

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNESP DE BOTUCATU**

**NEUROTOXICIDADE PERINATAL POR CÁDMIO EM
RATOS WISTAR E INTERAÇÃO COM CLORPIRIFÓS**

MARCIA ÁVILA ANDRADE DE AZEVEDO

BOTUCATU - SP

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNESP BOTUCATU**

**NEUROTOXICIDADE PERINATAL POR CÁDMIO EM
RATOS WISTAR E INTERAÇÃO COM CLORPIRIFÓS**

Aluna: Marcia Ávila Andrade de Azevedo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, área Clínica Veterinária,
para obtenção do título de Doutor

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Azevedo, Márcia Ávila Andrade de.

Neurotoxicidade perinatal por cádmio em ratos Wistar - interação com clorpirifós / Márcia Ávila Andrade de Azevedo. – Botucatu [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Antonio Francisco Godinho

Assunto CAPES: 50501089

1. Toxicologia veterinária - Estudos experimentais 2. Cádmio - Toxicologia 3. Perinatologia - Aspectos toxicológicos

CDD 636.08959

Palavras-chave Cádmio; Clorpirifós; Comportamento; Exposição perinatal, Neurotoxicidade

COMISSAO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho
Presidente e Orientador: Membro Titular 1
Centro de Assistência Toxicológica - CEATOX
Instituto de Biociências – UNESP de Botucatu

Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio
Membro: Titular 2
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade Sheila Canevese Rahal de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp de Botucatu

Prof. Dr. Alaor Aparecido Almeida
Membro: Titular 3
Centro de Assistência Toxicológica - CEATOX
Instituto de Biociências – UNESP de Botucatu

Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto
Membro: Titular 4
Departamento: Fitossanidade
Faculdade de Ciências Agrônômicas e Veterinária – UNESP de Jaboticabal

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Membro: Titular 4
Departamento: Patologia
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP de São Paulo

Data da Defesa: 28 de julho de 2009

Dedico este trabalho

“Ao meu pai e aos meus filhos”

“Agradeço de forma especial ao meu orientador professor Dr. Antônio Francisco Godinho pelo seu apoio durante todo o transcorrer do doutorado, sendo sempre compreensivo, mas firme em suas decisões e sempre presente nas minhas necessidades acadêmicas”.

Agradecimentos

- Agradeço a Deus por mais um presente, meu doutorado.
- A Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela oportunidade de cursar o doutorado nesta entidade.
- Ao Professor Alaor Aparecido Almeida pelo processamento das amostras para determinação dos resíduos de cádmio.
- Agradeço a aluna de Biologia e Iniciação Científica, Carolina Gulyas Figueiredo pela dedicação, auxílio na execução do projeto e cuidado freqüente com os animais.
- A todos os professores e funcionários do CEATOX pelo carinho e auxílio no desenvolvimento das atividades do Laboratório.
- A família Nogueira Gea: Genoveva, Meire e demais filhos, noras, netos (as), devido à acolhida carinhosa durante todo o curso.

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TEMA ESTUDADO.....	08
II – REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1 CÁDMIO.....	11
2 CLORPIRIFÓS.....	15
III – CAPÍTULO I – ARTIGO.....	25
IV – CAPÍTULO II – ARTIGO.....	43
V – CAPÍTULO III – ARTIGO.....	74
VI – CONCLUSÃO GERAL.....	99

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA DO TEMA ESTUDADO

Nas últimas décadas os níveis de contaminação de água, ar e solo por cádmio (Cd), um metal pesado encontrado de forma espontânea na natureza, vem aumentando significativamente, acompanhando exponencialmente o rápido e crescente desenvolvimento industrial.

Estudos recentes sobre a toxicidade do metal pesado cádmio (Cd) mostram que, além de ser um carcinogênico para o homem, provoca ainda danos hepáticos, renais, pulmonares e até neurocomportamentais através de ações no sistema nervoso central, sendo esta intoxicação muito importante sob o ponto de vista toxicológico (NORDBERG, 2009).

O cádmio está presente em baterias, pastas de limpeza, pisos, como componente em metalúrgicas, em pigmentos de tintas, acabamentos de peças, plásticos e vidros, além de ser encontrado como contaminantes dos fertilizantes fosfastados (IARC 1993).

As concentrações de cádmio em diferentes alimentos variam muito com a origem do mesmo, com as concentrações deste no solo e com a disponibilidade do metal no meio em condições de ser incorporado pela vegetação. A contaminação dos alimentos se dá através da contaminação do solo, que, por sua vez, pode ser contaminado através das águas de irrigação, de deposição originária da poluição atmosférica e de adubações por fertilizantes fosfatados ou fertilizantes com origem em esgotos (adubos) (VAZ & LIMA, 2003).

O cádmio vem recebendo atenção aumentada pelos cientistas interessados em delinear os riscos de saúde associados com riscos ambientais. Em adição aos problemas documentados no setor industrial (WINTER, 1982), a toxicidade ao cádmio é um assunto importante para a sub-população de usuários do tabaco que inclui milhões de pessoas por todo o mundo. O hábito de fumar também concorre para o engrandecimento da exposição crônica ao cádmio, já que a planta do tabaco é capaz de absorver ativamente cádmio do solo contaminado. Cádmio se acumula nas folhas de tabaco e mesmo fumando um único cigarro diário o indivíduo pode incrementar sua carga corporal do toxicante (KLAASSEN, 1990; YVE, 1992; KALCHER et al., 1993). Na exposição crônica pelo cádmio, a qual a maioria dos seres humanos está exposta ganha um lugar de destaque quando se trata de saúde pública.

Mesmo que os níveis de Cd no solo não alcancem valores alarmantes, o metal permanecerá em uma forma potencialmente disponível, por muitos anos. Portanto, há

necessidade de monitorar o comportamento do Cd e outros metais, por um período mais longo (OLIVEIRA, 2003).

Por ter efeito cumulativo no organismo do homem e outros animais, quando existe a exposição contínua mesmo a baixas doses, ocorrem efeitos graduais que alteram a homeostasia dos organismos podendo culminar com seqüelas permanentes e alta taxa de incidência de doenças diversificadas.

A exposição na fase jovem da vida do indivíduo gera mais preocupação, pelo fato deste metal ser retido em maior escala no organismo jovem que no adulto e talvez, por isso, provoque maiores conseqüências.

O estreito contato de animais de criação com as fontes de exposição os tornam mais propensos às enfermidades ocasionadas pela contaminação por metais pesados. A avaliação da contaminação não deve restringir-se apenas a mensuração do metal que se deseja observar, devendo-se também observar o quadro clínico do animal, além das características epidemiológicas do local, como fonte e tempo de exposição. Alterações bioquímicas diante da exposição a metais pesados devem também ser observadas, a exemplo do que ocorre com o baixo nível da atividade colinesterásica no sangue de animais expostos a produtos fitossanitários, organo-fosforados e/ou carbamatos (VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE, 2002). Neste sentido, potenciação de efeitos bioquímicos tóxicos podem ser observados quando da exposição simultânea a metais e inseticidas, uma vez que como os organo-fosforados, o metal pesado cádmio também inibe a enzima colinesterase sanguínea (ANTONIO et al., 2003).

Ao longo das últimas décadas o aumento acelerado da população mundial estimulou uma maior produção de alimentos para suprir as necessidades nutricionais do número de habitantes aumentado. A maior parte destes alimentos é oriunda de grandes lavouras cujos agricultores visam, sobretudo o lucro. Deste modo, com o objetivo de manter as qualidades aparentes destes produtos, tornando-os mais competitivos e lucrativos, é necessário eliminar destas plantações certas espécies de ervas daninhas, insetos e microorganismos, os quais diminuem a qualidade e a renda dos produtos cultivados, devido às relações ecológicas que com eles estabelecem.

Neste sentido o uso exagerado e abusivo de certas substâncias químicas como os inseticidas para eliminar estas “pragas” da lavoura, tem aumentado de forma exagerada.

Além disso, esses agentes também são utilizados na pecuária para controlar ectoparasitas, e na saúde pública, em campanhas para erradicação ou controle de insetos como o *Aedes aegypti*.

Devido, portanto à contaminação ambiental, existirá sempre uma grande possibilidade de exposição animal e humana. Os primeiros, por causas de pastagens contaminadas por resíduos de metais pesados e simultaneamente por resíduos de praguicidas do tipo inseticidas, que incluem os organo-fosforados, além do uso direto dos inseticidas nos animais; os segundos por causa de águas e alimentos contaminados simultaneamente por metais e inseticidas.

Interação entre substâncias no organismo humano e animal pode ocorrer por causa da contaminação ambiental (água, solo, ar e alimentos) e ocupacional que possibilitam multi-exposição a um grande número de agentes químicos simultaneamente. Quando duas ou mais substâncias químicas estão presentes concomitantemente no organismo dos indivíduos e seus mecanismos de ação exibem formas coincidentes ou parecidas, agindo nos mesmos sistemas do organismo, existindo a possibilidade de efeitos aditivos ou sinérgicos entre elas, engrandecendo os efeitos concomitantes, agravando ainda mais o quadro de toxicidade, de forma mais danosa do que se estivessem agindo isoladamente.

Por este motivo, estudos das ações interativas de agentes químicos sobre o organismo humano e animal se fazem necessárias para evidenciar os problemas de intoxicação pela interação provocada por esses agentes.

REVISÃO DE LITERATURA

CÁDMIO

Estudos sugerindo que o metal pesado cádmio poderia possuir ação carcinogênica para humanos fizeram aumentar progressivamente as pesquisas com este metal nas últimas décadas, despertando o interesse pelo seu potencial toxicológico. Recentemente, evidências experimentais sugerem que exposição à baixa concentração de cádmio do meio ambiente, induz mutação e dano no DNA, o que diminui a estabilidade genética inibindo o reparo endógeno e exógeno das lesões no DNA levando, em consequência, ao aumento da probabilidade de mutações e, por conseguinte a iniciação do câncer (FILIPIC et al., 2006).

A contaminação ambiental por cádmio se iniciou como resultado da poluição causada inicialmente pelo homem, ao explorar o metal em minas e prepará-lo para o seu uso em fundições. A presença do Cd na atmosfera começou a aumentar pela combustão do carvão e pela incineração dos materiais descartados contendo o metal pesado. Como é largamente utilizado, entra na composição do lixo quando, por exemplo, baterias são descartadas e, por ser razoavelmente volátil, é emitido para a atmosfera quando o aço laminado com cádmio é reciclado. Além disso, em sua forma metálica, tende a se condensar com partículas menores do fluxo de fumaça dos incineradores de rejeitos tornando difícil sua captura pelos mecanismos de controle de poluentes colocados nas chaminés de saída de gases. Como resultado de todos estes processos, o cádmio propaga-se por via aérea na forma de gases, ou agregado a partículas sólidas em suspensão (BAIRD, 2002).

