in autism: defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143(1):58-65.
140. Ackera CI, Guerra Souza AC, Pinton S, Trevisan da Rocha J, Amaral Friggi C, Zanella R, Wayne Nogueira C. Repeated malathion exposure induces behavioral impairment and AChE activity inhibition in brains of rat pups. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011;74;8;2310–2315.
141. Programa Internacional de Segurança Química (IPCS). A OMS classificação de pesticidas por risco e diretrizes de classificação de 1996-1997. Organisation mondiale de la Santé, Genève, OMS / PCS / 96,3.
142. Bossi R, Vinggaard AM, Taxvig C, Boberg J, Bonefeld-Jorgensen EC. Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;4;10(6):2271-81
143. do Carmo JC, Peter VM, Guerra MO. Cronologia do desenvolvimento embrionário e fetal de ratos, conforme a datação do início da prenhez. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*. 2004;23:5-16.

144. Bowls BJ, Freeman JM, James JA, Meggs WJ. Oral Treatment of Organophosphate Poisoning in Mice. *Acad Emerg Med.* 2003;10:3.
145. Preve da Silva A, Meotti, CF, Santos, RSA, Farina M. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. *NeuroToxicology.* 2006; 27;(6):1101– 05.
146. Slimen S, El-Fazaa S, Gharbi N. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2012;34:753–760.
147. Ahmed A. Allam, Rasha E. Abo-Eleneen. The development of sensorimotor reflexes in albino mice; albino rats and black-hooded rats. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2012;30;(7);11:545-53.
148. Bernardi MM. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces sexually dimorphic sickness behavior in adult rats. *Psychology & Neuroscience.* 2014; 7;2:113.
149. Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyens E, D'Andrea L, et al. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem.* 2015. pii: S1074-7427(15)00134-3.
150. Batisti A, Cantini R, Feci E. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus semprevirens L.* *Seed Sci Technol.* 2000;28:729-38.
151. Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF, Lemoal M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology.* 1987;91:363–368.
152. Prediger RDS, Takahashi RN. Ethanol improves shortterm social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. *European Journal of Pharmacology.* 2003;462:115– 23.
153. Kirsten, TB. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17;4:240-51.
154. Vaccarino FM. et al. "Regulation of Cerebral Cortical Size And Neuron Number by Fibroblast Growth Factors: Implications For Autism." *Journal of autism and developmental disorders.* 2009;1201:511–20.
155. Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyens E, D'Andrea L, et al. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem.* 2015;124; 71-87.
156. Gray K, Lawler CP. Strength in numbers: three separate studies link in utero organophosphate pesticide exposure and cognitive development. *Environ Health Perspect.* 2011;119:323.

157. Lazarini CA, Lima RY, Guedes AP, Bernardi MM. Prenatal exposure to dichlorvos: physical and behavioral effects on rat offspring. *Neurotoxicology and Teratology*. 2004;26(4):607-14.
158. Johnson FO, Chambers JE, Prego CA, Givaruangsawat S, Car RL. Developmental Chlorpyrifos and Methyl Parathion Exposure Alters Radial-Arm Maze Performance in Juvenile and Adult Rats. *Toxicol Sci*. 2009;109;(1):132-142.
159. Dam K, Seidler FJ, Slotkin TA. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Developmental Brain Research*. 2000;121;(2):179-87.
160. De Felice A, Scattoni ML, Ricceri L, Calamandrei G. Prenatal Exposure to a Common Organophosphate Insecticide Delays Motor Development in a Mouse Model of Idiopathic Autism. *PLoS One* . 2015;10;(3):1-13.
161. Pan CY. The efficacy of an aquatic program on physical fitness and aquatic skills in children with and without autism spectrum disorders. 2011;5(1):657
162. Picker JD, Yang R, Ricceri L, Berger-Sweeney J. Um fenótipo comportamental neonatal alterado em ratos mutantes *Mecp2*. *Neuroreport*. 2006;17(5):541-4.
163. De Filippis B, Ricceri L, Laviola G. Early postnatal behavioral changes in the *Mecp2*-308 truncation mouse model of Rett syndrome. *Genes Brain Behav*. 2010;9(2):213-23.
164. Rice D, Barone JS. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*. 2000;108:511-533.
165. Leonard HC, Bedford R, Charman T, Elsabbagh M, Johnson MH, Hill EL. Motor development in children at risk of autism: a follow-up study of infant siblings. *Autism*. 2014;18(3):281–91.
166. Santos M, Silva-Fernandes A, Oliveira P, Sousa N, Maciel P. Evidence for abnormal early development in a mouse model of Rett syndrome. *Genes Brain Behav*. 2007;6(3): 277-86.
167. Ricceri L, Venerosi A, Capone F, Cometa MF, Lorenzini P, Fortuna S, et ai. 2006. Developmental Neurotoxicity of Organophosphorous Pesticides: Fetal and Neonatal Exposure to Chlorpyrifos Alters Sex-Specific Behaviors at Adulthood in Mice. *Toxicol Sci* 93: 105-113.
168. Quaak I, Brouns MR, Van de Bor M. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(8): 3384-3408.