O cádmio também é usado entre outros, na fabricação de baterias de veículos, de pedra-pome, pastas de limpeza, pisos, como componente em metalúrgicas, em pigmentos de tintas e vernizes, acabamentos de peças, plásticos e vidros, além de ser encontrado como contaminante dos fertilizantes fosfatados (IARC, 1993).

Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração (VIAENE et al., 2000).

Estudos recentes indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (VIAENE et al., 2000; LERET et al., 2003).

Pesquisas de Leret et al. (2003) comprovaram a ação do cádmio no sistema nervoso central, pois em estudos feitos com animais que foram expostos no período perinatal foram constatados aumento do comportamento agressivo, hiperatividade motora e prejuízo dos mecanismos de memória social.

A água, apesar do cádmio ser bastante solúvel neste meio, não é a principal fonte de exposição a este agente tóxico. Somente uma pequena parcela do nível de cádmio presente no organismo dos seres humanos é resultante da sua ingestão direta da água ou da inalação do ar.

Como resultado das emissões industriais e por causa da contaminação dos fertilizantes utilizados nas plantações, no século XX tem aumentado bastante a concentração do cádmio no solo, implicando em uma maior retenção pelos vegetais (SATARUG et al., 2003), que serão utilizados pelos animais e/ou homem como alimentos. Em regiões de alta concentração, a contaminação de alimentos e água provavelmente causou as primeiras intoxicações; também utensílios para cozinhar contribuem para intoxicações acidentais (GOODMAN & GILMAN, 2001).

Uma das primeiras conseqüências da contaminação de alimentos ocorreu em meados do século XX no Japão. O arroz, neste país, é consumido em grande quantidade e a região de Toyoma teve o seu alimento básico contaminado, porque a água utilizada na irrigação das plantações procedia de um rio onde as fundições locais de zinco despejavam seus efluentes (BAIRD, 2002). A população local foi contaminada de forma crônica devido à ingestão de doses não muito grandes de cádmio durante certo tempo. O principal efeito desta exposição contínua foi uma doença conhecida como Itai-Itai, uma enfermidade que causa a degeneração dos ossos e tem como principal sintoma dor aguda nas regiões lombar e femural e conforme o quadro progride, é comum a ocorrência de fraturas nos ossos devido à osteoporose provocada.

Além destas exposições, devido à planta do tabaco absorver cádmio do solo ativamente e em grande quantidade, os fumantes ativos e passivos também estão expostos a altas concentrações de cádmio presente na fumaça do cigarro (LEWIS, 1972;

JARUP et al., 1998), sendo o Cd um dos componentes importantes para os efeitos tóxicos do cigarro no organismo.

Os metais pesados produzem seus efeitos tóxicos combinando-se com um ou mais grupos reativos essenciais às funções fisiológicas normais. Além da ação sobre o receptor A1 da Adenosina (Adenosina é um neurotransmissor natural, quando liga-se ao receptor A1, diminuindo a actividade neuronal, dilatando os vasos sanguíneos, reduzindo a frequência cardíaca, a pressão sanguínea e a temperatura corporal), o cádmio pode substituir o cálcio e o zinco em processos metabólicos críticos (MANAHAN, 1991; TANAKA et al., 1995) e causar apoptose (morte celular programada – baseado em um estudo envolvendo células T humanas em cultura) (El AZZOUZI et al., 1994).

O Cádmio em especial, fica no mesmo patamar do chumbo e do mercúrio como metais importantes no ponto de vista toxicológico. O cádmio ocorre na natureza em combinação com o zinco e chumbo, causando contaminação ambiental. Como menos de 5% desses metais são reciclados, a poluição ambiental é uma preocupação importante.

A meia-vida do Cádmio no organismo é de 10-30 anos e por isso, se a exposição ambiental for contínua, as concentrações desse metal nos tecidos aumentam durante toda vida de forma cumulativa (GOERING & KLAASSEN, 1984). Dado sua taxa atual de liberação no ambiente, é provável que o cádmio no corpo humano aumente progressivamente no futuro. Em consequência poderia provocar um aumento da incidência das doenças, determinando efeitos danosos aos pulmões, fígado, testículos, o sistema imunológico, o sistema nervoso e o sangue. Efeitos na reprodução e no desenvolvimento têm sido observados em animais expostos ao cádmio, porém não foram verificados ainda nos seres humanos.

O Fígado e rim são os órgãos principais atingidos pela toxicidade por cádmio (SATARUG et al., 2003). Porém, estudos recentes indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar alterações neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal foi diagnosticado (LERET et al., 2003; VIAENE et al., 2000). Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração (VIAENE et al., 2000).

O sistema reprodutor masculino também pode ser particularmente afetado pelo cádmio uma vez que o metal pesado pode funcionar como um desregulador endócrino modificando a função reprodutiva e interferir com a qualidade do sêmen (OLDEREID, et al., 1993; TELISMAN, et al., 2000).

A placenta acumula cádmio, podendo ser detectado pelo leite durante a lactação (BHATTACHARYA, 1983). Nesse período a absorção de cálcio é diminuída e praticamente todo o Cádmio ingerido contamina o leite e em conseqüência também os filhotes. São encontrados altos níveis de Cd no sangue dos filhotes no dia 0 (zero) pós-natal. (CORPAS & ANTÔNIO, 1997) O cádmio em níveis não tóxicos para os tecidos produz danos aos órgãos reprodutivos (ELINDER, 1986). A administração de cádmio para roedores produz necroses , atrofia testicular e esterilidade nos machos, como também alterando o ciclo estral nas fêmeas (PAKSY et al ., 1992; VARGA et al. , 1993).

O cádmio é teratogênico, tendo sido comprovado o aparecimento de exencefalia, hidrocefalia, fenda palatal e labial, microftalmia e outras malformações congênitas em animais de experimentação. O efeito teratogênico foi observado com doses próximas à DL50 (WHO, 1992).

Experimentalmente, exposição pré e neonatal resultou em hiperatividade (ALI, et al., 1990) enquanto que em ratos adultos demonstrou uma diminuição da atividade locomotora espontânea (ALI, et al, 1990; LUKAWSKI et al., 2005). Arito et al. (1981) observaram aumento do comportamento agressivo de ratos, induzido por administração repetida de cádmio. Pesquisas de Leret et al. (2003) comprovaram a ação do cádmio no sistema nervoso central, pois em estudos feitos com animais foram constatados hiperatividade motora, aumento do comportamento agressivo e prejuízos dos mecanismos de memória social. Recentemente, pesquisas desenvolvidas em nossos laboratórios também demonstraram que ratos jovens os quais foram expostos durante quatro semanas ao cádmio tiveram aumento no comportamento de agressividade (CASTILHO et al., 2007).

Na exposição ambiental ao metal cádmio existe um fator cinético importante que felizmente limita bastante os efeitos desta intoxicação para o organismo humano e animal, uma vez que, excluindo a exposição ocupacional, a maior fonte de exposição para o homem é por via alimentar. Trata-se do fato de que na exposição oral, do total de

cádmio ingerido misturado à água e/ou alimentos contaminados, apenas cerca de 5% do metal é absorvido por via gastrointestinal (WAALKES, 1992). Por outro lado existe o grande agravante de que nas últimas décadas a contaminação de água e alimentos tem aumentado significativamente e de modo exponencial e por isso, níveis cada vez maiores de cádmio têm sido observados no organismo humano e animal.

CLORPIRIFÓS

O inseticida organofosforado clorpirifós (CPF) é um contaminante ambiental, bastante utilizado no nosso país (ANVISA 2005) e na Europa (ALUIGI et al., 2005). No Brasil é utilizado em agricultura, no ambiente doméstico e em campanhas de saúde pública. Recentemente, a agência de Vigilância Sanitária através do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) indicou que 28,5% do total de amostras de alimentos analisadas em vários estados do território brasileiro, continham níveis de resíduos de produtos acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR). As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de maçã, morango e tomate. Particularmente nesta última, um dos inseticidas não autorizados detectados foi o clorpirifós (ANVISA 2005).

Na ação neurotóxica do clorpirifós o alvo primário é a enzima acetil colinesterase sanguínea e neuronal, cuja inibição exacerba as ações colinérgicas por causa do excesso de acetilcolina circulante (RICHARDSON et al., 1993); envolvimento de outros sistemas neurais em adição ao sistema colinérgico também tem sido observados nestes efeitos de neurotoxicidade (RICCERI et al., 2003).

Pesquisas com o inseticida organo-fosforado clorpirifós, demonstraram que o mesmo pode provocar alterações e deficiências no comportamento e memória espacial, o que demonstra claramente danos neurais, afetando provavelmente atividade de neurotransmissores do sistema cerebral (CARR et al., 2001).

É comum se observar crianças de famílias de agricultores residindo dentro das áreas de plantação ou ao redor das mesmas, estando expostas simultaneamente a uma variedade de pesticidas (SIMCOX, J.N. et al. 1995).

Estudos com exposição perinatal tem demonstrado que o clorpirifós é altamente tóxico para ratos neonatos, persistindo às vezes os efeitos até a fase de adulto. Exposição a dose baixas pode provocar toxicidade sistêmica determinando alterações no

desenvolvimento das células neurais, com respeito a síntese do DNA (DAM et al., 1998), transcrição gênica (CRUMPTON et al., 2000), diferenciação celular (ROY et al., 1998), e sinaptogenese (DAM et al., 1999 a,b).

Tem sido demonstrado que CPF pode causar neurotoxicidade em organismos em desenvolvimento. Levin et al. (2004) mostraram em ratos, que a exposição pré-natal ao CPF causa persistentes efeitos comportamentais, principalmente diminuição da capacidade de memória e alterações da atividade locomotora. Estes autores mostraram que estes efeitos comportamentais estão relacionados a prejuízos afetando a replicação celular e interrupção de uma variedade de sistemas cerebrais, e os mesmos persistem desde o estágio jovem até a vida adulta do indivíduo. Icenogle et al. (2004) demonstraram alterações neurocomportamentais em ratos adolescentes e adultos os quais sofreram exposição a dose subtóxica de CPF no período de neurulação.

Em experimentos para testar a agressividade em animais expostos no período perinatal ao organofosforado, Venerosi et al. (2008) demonstraram que CPF afeta as respostas maternas e a agressão maternal em fêmeas de camundongos adultos, mas não em fêmeas na idade de puberdade.

Outros autores demonstraram que num período neonatal crítico, a exposição a doses subtóxicas de clorpirifós induz deficiências no desenvolvimento de coordenação motora e atividade locomotora e que estes efeitos podem ser sexo-dependentes (DAM et al., 2000). Slotkin & Seidler (2007) também observaram efeitos dependentes de sexo em animais adolescentes, por exposição pré-natal ao clorpirifós, associada a hiperatividade serotoninérgica e dopaminérgica.

Outros modelos experimentais não animais tem sido utilizados também, de forma complementar, para demonstrar os efeitos comportamentais do CPF. Neste sentido, Levin et al. (2004) demonstraram que clorpirifós modifica o comportamento de chocar ninhadas em peixes.

Por outro lado também foi demonstrado, além do efeito de neurotoxicidade em animais expostos ao organofosforado clorpirifós, que o mesmo pode provocar geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo o qual poderia ser uma das formas do clorpirifós impedir o desenvolvimento neurocomportamental adequado em crianças em desenvolvimento (BAGCHI et al., 1995; CRUMPTON et al., 2000; QUIAO et al, 2005).

OBJETIVOS DO ESTUDO

Geral

Estudar aspectos da neurotoxicidade perinatal pelo cádmio em ratos Wistar, avaliando o desenvolvimento neurocomportamental da prole de ratas expostas ao metal pesado nos períodos da gestação e lactação e, nestes filhotes, os efeitos de interação pela exposição concomitante ao inseticida organofosforado clorpirifós.

Específicos

- Avaliar as mães nos períodos de gestação e lactação;
- Avaliar desenvolvimento físico (somático) dos filhotes cujas mães foram expostas ao cádmio;
- Avaliar desenvolvimento sensório-motor (reflexos) dos filhotes cujas mães foram expostas ao cádmio;
- Avaliar o desenvolvimento neurocomportamental da prole jovem e adulta dos filhotes cujas mães foram expostas ao cádmio;
- Avaliar o desenvolvimento neurocomportamental da prole jovem e adulta dos filhotes expostos ao cádmio através das mães, e que foram expostos por gavagem ao clorpirifós na idade jovem;
- Determinar o cádmio tecidual no sangue e cérebro dos filhotes cujas mães foram expostas ao cádmio;
- Avaliar a atividade da enzima acetilcolinesterase no sangue e no cérebro dos filhotes expostos ao cádmio através das mães, e que foram expostos por gavagem ao clorpirifós na idade jovem.

REFERÊNCIAS

- ALI, M. M.; MATHUR, N.; CHANDRA, S. V. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. **Ind. J. Exper. Biol.**, v. 28, p. 653, 1990.
- ALUIGI, M.G.; ANGELINI, C.; FALUGI, C.; FOSSA, R.; GENEVER, P.; GALLUS, L.; LAYER, P.G.; PRESTIPINO, G.; RAKONCZAV, Z.; SGRO, M.; THIELECKE, H.; TROMBINO, S. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. **Chem.-Biol. Interact.**, v.157-158, p.305-316, 2005.
- ANTONIO, M.T.; CORREDOR, L.; LERET, M.L. Study of the activity of several enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. **Toxicol. Lett.**, v.143, p.331-340, 2003.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Controlando agrotóxicos nos alimentos: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AAC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, A FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE. Relatórios de atividades 2004. Brasília. **ANVISA**, 2005. Disponível em www.anvisa.gov.br/, acessado em 15/março/2008 2005.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2º.ed., cap.7, p.622, Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E.A.; STOHS, S.J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. **Toxicology**, v.104, p.129-140, 1995.
- BHATTACHARYA, M. H. Bioavailability of orally administered cadmium and lead to the mother, foetus, and neonate during pregnancy and lactation: an overview. **Sci. Total Environ**. V. 28, p. 327-342. 1983.

- CARFAGMA, M.A., PONSLER, G.D., MUBEHAC, B. B. Inhibition of ATP-ase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. **Chem. Biol. Interact.**, v.100, p.53-65, 1996.
- CARR, R.L., CHAMBERS, H.W., GUARISCO, J.A., RICHARDSON, J.R., TANG, J., CHAMBERS, J. E. Effects of repeated oral postnatal exposure to chlorpyrifos on open-field behavior in juvenile rats. **Toxicol. Sci.** v. 59, p.260-267, 2001.
- CRUMPTON, T.L., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effects in nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. **Brain Res.** v. 857, p. 87-98, 2000.
- CASTILHO, H.S.; SOUZA, R.P.; LACORTE, L.M.; TERÇARIOL, S.G.; ALMEIDA, A.A.; GODINHO, A.F. Administração prolongada de cádmio aumenta a agressividade em ratos jovens. **Rev. Bras. Toxicol.**, 20(3), 116, 2007.
- CORPAS, I., ANTÔNIO, M., T. Study of alterations produced by Cadmium and Cadmium/Lead administration during gestational and early lactation periods in the reproductive organs of the rat. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.41, p.180-188, 1998.
- DAM, K., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: delayed targeting of DNA synthesis after repeated administration. **Dev. Brain Res.**, v. 108, p. 39-45, 1998.
- DAM, K.; GARCIA, S.J., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A. Neonatal chlorpyrifos exposure alters synaptic development and neuronal activity in cholinergic and catecholaminergic pathways. **Dev. Brain Res.**, v. 116, p. 9-20, 1999 a .
- DAM, K., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A. Chlorpyrifos releases norepinephrine from adult and neonatal rat brain synaptosomes. **Dev. Brain Res.**, v. 118, p. 129-133, 1999b.
- DAM, K.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. **Dev. Brain Res.**, v.121, p.179-187, 2000.

- EL AZZOUZI, B.; TSANGARIS, G.T.; PELLEGRINI, O.; MANUEL, Y.; BENVENISTE, J.; THOMAS, Y. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. **Toxicology**, v. 88(1-3), p.127-39, 1994.
- ELINDER, C.G. Other toxic effects . In Cadmium and Helth: **Effect and Response**. L. Friberg, T. Kjellström, and G.Fnordberg, Eds. v.2. p.159-205. 1986. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- FILIPIC, M., FATUR, T.; VUDRAG, M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. **Hum. Exper. Toxicol.**, v. 25, p. 67-77, 2006.
- GABBINI, G.; BIAC, D.; DIZIEL,C. Toxicity of cadmium for the central nervous system. **Exper. Neurol.**, v. 18(2), p.154-160, 1967.
- GIAGINIS, C.; GATZIDOU, E.; TEOCHARIS, S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.213, p.282-290, 2006.
- GOERING, P.L.; KLAASSEN, C.D. Zinc –induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 74 (3), p. 299-307, 1984
- HALLER, J.; KRUK, M.R. Normal and abnormal aggression: human disorders and novel laboratory models. **Neurosci. Behav. Rev.**, v.30, p.292-303, 2006.
- ICENOGLE, L.; CHRISTOPHER, N.; BLACKWELDER, W.; CALDWELL, D.; QUIAO, D.; SEIDLER, T.; SLOTKIN, T.; LEVIN, E. Behavioral alterations in adolescent and adult rats after brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.26, p.95-101, 2004.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. **Berylium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry**. Lyon: IARC, 1993. v.58, 444p.

- JARUP, P.; BERGLUND, J.; ELINDER, C.G; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure – A review of the literature and a risk estimate. **Environ. Health**, v.24, p.1- 51, 1998.
- KLAASSEN, C.D. Heavy metals and heavy metal antagonists. In: Goodman, A. (Eds.), **The pharmacology basis of therapeutics**. Elms-ford: New York/Pergamon,1592-1614, 1990.
- KALCHER, K.; KERN, W.; PIETSCH, R., 1993. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. **Sci. Total Environ.**, v. 128, p.21-35, 1993.
- LERET, M. L.; MILLÁN, J. A. S.; ANTONIO, M. T. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. **Toxicology**, v. 186, p. 125-130, 2003.
- LEVIN, E.D., SWAIN, A. H., DORNELY, S.; LINNEY, E. Developmental Chlorpyrifós effect on Hatchling zebrafish Swimming Behavior. **Neurotoxicol. Teratol.**, v. 26, p.719-723, 2004.
- LEWIS, G.P.; COUGHLIN, L.L.; JUSKO, W.L.; HARTZ, S. Contribution of cigaret smoking to cadmium accumulation in man. **The Lancet**, v.299, p.291-2, 1972.
- LUKAWSKI, K.; NIERADKO, B.; SIEKLUCKA-DZIUBA, M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.27, p.575-584, 2005.
- MANAHAN, S.E. **Toxicological Chemistry**, Lewis Publishers, Inc, Chelsea, MI, 1991.
- NORDBERG, G.F. Historical perspectives in cadmium toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** (2009), doi 10.1016/j.taap.2009.03.015.
- OLDEREID, N.B.; THOMASSEN, Y.; ATTRAMADAL, A. Concentrations of lead, cadmium and zinc in the tissues of reproductive organs of men. **J. Reprod. Fertil.**, v.99, p.421-425, 1993

- OLIVEIRA, R. C. Avaliação do movimento de cádmio, chumbo e zinco em solo tratado com resíduo-calcário. Lavras, 2003. 13 f. **Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia – PPGA**, Universidade Federal de Lavras, 2003.
- PAKSY, K., VARGA, B., NARAY, M., OLAJOS, F., AND FOLLY, G., 1992. Altered ovarium progesterone secretion induced by cadmium fails to interfere with embryo transport in the oviduct of the rat. **Reprod. Toxicol.** 6, p. 77-83. 1992.
- QUIAO, D.; SEIDLER, F.J.; SLOTIKIN, T.A. Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.206, p.17-26, 2005.
- RICCERI, L.; MARKINA, N.; VALANZANO, A.; FORTUNA, S.; COMETA, M.F.; MENEGUZ, A.; CALAMANDREIA, G. Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.191, p.189-201, 2003.
- RICHARDSON, R.J.; MOORE, T.B.; KAYYALI, U.S.; FOWKE, J.H.; RANDALL, J.C. Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifos oxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. **Fundam. Appl. Toxicol.** v.20, p.273–279, 1993.
- ROY, T.S., ANDREWS, J.E., SEIDLER, F.J., SLOTIKING, T.A., Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. **Teratology**, v. 58, p. 62-68, 1998.
- SATARUG, S.; BAKER, J. R.; URBENJAPOL, S.; HASWELL-ELKINS, M.; REILLY, P.; WILLIAMS, D. J.; MOORE, M. R. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicol. Lett.**, v.137, p. 65-83; 2003.