169. Battu RS, Singh B, Kang BK. Contamination of liquid milk and butter with pesticide residues in the Ludhiana district of Punjab state, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004;59(3):324-31.
170. Ventura ALM, Abreu PA, Freitas RCC, Sathler PC, Loureiro N, Castro HC. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. *Rev Psiq Clín*. 2010;37(2):66-72.
171. Cody H, Pelphrey K, Piven J. Structural and functional magnetic resonance imaging of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2002;20(3-5):421-38.
172. Dos santos, Kathleen L, et al. Família e a escola na aprendizagem da criança com TDAH: a necessidade de uma parceria ativa e produtiva. *Pedagogia em Ação*. 2016;8:1.
173. Jogaib Bonatto S, Kerner M, Merelles S, Pereira Pondé M. The prevalence of symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder in parents of children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research*. 2016;240:1–3.
174. Qiao D, Nikitina LA, Buznikov GA, Lauder JM, Seidler FJ, Slotkin TA. The sea urchin embryo as a model for mammalian developmental neurotoxicity: ontogenesis of the high-affinity choline transporter and its role in cholinergic trophic activity. *Environ. Health Perspect*. 2003;111:1730–35.
175. Berger-Sweeney J, Hohmann CF. Behavioral consequences of abnormal cortical development: insights into developmental disabilities. *Behav. Brain Res*. 1997;86:121–142
176. Sanghi R, Pillai MK, Jayalekshmi TR, Nair A. Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in breast milk from Bhopal, Madhya Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol*. 2003;22(2):73-6.
177. Venerosi A, Tait S, Stecca L, Chiarotti F, De Felice A, Cometa MF et al. Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring – a mouse study. *Environmental Health*. 2015;14:32.
178. Laugeray A et al. Pre-and postnatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*. 2014;8:390.
179. Furlong MA, Engel SM, Barr DB, Wolff MS. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and reciprocal social behavior in childhood. *Environ Int*. 2014;69(1):125-31.
180. Bruckner JV. Differences in sensitivity of children and adults to chemical toxicity: The NAS Panel Report. *Toxicol Pharmacol*. 2000;31: 280-85.
181. Venerosi A, Calamandrei G, Ricceri L. A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicology and teratology*. 2006;28(4):466-471.

182. Shu W, Cho JY, Jiang Y, Zhang M, Weisz D, Ancião GA, et al. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2005;102(27): 9643-8.
183. Vafeiadi M, Vrijheid M, Fthenou E, Chalkiadaki G, Rantakokko P, Kiviranta H, et al. Persistent organic pollutants exposure during pregnancy, maternal gestational weight gain, and birth outcomes in the mother-child cohort in Crete, Greece (RHEA study). *Environ. Int.* Elsevier Ltd. 2014;64:116–123.
184. Dahlgren JG, et al. Health effects of diazinon on a family. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 2004;42(5):579-91.
185. Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect*. 2011;119:1196–1201.
186. Edgin JO, Pennington BF. Spatial cognition in autism spectrum disorders: superior, impaired, or just intact? *J Autism Dev Disord*. 2005;35(6):729-45.
187. Moura PJ, Xavier GF. Memória de reconhecimento social em ratos. *Psicol*. 2010;21:2.