- SKULA, A.; SKULA, G.S; SRIMAL, R. C.; Cadmium-induce alterations in blood brain barrier permeability and it's possible correlation is decreased microvessel antioxidant potencial in rat. **Human Exp. Toxicol.**, v.15, p. 400-405, 1996.
- SLOTKIN, T.A.; SEIDLER, F.J. Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: critical periods for regional and sex-selective effects. **Reprod. Toxicol.**, v.23, p.421-427, 2007.
- SIMCOX, J. N., FENSK, R.A., WOLZ, S.A., LEE, I-C., KALMAN, D.A. Pesticides in Household Dust and Soil: Expouse Pathways for Children of agricultural Families. **Environ. Health Perspec.** v. 103, p.12, 1995.
- TANAKA, M.; YANAGI, M.; SHIROTA, K. Effect of cadmium in the zinc-deficient rat. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 37 , p 203-208., 1995.
- TELISMAN, S. CVITKOVIC, P.; JURASOVIC, J. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. **Environ. Health Perspect.**, v.108, p.45-53, 2000.
- VARGA, B., ZSOLNAI, B., PAKSY K., NARAYy, M., and UNGYARY, Gy. Age dependent accumulation of cadmium in ther human ovary. **Reprod. Toxicol.** v.7, p. 225-228, 1993.
- VAZ, A. J.; LIMA, I. V. Imunotoxicologia dos Metais. In: AZEVEDO, F.A.;CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade.** São Paulo: Atheneu,cap. 13, p. 407, 2003.
- VERONESI, A. CUTULI, D.; COLONMELLO, V. ; CARDONA, D.; RICERI, L. ; CALAMANDREI, G. Neonatal exposure to clorpyrifos affeccts maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. **Nerotoxicol. Teratol.**, v.30, p. 468-474, 2008.
- VIAENE, M. K.; MASSACHELEIN, R.; LEENDERS, L.; DE GROOF, M.; SWERTS, L. J.; ROELS, H. A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to

cadmium: across sectional epidemiological study. **Occup. Environ. Med.**, v. 57, p. 19-27, 2000.

VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAUDE. **Textos de Epidemiologia para Vigilância Ambiental em Saúde**. Noções de vigilância ambiental em saúde: conceitos, estrutura, concepção e modelo de atuação. Brasília- DF, P. 19-28, 2002.

WAALKES, M.P.; WAHBA, Z.Z.; RODRIGUEZ, R.E. Cadmium. In: **Hazardous Materials Toxicology – Clinical Principles of Environmental Health**. Sullivan, Jr, J.B.; Krieger, G.R. (Eds.). Baltimore. Williams & Wilkins, 845-852, 1992.

WINTER, H. . The hazards of cadmium in man and animals. **J. Appl. Toxicol.** V. 2, 61-67, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO. **Cadmium**. Geneva: WHO, 1992. (Environmental Health Criteria, 134).

YVE, L. Cadmium in tobacco. **Biomed. Environ. Sci.**, v.5, p. 53-56. 1992.

III – CAPÍTULO I – ARTIGO

Este artigo foi escrito para ser submetido segundo as normas do periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**.

Título: Exposição perinatal a baixo nível de cádmio potencia a neurotoxicidade pelo clorpirifós em ratos jovens.

Márcia Ávila Andrade de Azevedo¹, Carolina Gulyas Figueiredo², Antonio Francisco Godinho^{3*}

ABSTRAT.- Andrade, A. M., Figueiredo, C.G., Godinho, A.F. 2009. [**Perinatal exposition to low cadmium level enhances chlorpyrifos neurotoxicity in young rats.**]

The objective of this work was to study whether previous perinatal exposition to a low cadmium dose was able to modify neurotoxicity provoked by sub acute chlorpyrifos administration to young rats. For this, pregnant females received cadmium acetate (Cd) in distillate water (10mg of Cd⁺⁺/ liter) or sodium acetate as control (Ct), during gestation and lactation. From 21^o. to 27^o. postnatal day (PND) one group of nestling deriving from control mothers and other of cadmium exposed mothers, received chlorpyrifos (CPF, 30 mg/kg, orally – gavage). In PND28 were assessed cerebral cholinesterase enzyme activity, motor coordination, and exploration in the hole-board box, and open field locomotor activity. Were observed inhibition of the cerebral cholinesterase by Cd and CPF, being more intense in the Cd+CPF group; decrease of the exploration behavior and motor coordination by Cd and CPF, being the motor coordination decrease, more pronounced in the Cd+CPF group; decrease of the spontaneous locomotion by Cd and CPF. In conclusion, previous perinatal exposition to a low cadmium dose was able to intensify neurotoxicity by chlorpyrifos in young animals.

INDEX TERMS: cadmium, chlorpyrifos, neurotoxicity, cholinesterase, behavior

¹ Pós-graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu.

² Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu, SP

³ Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus Botucatu, SP, Distrito de Rubião Júnior, 18618-000, Brasil.

E-mail: godinho@ibb.unesp.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar se exposição perinatal prévia a baixa dose de cádmio poderia modificar a neurotoxicidade provocada pela administração subaguda de clorpirifós em ratos jovens. Para tanto, fêmeas prenhes receberam acetato de cádmio em água destilada (10 mg de Cd^{++} /litro) ou de acetato de sódio como controle, durante a gestação e lactação. Do 21º. ao 27º. dia pós natal (DPN21-27) um grupo de filhotes de mães controle e de um grupo de mães expostas ao cádmio, receberam clorpirifós (30 mg/kg, via oral – gavage). Ao DPN28 foram avaliados a atividade da enzima colinesterase cerebral, coordenação motora e exploração em caixa de hole-board, e atividade locomotora em arena de campo aberto. Observou-se inibição da colinesterase cerebral por Cd e CPF, que foi mais intensa no grupo Cd+CPF; diminuição do comportamento de exploração e coordenação motora por Cd e CPF, sendo a incoordenação motora mais acentuada no grupo Cd+CPF; diminuição da locomoção espontânea por Cd e CPF. Conclui-se que exposição perinatal prévia a baixa dose de cádmio pode intensificar a neurotoxicidade pelo clorpirifós em animais jovens.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: cádmio, clorpirifós, neurotoxicidade, colinesterase, comportamento.

INTRODUÇÃO

As novas tecnologias utilizadas visando aumento de produtividade, tanto na agricultura quanto pecuária, têm estimulado o uso de produtos químicos que são potencialmente perigosos à saúde animal, humana e meio ambiente (Peyon 2007). O uso de inseticidas para controle de pragas em lavouras e criação de animais, bem como a presença de metais pesados como o cádmio em fertilizantes fosfatados, tem determinado um acúmulo destes agentes químicos no meio ambiente. Estes agentes podem além de permanecer no solo, contaminar águas de córregos, de microbacias, servindo como fonte de contaminação animal. Também podem ser absorvidos pela vegetação, contaminando pastagens e vegetação utilizada como alimento, tornando-se assim também, fonte de contaminação animal (Sharma & Street 1980, Amodio-Cocchieri & Fiore 1987, Dey et al 1996, Marçal et al 2004, Nunez et al 2006).

Como ocorre o acúmulo desses produtos por um período prolongado no meio ambiente, existe uma grande preocupação de pesquisadores, ambientalistas e técnicos, de que a poluição possa determinar um comprometimento de toda uma cadeia produtiva, sofrendo os consumidores finais, problemas de intoxicação pela exposição advinda desses produtos.

Organofosforados são um dos grupos químicos dos inseticidas mais utilizados na agricultura, pecuária, em campanhas de saúde pública e até no ambiente doméstico (Osweiler 1998, Barbosa et al 2005). Dentre os organofosforados utilizados para estas finalidades, o clorpirifós é um dos mais utilizados no Brasil (ANVISA 2005) e também na Europa (Aluigi et al 2005). O uso inadequado dos organofosforados por erros no preparo e por uso de concentrações abusivas (Boermans et al 1984, Radostitis et al 2000) podem causar grandes prejuízos a pecuária e favorecer a contaminação das águas, alimentos e pastagens.

Na ação neurotóxica do CPF o alvo primário é a enzima acetilcolinesterase neuronal, central e periférica, cuja inibição exacerba as ações colinérgicas por causa do excesso de acetilcolina circulante (Richardson et al 1993); envolvimento de outros sistemas neurais em adição ao sistema colinérgico também tem sido observados nos efeitos de neurotoxicidade (Ricceri et al 2003).

Tem sido demonstrado que CPF pode causar neurotoxicidade em organismos em desenvolvimento. Levin et al (2004) mostraram em ratos, que a exposição pré-natal ao CPF causa persistentes efeitos comportamentais, principalmente diminuição da capacidade de memória e alterações da atividade locomotora. Estes autores mostraram

que estes efeitos comportamentais estão relacionados a prejuízos afetando a replicação celular e interrupção de uma variedade de sistemas cerebrais, e os mesmos persistem desde o estágio jovem até a vida adulta do indivíduo. Icenogle et al (2004) demonstraram alterações neurocomportamentais em ratos adolescentes e adultos os quais sofreram exposição a dose subtóxica de CPF no período de neurulação. Em experimentos para testar a agressividade em animais expostos no período perinatal ao organofosforado, Venerosi et al (2008) demonstraram que CPF afeta as respostas maternas e a agressão maternal em fêmeas de camundongos adultos, mas não em fêmeas na idade de puberdade.

Por outro lado, nas últimas décadas o nível do metal pesado cádmio tem aumentado muito no meio ambiente (água, solo e ar) por causa da ação antropogênica, provocando um grande aumento da exposição humana e animal (Yassin & Martonik 2004). Acompanhando os efeitos da crescente industrialização, a exposição ocupacional por cádmio também cresceu exponencialmente, levando este metal a ocupar um lugar de destaque nas questões de saúde pública, quando se trata de intoxicação por metais pesados (Satarug et al 2003).

Por ter efeito cumulativo no organismo humano e animal, quando existe a exposição contínua mesmo a baixas doses, ocorrem efeitos graduais que alteram a homeostasia dos organismos podendo culminar com seqüelas permanentes e uma incidência diversa e mais alta de doenças (Hypponen et al 1993). A exposição na fase jovem da vida do indivíduo gera mais preocupação, pelo fato deste metal ser retido em maior escala no organismo jovem que no adulto e talvez, por isso, provoque maiores conseqüências (Bhattacharya 1983; Ali et al 1986). Neste sentido, estudos experimentais que mimetizam a situação de exposição perinatal são importantes, pois podem trazer uma maior compreensão dos efeitos do cádmio sobre o desenvolvimento e as conseqüências a curto e longo prazo na vida dos indivíduos os quais são expostos já na fase uterina.

Apesar de provocar toxicidade sistêmica, estudos recentes indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (Viaene et al 2000, Leret et al 2003). Experimentalmente, Nagymajtenyi et al (1997) observaram que as alterações neurotoxicológicas funcionais e comportamentais provocadas pelo cádmio podem transpor gerações. Alguns resultados experimentais são contraditórios; exposição pré e neonatal resultou em hiperatividade (Ali et al 1990) enquanto que em

ratos adultos demonstrou uma diminuição da atividade locomotora espontânea (Ali et al 1990, Lukawski et al 2005).

O objetivo deste trabalho foi estudar se exposição perinatal prévia a baixa dose de cádmio poderia modificar a neurotoxicidade, provocada pela administração subaguda de clorpirifós por gavagem, em ratos na idade jovem.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar obtidos da colônia do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Durante as fases de adaptação, crescimento e experimental, os animais permaneceram no biotério do CEATOX, sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo líquido e ração sem restrição.

O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEAA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP de Botucatu.

Aos 80 dias de idade os animais foram acasalados colocando-se na mesma gaiola 3 fêmeas com 1 macho; as fêmeas foram consideradas fecundadas, quando encontrados espermatozoides no líquido do lavado vaginal (considerado o dia zero do acasalamento). As fêmeas consideradas prenhes foram colocadas individualmente em gaiolas e, durante todo o período de gestação passaram a receber *ad libitum* solução de acetato de cádmio (Cd) (Synth-Brasil) em água destilada (10 mg de Cd⁺⁺/litro) ou de acetato de sódio (Dinâmica-Brasil) como controle (Ct) em água destilada (solução equimolar à de acetato de cádmio). Neste período as mães foram avaliadas quanto ao peso corporal, ingestão de líquido e ração (uma vez por semana), comportamento na gaiola e possível sintomatologia.

Ao nascimento, os filhotes foram contados, pesados e observados quanto a alterações físicas macroscópicas grosseiras e as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes por mãe (5-6 machos); as soluções de cádmio e controle continuaram sendo administradas às mães durante todo o período da lactação. Os filhotes foram mantidos junto com as mães até o DPN21 e depois separados em grupos de 15 filhotes, sendo para isto utilizado um filhote de cada mãe, para evitar tendências provindas da ninhada que pudessem mascarar ou deturpar os resultados obtidos para cada grupo. Do DPN21

ao DPN27 um grupo de filhotes de mães controle e um grupo de mães expostas ao cádmio, receberam clorpirifós (Lorsban 480BR[®]–Dow Agrosiences-Brasil) na dose de 30 mg/kg, (via oral - gavage), completando assim 4 grupos experimentais para o estudo, respectivamente grupos Ct, Cd, CPF e Cd + CPF.

Avaliação da Acetilcolinesterase cerebral

O tecido cerebral total foi homogeneizado por 3 minutos em tampão Tris-HCl 0,038 M, pH 7,6, utilizando-se homogenizador Potter Braun e alíquotas de 100 µl do homogenato foram utilizadas para a análise enzimática. A atividade da acetilcolinesterase cerebral foi determinada pelo método espectrofotométrico de Ellman et al (1961). O conteúdo de proteína cerebral foi determinado pelo método de Lowry et al (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

Avaliação do comportamento em Hole-board

A coordenação motora e a atividade de exploração dos animais foram avaliadas no DPN28 utilizando o Hole-board descrito por Meyer & Caston (2005), que consiste de uma caixa quadrada (28x28x20cm de altura), tendo o assoalho pintado de branco e contendo 36 buracos de 2 cm de diâmetro por 1 cm de profundidade (arranjo de 6x6). Uma tampa de vidro recobre a caixa, para permitir visualização no interior da caixa. Para cada animal foi avaliado, durante cinco minutos, a coordenação motora através da contagem do número de imersões das patas (paw dip) nos buracos ou da exploração, através da contagem do número de imersões da cabeça (head-dip) nos buracos. O teste foi filmado para posterior avaliação. Ao final de cada sessão com cada animal, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

Avaliação da atividade locomotora em Arena de Campo Aberto

A atividade locomotora dos animais foi avaliada no DPN28, segundo metodologia descrita em Trombini et al 2001, por meio de observação direta durante 3 minutos, em arena de campo aberto, aparelho construído conforme especificado por Broadhurst (1960). Ao final de cada sessão com cada animal a arena foi limpa com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos no presente experimento foram comparados através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre grupos foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) (Snedecor & Cochran, 1980).

RESULTADOS

Atividade da colinesterase cerebral

No quadro 1 pode-se observar que a atividade da enzima colinesterase cerebral foi inibida significativamente ($p < 0,05$) em 30,8% nos animais que foram expostos ao cádmio e em 38,5% nos animais que receberam o CPF. Quando os animais foram expostos concomitantemente ao cádmio perinatal e depois ao clorpirifós, houve uma inibição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) mais intensa, de 55,5% na atividade enzimática da colinesterase cerebral.

Coordenação motora e exploração

No quadro 2 observa-se que houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na frequência de imersão de patas, no grupo de animais expostos ao Cd e no exposto ao CPF, indicando incoordenação motora acentuada. Quando os animais foram expostos concomitantemente ao Cd perinatal e depois ao CPF, houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$), mais intenso do que quando a exposição foi ao Cd perinatal ou ao CPF isoladamente, indicando uma interação com potenciação do efeito de incoordenação motora, pela associação dos dois químicos.

No quadro 2 observa-se também que a frequência de imersão de cabeça diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos animais que foram expostos ao Cd e ao CPF, indicando diminuição do comportamento de exploração, pelos dois químicos. Porém, esta diminuição continuou na mesma amplitude quando os animais receberam exposição perinatal ao Cd e depois receberam CPF, sugerindo não existência de efeito de interação sobre este comportamento.

Atividade Locomotora

No quadro 3 observa-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na atividade locomotora no grupo de animais expostos ao Cd e no exposto ao

CPF. Porém, esta diminuição continuou na mesma amplitude quando os animais receberam exposição perinatal ao Cd e depois receberam CPF, sugerindo não existência de efeito de interação sobre este comportamento.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que exposição perinatal prévia a baixa dosagem de cádmio oral, pode intensificar a neurotoxicidade subaguda provocada pelo clorpirifós em ratos.

Antonio et al (2003) demonstram pela primeira vez que exposição perinatal ao cádmio é capaz de diminuir a atividade da acetilcolinesterase cerebral em ratos recém desmamados. Os presentes resultados além de confirmar a atividade anticolinesterásica do Cd demonstram pela primeira vez também, a redução da atividade da colinesterase cerebral na prole jovem, por exposição perinatal ao cádmio. Estes resultados por si só já são alarmantes, pois redução da atividade desta enzima no cérebro potencia a atividade da acetilcolina e provoca efeitos danosos sobre o sistema nervoso central, por estimulação dos sistemas colinérgicos, sendo que estes efeitos podem ser mais perigosos ainda quando são observados nos indivíduos jovens ou em desenvolvimento (Ricciari et al 2003).

Interação entre substâncias químicas é um dos grandes problemas com os quais a toxicologia se depara hoje, devido ao problema sério da multiexposição a um sem número de substâncias químicas (Mumtaza et al 2007). Quando mais de uma substância de exposição é capaz de atuar provocando efeitos tóxicos num mesmo sistema, a resultante é geralmente um quadro aumentado de sinais e sintomas clínicos, com uma letalidade ainda maior e os riscos aumentam na medida em que indivíduos jovens são atingidos mais precocemente (Pohl & Abadin 2008). A grande dificuldade de estudar e compreender os efeitos da multiexposição é a de que as substâncias químicas podem modificar sua forma de atuação quando estão na forma de misturas e a resultante final pode ser diversa daquela observada na situação de exposição a uma única substância isoladamente (Rice et al 2008).

Os filhotes das mães expostas ao cádmio tiveram diminuição da coordenação motora, avaliada pelo aumento da frequência de imersão de patas no hole-board (Quadro 2). É importante frisar que isto aconteceu em animais que também exibiram uma diminuição da exploração e da locomoção espontânea (Quadro 3), o que

teoricamente implicaria numa frequência menor de imersões de patas no hole-board, já que quando o animal anda menos pelo aparelho, a probabilidade de deslizar a pata para dentro do buraco é menor. Isto apenas salienta a importância do efeito negativo ao nível do sistema nervoso que controla a atividade músculo-esquelética. Esses nossos resultados são coincidentes com os de Lukawski et al (2005), os quais também observaram diminuição da atividade locomotora espontânea pelo Cd em ratos adultos, e contradizem os de Leret (2003) e Ali et al (1990) que encontraram hiperatividade locomotora pela influência do cádmio perinatal. As diferenças encontradas podem ser devido aos diferentes procedimentos experimentais, doses, etc.

No presente experimento, os animais recebendo apenas administração subaguda de CPF tiveram diminuição da exploração e coordenação motora em hole-board (Quadro 2) e da locomoção na arena de campo aberto (quadro 3), em um nível semelhante ao observado com o Cd, evidenciando a participação do sistema colinérgico central sobre a toxicidade observada. Porém, quando os mesmos animais expostos perinatalmente ao Cd foram também expostos ao CPF, houve uma intensificação do efeito de incoordenação motora, sem alteração do efeito negativo sobre a exploração e a locomoção. Potenciação de efeitos bioquímicos tóxicos poderia ser esperada quando da exposição simultânea a toxicantes como o Cd e o CPF, uma vez que ambos inibem a enzima colinesterase.

É conhecido que quando duas ou mais substâncias químicas estão presentes concomitantemente no organismo dos indivíduos e as vias para seus mecanismos de ação tóxica exibem formas coincidentes ou parecidas, agindo nos mesmos sistemas biológicos, existe a possibilidade de efeitos aditivos ou sinérgicos entre elas, engrandecendo os efeitos concomitantes e agravando ainda mais o quadro de toxicidade, de forma mais danosa do que se os toxicantes estivessem agindo isoladamente (Rice et al 2008). Por este motivo mais estudos das ações interativas de agentes químicos presentes simultaneamente no organismo animal e humano, se fazem necessários.

O acúmulo de acetilcolina induz três tipos de sinais clínicos no organismo animal: (1) muscarínicos, caracterizados por sudorese, sialorréia, hipermotilidade gastrointestinal, diarréia, tenesmo e bradicardia; (2) nicotínicos, resultantes da ação da acetilcolina sobre as placas motoras e caracterizados por rigidez muscular, tremores, paresia e paralisia; (3) do sistema nervoso central, que resultam em inquietação, ataxia, convulsão, depressão e coma (Barros & Driemeir 2007). Os animais experimentais utilizados neste estudo e que tiveram a colinesterase cerebral inibida, não apresentaram

aparentemente nenhum destes sinais clínicos bem evidenciados visualmente o que favorece a sugestão de um efeito pouco drástico e transitório, pela dose utilizada nos animais dos experimentos.

De outro modo, a inibição da esterase neurotóxica cerebral levando a neurotoxicidade tardia, com característica ataxia e paralisia dos membros, outro dos efeitos que ocorre pela ação de organofosforados como o clorpirifós (Ricciari 2003) dificilmente poderia estar implicada nos efeitos observados, já que em animais como ratos, ela ocorre após 1-4 semanas até poucos meses após a exposição, dependendo do composto utilizado, dose, frequência da exposição e do solvente (Summer et al 1995, Grecco et al 2009). Nos animais experimentais sob exposição ao CPF, os efeitos observados foram mais imediatos, o que indica um efeito mais agudo e rápido como, por exemplo, o que seria resultante da inibição da colinesterase.

Concluindo, os presentes resultados demonstram claramente que a exposição perinatal ao Cd intensificou o efeito do clorpirifós sobre a colinesterase cerebral, o que por sua vez pode ter implicado em neurotoxicidade aumentada. Ação exacerbada sobre o sistema colinérgico nicotínico, responsável pelas respostas neuromusculares provocadas pelo excesso de acetilcolina circulante e a nível cerebral, poderia ser um mecanismo proposto para a potenciação do efeito do clorpirifós observada no grupo exposto simultaneamente a cádmio e clorpirifós. Os resultados obtidos aqui são de extrema importância para a compreensão de fenômenos de intoxicação que acontecem em animais e em humanos já que estes dois níveis estão em contato permanente com rotas de exposição a estes dois agentes químicos. Além da diminuição importante do fator saúde, com aumento da probabilidade de ocorrência de mais e diversificadas doenças, no caso do animal diminuição na produtividade e rentabilidade pecuária também poderia ser observada sob estas condições adversas.

REFERÊNCIAS

- Ali M.M., Murthy R.C. & Chandra S.V. 1986. Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in utero cadmium exposure in rats. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, v.8, p.463–468.
- Ali M.M., Mathur N. & Chandra S.V. 1990. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 28, p. 653-659.

- Aluigi M.G., Angelini C., Falugi C., Fossa R., Genever P., Gallus L., Layer P.G., Prestipino G., Rakonczav Z., Sgro M., Thielecke H. & Trombino S. 2005. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. **Chem.-Biol. Interact.**, v.157-158, p.305-316.
- Amodio-Cochieri R., Fiore P. Lead and cadmium concentration in livestock bred in Campânia., Italy. 1987. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.39(3), p.460-464.
- Antonio M.T., Corredor L. & Leret M.L. 2003. Study of the activity of several enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. **Toxicol. Lett.** v.143, p.331-340.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 2005. Controlando agrotóxicos nos alimentos: o trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AAC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, A FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR E ITEP/PE. Relatórios de atividades 2004. Brasília. Disponível em www.anvisa.gov.br/, acessado em 15/março/2008.
- Barbosa J.D., Oliveira C.M.C., Duarte M.D. & Albernaz T.T. 2005. Intoxicações com manifestações neurológicas em ruminantes. **II Simpósio Mineiro de Buiatria**, Belo Horizonte, MG.
- Barros C.S.L. & Driemeier D. 2007. Intoxicação por organofosforados e carbamatos. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borge J.R.J. (Eds.), **Doenças de Ruminantes e Eqüídeos**. Vol.2. Pallotti Gráfica e Editora, Santa Maria, RS. p.80-85.
- Bhattacharya M.H. 1983. Bioavailability of orally administered cadmium and lead to the mother, foetus and neonate during pregnancy and lactation: an overview. **Sci. Total Environ.**, v.28, p.327- 342.
- Boermans HJ., Black WD., Chesney R , Robb S. 1984. Terbufos poisoning in a dairy herd. **Can. Vet. J.**, v.25, p.335-338.
- Broadhurst P.L. 1960. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, H.J. **Experiments in Personality**. London: Rutledge and Keagan Paul, p. 31-61.
- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.J. & Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v.7, p.88-95.
- Dey S., Swived S.K., Swarup D. 1996. Lead concentration in blood, milk and feed of lactating buffalo after acute lead poisoning. **Vet. Rec.**, v.138, p.336.

- Grecco F.B., Schild A.L., Soares M.P., Raffi M.B., Viéguas E.S. & Damé M.C. 2009. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.29(3), p.211-214.
- Hypponen S., Kohila T. & Tahti H. 1993. The effects of cadmium. **Neurosci. Res. Commun.**, v.12, p.77–84.
- Icenogle L., Christopher N., Blackwelder W., Caldwell D., Quiao D., Seidler T., Slotkin T. & Levin E. 2004. Behavioral alterations in adolescent and adult rats after brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.26, p.95-101.
- Leret M.L., Millán J. A. S. & Antonio M. T. 2003. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. **Toxicology**, v.186, p.125-130.
- Levin E.D., Swain H.A., Donerly S. & Linney E. 2004. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.26, p.719-723.
- Lowry O.H., Rosebrugh N.J., Farr A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-275.
- Lukawski K., Nieradko B. & Sieklucka-Dziuba M. 2005. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.27, p.575-584.
- Marçal W.S., Buture I.O., Carvalho M.C., Fortes M.S., Andrade-Silv, R. 2004. Níveis de chumbo e cádmio em suplementos minerais para bovinos comercializados em Londrina. **Semina: Ciênc. Agrar.**, v.25(4), p.359-364.
- Meyer L. & Caston J. 2005. Repeated stress affect caffeine action on motor coordination in c57b16/j male mice. **Brain Res.**, v.1039, p.171-176.
- Mumtaza M.M., Ruiza P. & De Rosaa C.T. 2007. Toxicity assessment of unintentional exposure to multiple chemicals *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.223(2), p.104-113.
- Nagymajtenyi L., Schulz H. & Desi I. 1997. Behavioural and functional neurotoxicological changes caused by cadmium in a three generational studying rats. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.16, p.691–699.

- Nunez, J.E.V., Amaral-Sobrinho N.M.B., Mazur N. 2006. Sistemas de preparo de solo e acúmulo de metais pesados no solo e na cultura de pimentão (*Capsicum annum*). **Ciênc. Rur.**, v.36(1), p.113-119.
- Osweiler G.D. 1998. Inseticidas e moluscicidas, p.259-282. in: ____ (ed.), **Toxicologia Veterinária**. Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, RS.
- Peyon A. C. 2007. Implementação de um bioindicador para neuropatias tardias induzidas por organofosforados (opdin). Rio de Janeiro. 51 p. **Dissertação (mestrado em ciências)** – Programa de pós-graduação em saúde pública - Escola Nacional de Saúde Pública –Fiocruz.
- Pohl H.R. & Abadin H.G. 2008. Chemical mixtures: Evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.233, p.116–125.
- Radostitis E.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2000. **Veterinary Medicine**. 9th ed. W.B. Saunders, London. 1881p.
- Rice G., MacDonell M, Hertzberg R.C., Teuschler L., Picel K., Butler J., Chang I.S. & Hartmann H. 2008. An approach for assessing human exposures to chemical mixtures in the environment. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v.233, p.126–136.
- Ricceri L., Markina N., Valanzano A., Fortuna S., Cometa M.F., Meneguz A. & Calamandrea G. 2003. Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.191, p.189-201.
- Richardson R.J., Moore T.B., Kayyali U.S., Fowke J.H. & Randall J.C. 1993. Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifos oxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v.20, p.273–279.
- Satarug S., Baker J. R., Urbenjapol S., Haswell-Elkins M., Reilly P., Williams D. J. & Moore M. R. 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. **Toxicol. Lett.**, v.137, p.65-83.
- Sharma RP, Street JC. 1980. Public health aspects of toxic heavy metals in animals feeds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.177(02), p.149 – 153.
- Snedecor G.W. & Cochran W.G. 1980. **Statistical Methods**. 7^a ed. Iowa: Iowa State University Pres, p.593.

- Summers B.A., Cummings J.F. & de Lahunta A. 1995. **Veterinary Neuropathology**. Mosby-Year Books, St Louis, Missouri. 527p.
- Trombini T.V., Pedroso C.G., Ponce D., Almeida A.A. & Godinho A.F. 2001. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at f2 generation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.67, p.743-751.
- Viaene M.K., Masschelein R., Leenders L., De Groof M., Swerts L.J. & Roels H.A. 2000. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. **Occup. Environ. Med.**, v.57, p.19-27.
- Veronesi, A., Cutuli D., Colonmello V., Cardona D., Ricieri L. & Calamandrei G. 2008. Neonatal exposure to clorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.30, p.468-474.
- Yassin A.S. & Martonik J.F. 2004. Urinary cadmium levels in the USA working population, 1988-1994. **J. Occupat. Environ. Hyg.**, v.1, p.324-333.

Quadro 1- Atividade da enzima acetilcolinesterase cerebral em animais expostos ao cádmio e clorpirifós.

Grupo Experimental	(mmoles acetilcolina/mg proteína/min.)	Inibição enzimática (%)
Controle	1,17 ± 0,12 a	0
Clorpirifós	0,72 ± 0,08 bc	38,5
Cádmio	0,81 ± 0,06 b	30,8
Clorpirifós + Cádmio	0,52 ± 0,02 c	55,5

Os valores representam a média ± EPM de 8 animais. Médias seguidas por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

Quadro 2 – Avaliação do comportamento em hole-board, de ratos expostos ao cádmio e clorpirifós. A coordenação motora foi avaliada pela imersão da pata (paw dip) e a exploração foi avaliada pela imersão de cabeça (head dip).

Grupo Experimental	Imersão de Cabeça (escores)	Imersão de pata (escores)
Controle	16,13 ± 1,10 a	1,67 ± 0,21a
Clorpirifós	12,79 ± 0,76 b	3,75 ± 0,028 b
Cádmio	13,13 ± 0,51 b	3,13 ± 0,26 b
Clorpirifós + Cádmio	13,13 ± 0,58 b	6,73 ± 0,41 c

Os valores representam a média ± EPM de 15 animais. Médias seguidas por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

Quadro 3 – Avaliação da atividade locomotora, em arena de campo aberto, de ratos expostos ao cádmio e clorpirifós.

Grupo Experimental	Locomoção (número)
Controle	92,71 ± 8,72 a
Clorpirifós	65,18 ± 7,08 b
Cádmio	61,79 ± 6,44 b
Clorpirifós + Cádmio	51,61 ± 5,07 b

Os valores representam a média ± EPM de 15 animais. Médias seguidas por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (ANOVA).

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão, podem ser enviados pelo correio, em uma via impressa, com arquivos em disquete ou CD (de preferência na versão mais recente do Word), ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Embrapa-CNPAB/PSA, 23890-000 Seropédica, Rio de Janeiro, ou por via eletrônica, através do e-mail pvb@pvb.com.br. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

NOTE: Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista. Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes três últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS:

- a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;
- b) O(s) **autor(es)** deve(m) adotar um “nome de guerra” (não necessariamente o nome de batismo completo), para sua identificação científica: Paulo Fernando de Vargas Peixoto, usa Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V., Franklin Riet-Correa Amaral, usa Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F., Claudio Severo Lombardo de Barros, usa Claudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.;
- c) o **Abstract** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ambos devem ser seguidos de “**Index Terms**” ou “**Termos de Indexação**”, respectivamente;
- d) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;
- e) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
- f) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, devem constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;
- g) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em quadros extensos;
- h) na **Discussão**, os resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;
- i) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;
- j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;
- k) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences) e/ou “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

- a) os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm. **A formatação do original a ser**

submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação no último fascículo da revista (www.pvb.com.br). O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta “Inserir” do Word, pois imagens **copiadas e coladas, perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;**

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo do(s) autor(es) e E-mail do autor para correspondência;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Cit. Fulano 19..)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das **Referências** deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais**, em papel ou outro suporte, **deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor.** A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomendando de a em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

IV – CAPÍTULO II – ARTIGO

Este artigo foi escrito para ser submetido segundo as normas do periódico **Reproductive Toxicology**.

Título:

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO PERINATAL A BAIXA DOSE DE CÁDMIO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PROLE DE RATOS

Márcia Andrade Ávila^a, Carolina Gulyas Figueiredo^b, Antonio Francisco Godinho^{b*}

^aUniversidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

^bUniversidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Instituto de Biociências/ CEATOX, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

* Correspondência para:

Dr. Antonio Francisco Godinho

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Instituto de Biociências/ CEATOX, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

Telefone/fax: +55 14 3815 3048, E-mail: godinho@ibb.unesp.br

Resumo

Exposição ao cádmio (Cd) nas fases pré e pós-natal tem preocupado os pesquisadores, por causa das graves conseqüências que podem ser geradas no indivíduo durante o desenvolvimento fetal ou neonatal respectivamente. Neste sentido, devido à crescente poluição ambiental e ao seu efeito cumulativo, exposição ao cádmio com intoxicação é hoje um problema de saúde pública mundial. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da exposição de ratas prenhes a baixa concentração de cádmio oral, sobre o desenvolvimento físico e sensorio-motor dos filhotes, no período pós-natal. Para tanto, ratas prenhes receberam durante os períodos da gestação e lactação, solução de acetato de cádmio (10mg/l de Cd pela água de beber) ou como controle, solução de acetato de sódio (equimolar ao Cd). Ao nascimento os filhotes foram pesados, separados e reduzidos a oito por mãe e avaliados quanto ao desenvolvimento físico e sensorio motor (reflexos). Observou-se diminuição significativa do ganho de peso corporal depois da primeira semana após o nascimento, que se manteve até a idade adulta dos animais; adiantamento do tempo médio de desaparecimento do reflexo de agarramento palmar e de descida dos testículos; retardamento do aparecimento de pelos. Estes efeitos foram observados simultaneamente à elevação do nível de Cd no sangue e principalmente no cérebro dos filhotes, avaliado no 28º. dia pós-natal (DPN28). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que exposição de filhotes de ratas a baixa dosagem de cádmio durante a gestação e lactação, pode provocar alterações danosas no desenvolvimento físico e sensorio-motor dos animais e até caracterizar o fenômeno do imprinting, ou seja, a manutenção de efeitos danosos na idade adulta mesmo na ausência do agente químico que os provocou.

Palavras chave:

Exposição perinatal, cádmio; desenvolvimento físico; desenvolvimento sensorio-motor; toxicidade; recém-nascido.

Introdução

Nas últimas décadas o nível do metal pesado cádmio tem aumentado muito no meio ambiente (água, solo e ar) por causa da ação antropogênica, provocando um grande aumento da exposição humana e animal [1]Y. Acompanhando os efeitos da crescente industrialização, a exposição ocupacional por cádmio também cresceu exponencialmente, levando este metal a ocupar um lugar de destaque nas questões de saúde pública, quando se trata de intoxicação por metais pesados [2], provocando aumento progressivo das pesquisas sobre as conseqüências da exposição ao Cd, despertando o interesse pelo seu potencial toxicológico. Ele produz inúmeras desordens relacionadas à saúde dos indivíduos, ocorrendo desde tumores no pulmão, disfunção renal e hepática, até deficiências neurológicas graves [3]. O sistema reprodutor masculino também pode ser particularmente afetado pelo cádmio uma vez que o metal pesado pode funcionar como um desregulador endócrino modificando a função reprodutiva e interferir com a qualidade do sêmen [4]. Evidências experimentais recentes sugerem que exposição à baixa concentração de cádmio do meio ambiente, induz mutação e dano no DNA, o que diminui a estabilidade genética inibindo o reparo endógeno e exógeno das lesões no DNA levando, em conseqüência, ao aumento da probabilidade de mutações e, por conseguinte a iniciação do câncer [5].

Como resultado das emissões industriais e por causa da contaminação dos fertilizantes utilizados nas plantações, no século XX tem aumentado bastante a concentração do cádmio no solo, implicando em uma maior retenção pelos vegetais [2], que serão utilizados pelos animais e/ou homem, inclusive como alimentos. Por ser distribuído através do contato com o solo, o cádmio aparece nas folhas da planta de tabaco [6,7] e tem sido observado que fumantes de cigarro possuem elevada carga de cádmio no corpo, duas vezes mais do que não fumantes [8]. Considerando os efeitos neurocomportamentais em longo prazo, da exposição ao cádmio in útero [9], o hábito de fumar em mulheres grávidas, o qual foi relatado ser maior que 20% na América do norte [10], contribui para a transferência do cádmio através do sangue fetal e leite materno [11] e o aparecimento de sérios problemas em saúde pública, relacionados ao desenvolvimento dos filhos de mães com adição para o tabaco.

É bem conhecido que a placenta acumula cádmio e que este atravessa, da mãe para o feto e se acumula nos tecidos fetais durante a gestação [12]. Esse toxicante

também é ofertado através do leite durante a lactação [13,14,11]. Visto que absorção gastrointestinal pode ser aumentada durante este período, junto com absorção aumentada de cálcio, praticamente todo o cádmio ingerido no leite contaminado é absorvido pelos filhotes. Apesar da existência de trabalhos documentando efeitos da exposição perinatal ao cádmio, pouco se sabe ainda a respeito das conseqüências sobre o desenvolvimento do sistema nervoso [15,16], ao longo da vida do indivíduo.

Estudos indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto [17,18]. Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração [17]. Todos estes efeitos são provavelmente conseqüências da exposição ao metal pesado ou na fase de desenvolvimento uterino ou depois, no desenvolvimento neonatal.

Por ter efeito cumulativo no organismo humano e animal, quando existe a exposição contínua mesmo a baixas doses de Cd, ocorrem efeitos graduais que alteram a homeostasia dos organismos podendo culminar com seqüelas permanentes e uma incidência diversa e mais alta de doenças [13]. A exposição na fase jovem da vida do indivíduo gera mais preocupação, pelo fato deste metal ser retido em maior escala no organismo jovem que no adulto e talvez, por isso, provoque maiores conseqüências [13, 9]. Neste sentido, estudos experimentais que mimetizam a situação de exposição perinatal são importantes, pois podem trazer uma maior compreensão dos efeitos do cádmio sobre o desenvolvimento e as conseqüências a curto e longo prazo na vida dos indivíduos os quais são expostos já na fase uterina.

Este trabalho investigou o desenvolvimento da prole jovem de ratas expostas no período da gestação e lactação, a baixa concentração de cádmio por via oral.

Material e Métodos

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar obtidos da colônia do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Durante as fases de adaptação, crescimento e experimental, os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura e umidade relativa,

ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo líquido e ração sem restrição.

O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEAA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP de Botucatu.

Aos 80 dias de idade a fêmeas foram acasaladas, colocando-se na mesma gaiola 3 fêmeas com 1 macho; as fêmeas foram consideradas fecundadas, quando encontrados espermatozóides no líquido do lavado vaginal (considerado o dia zero do acasalamento). As fêmeas consideradas prenhes foram colocadas individualmente em gaiolas e, durante todo o período de gestação passaram a receber *ad libitum* solução de acetato de cádmio (Cd) (Synth-Brasil) em água destilada (10 mg de Cd⁺⁺/litro) ou de acetato de sódio (Dinâmica-Brasil) como controle (Ct) em água destilada (solução equimolar à de acetato de cádmio). Neste período as mães foram avaliadas quanto ao peso corporal, ingesta de líquido e ração (uma vez por semana), alterações de comportamento e possível sintomatologia.

Ao nascimento, os filhotes foram contados, pesados e observados quanto a alterações físicas macroscópicas grosseiras e as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes por mãe (5-6 machos). As soluções de cádmio e controle continuaram sendo administradas às mães durante todo o período da lactação. Os filhotes foram mantidos junto com as mães até o 21º. dia de idade (DPN21) e depois separados em grupos de 15 filhotes, sendo para isto utilizado um filhote de cada mãe, para evitar tendências provindas da ninhada que pudessem mascarar ou deturpar os resultados obtidos para cada grupo experimental.

Avaliação das mães

Durante os períodos da gestação e lactação foi avaliado semanalmente nas fêmeas expostas ao Cd, o ganho peso corporal, o volume de ingesta de líquidos e ração e o comportamento das nas gaiolas, comparando-se com os dados obtidos junto aos animais controle.

Avaliação dos filhotes

Desenvolvimento físico:

Ao nascimento os animais foram pesados, e nas primeiras semanas do desenvolvimento pós-natal, examinados para ganho de peso corporal (o peso dos animais foi verificado

uma vez por semana, nas primeiras quatro semanas do desenvolvimento dos filhotes e depois no DPN80) e para o período de tempo (dias) em que ocorreu erupção dos incisivos, abertura de olhos, aparecimento de pelos, desdobramento de orelhas e descida dos testículos [19].

Desenvolvimento sensório-motor:

Do DPN1 ao DPN10 os animais foram examinados diariamente para se obter o período de tempo (dias) para o aparecimento dos reflexos de geotaxia negativa e postural, e para o desaparecimento do reflexo de preensão palmar [19].

Dosagem de cádmio tecidual:

Ao DPN28 cada animal dos grupos controle e expostos ao cádmio foi anestesiado com pentobarbital sódico para coleta de sangue por punção cardíaca direta e em seguida, eutanaziado com excesso do anestésico, o cérebro foi removido, pesado e utilizado, juntamente com o sangue total, para dosar o cádmio tecidual. A dosagem foi feita através da técnica de espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se espectrofotômetro E.A.A. – GBC 932 AA [20] Athasanopoulos 1994.

Análise Estatística dos resultados obtidos:

Os dados obtidos no presente experimento foram comparados através do teste *t* de Student's, bi caudal, e as diferenças foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) [21].

Resultados

Avaliação das mães

No presente trabalho, durante os períodos da gestação e lactação, não foram observadas variações no peso corporal das mães, no volume de ingesta de líquidos e ração e no comportamento, com relação aos controles (dados não mostrados). Nenhum sinal ou sintoma clínico de intoxicação foi observado no mesmo período nas mães recebendo acetato de cádmio.

Avaliação dos filhotes

Desenvolvimento somático:

A figura 1 mostra o ganho de peso corporal dos filhotes controle e de filhotes de ratas expostas ao Cd durante os períodos de gestação e lactação. Observa-se inicialmente que os animais controle e expostos ao Cd não tiveram diferença de peso ao nascimento, mas houve diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no ganho de peso corporal dos filhotes de mães expostas ao cádmio, a partir da segunda semana de vida e que perdurou até a idade adulta dos animais (PND80).

A tabela 1 mostra o desenvolvimento somático dos filhotes controle e de filhotes de ratas expostas ao Cd durante os períodos de gestação e lactação. Observa-se que houve retardamento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no tempo médio de aparecimento de pelos e adiantamento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no tempo médio de descida dos testículos nos filhotes expostos ao Cd, em relação aos animais controles. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos controle e exposto ao Cd.

Desenvolvimento sensório-motor:

A tabela 2 mostra o desenvolvimento sensório-motor dos filhotes controle e de filhotes de ratas expostas ao Cd durante os períodos de gestação e lactação. Observa-se que o tempo médio para o desaparecimento do reflexo de preensão palmar foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos filhotes de mães expostas ao Cd, em relação aos animais controle. Os reflexos de geotaxia negativa e postural não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos controle e exposto ao Cd.

Dosagem de cádmio tecidual:

A figura 2 mostra os valores da dosagem de cádmio nos sangue e cérebro de filhotes (DPN28) de ratas controles e de ratas expostas ao Cd durante os períodos de gestação e lactação. Observa-se a presença aumentada do Cd tanto no sangue quanto no cérebro dos filhotes de mães expostas perinatalmente ao metal. A dosagem de Cd nos filhotes controle não revelou a presença do metal nem no sangue nem no cérebro dos animais.

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a exposição gestacional ao Cd não promoveu toxicidade materna ou fetal porque nenhuma diferença no ganho de peso materno ou dos filhotes, ao nascimento, foi observada entre animais controle e

experimentais. Um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso [22]. Assim, alterações na homeostase materna, a qual poderia indiretamente interferir com o desenvolvimento dos filhotes [23,24], não seria provavelmente a responsável por qualquer efeito posterior que pudesse ser observado, devido à exposição ao Cd.

Já outros autores [25] utilizando ratas prenhes expostas no período gestacional ao CdCl₂ pela água de beber (3,15,30 e 50ppm de Cd), não tiveram alteração do ganho de peso semanal das mães mas encontraram diminuição do peso dos filhotes ao nascimento, com a maior dose utilizada. Este dado é conflitante com os achados do presente experimento, porém esta dose de 50 ppm de Cd utilizada por estes autores, é cinco vezes maior que a utilizada em nossos experimentos, o que explica um maior nível de toxicidade nos filhotes obtido por estes autores.

O resultado da avaliação do ganho de peso semanal dos animais mostrou que os animais expostos ao cádmio in útero nasceram com o mesmo peso dos animais controle e, em seguida, tiveram uma redução de peso ao longo do seu desenvolvimento, já a partir da primeira semana de vida e perdurando até a idade adulta, independentemente da presença do metal pesado. Este fenômeno da exposição a substâncias químicas com efeitos hormonais que atingem o organismo durante o período fetal ou nos primeiros anos de vida pós-natal, provocando mudanças na diferenciação em tipos celulares, em seu período de desenvolvimento crítico, com aparecimento de efeitos deletérios que são mantidos até a idade adulta, independentemente da presença da substância que o provocou, tem sido caracterizado como imprinting [26,27]. A manutenção da redução do ganho de peso no grupo de filhotes expostos maternalmente ao Cd, pode sugerir o imprinting nestes animais.

Talvez os fatos dos filhotes começarem a receber o Cd pelo leite materno e do número de filhotes de cada ninhada ter sido reduzido para oito, logo após o nascimento para homogeneizar o número de filhotes por mãe, tenham feito com que cada filhote passasse a receber um percentual maior de cádmio através do leite materno aumentando assim os efeitos deletérios da exposição. A dosagem tecidual de Cd corrobora com essa hipótese uma vez que animais no DPN28 tem cádmio circulante aumentado e também acumulado no tecido cerebral, como foi observado. Se nós considerarmos a toxicidade pelo Cd como um fator dependente de sua presença no sangue circulante ou de seu acúmulo no cérebro, nosso resultado com a dosagem de Cd nos tecidos dos filhotes ao DPN28 mostram que o protocolo utilizado para a exposição ao Cd utilizado neste estudo é um bom e efetivo modelo para exposição do sistema nervoso dos animais em

desenvolvimento. Assim como observado no fígado e rim [28], um alto teor de metalotioneínas no cérebro poderia ser responsável pelo acúmulo do Cd no sistema nervoso dos animais.

Outros autores [29] observaram que ratas jovens recebendo exposição subcrônica de Cd pela ração, tiveram alteração dos níveis de metais essenciais estocados no fígado, de acordo com o nível de Cd: ferro, magnésio e selênio diminuíram, entretanto cobre, zinco e manganês aumentaram com aumentados níveis de Cd. A preocupação neste caso é que metais essenciais participam de reações de óxido redução, e também como cofatores metálicos para reações enzimáticas para síntese de moléculas endógenas e reações metabólicas. Além disso, depleção de estoques de ferro pelo Cd poderia estar associado a risco aumentado de osteoporose pelo cádmio [29]. De modo semelhante ao observado por nós, quando utilizaram uma dosagem baixa de CdCl₂ (10ppm) na dieta, neste trabalho, os autores também encontraram baixo nível de Cd no sangue e altos níveis no fígado dos animais, um tecido também de estocagem como o cérebro, utilizado por nós para dosagem do Cd tecidual.

Efeitos pós-natais mediados por agentes encontrados no leite materno ou provocados por negligência materna na manipulação dos filhotes podem provocar desenvolvimento físico alterado nos filhotes [24]. Entretanto, qualquer tratamento experimental das mães pode levar a efeitos pré-natais diretamente sobre o feto, através da transferência de moléculas através da placenta, ou indiretamente por interferência com a função placentária. Geralmente esses efeitos são manifestados como anormalidades do peso corporal ou fetal [30]. É importante observar que no embrião prematuro de roedores, os toxicantes da circulação uterina entram pela cavidade exocelômica e podem ser absorvidos por endocitose e transferidos para o embrião, via vasos vitelinos [31]. Aparentemente, com a baixa dose utilizada no nosso experimento, apesar da possibilidade do Cd ter sido transferido para os filhotes por via placentar/fetária, os filhotes além de não apresentarem alterações de peso, não apresentaram deformidades ao nascimento, sugerindo que *in útero* não ocorreu toxicidade. Provavelmente então, os efeitos observados nos filhotes após o nascimento se devem ao Cd recebido via leite materno.

Uma extensa revisão foi feita relacionando químicos ambientais com os distúrbios dos níveis de glucocorticóides e mineralocorticóides e as conseqüências geradas por este tipo de desregulação endócrina provocada [32]. Segundo estes autores, o prejuízo das atividades de glucocorticóides e mineralocorticóides pode contribuir para

o aparecimento e o agravamento de vários problemas de saúde, incluindo doenças neurológicas, desordens imunológicas e síndromes metabólicas.

Por outro lado, os animais recebendo o Cd tiveram redução no tempo de desaparecimento do reflexo palmar e tempo de descida de testículos e atraso no tempo de aparecimento de pelos, sugerindo que o cádmio pode ter provocado alterações endócrinas. Atuação do Cd como desregulador endócrino tem sido bem documentada recentemente [33, 34] e a atuação do metal sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e nível de glucocorticóides pode provocar alterações tanto ao nascimento, quanto durante o desenvolvimento e posteriormente na vida adulta [35,24]. A redução do tempo de descida do testículo em filhotes expostos ao cádmio, encontrado aqui, também foi observado por outros autores [23] utilizando uma dose sub-teratogênica de cádmio a ratas prenhes, entre o dias 6 e 14 da gestação. Apesar da alta dosagem de Cd utilizada (20mg/kg/dia) neste estudo, foi o único parâmetro que foi alterado pela exposição ao metal pesado.

Maturação sexual em ratos machos resulta de interações complexas entre o hipotálamo, pituitária anterior e órgãos sexuais secundários [36]. Desenvolvimento da puberdade, um processo dependente de atividades de hormônios liberadores de gonadotrofina, é um processo de maturação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadas, resultando em crescimento e desenvolvimento de órgãos genitais e, concomitantemente, em mudanças físicas e psicológicas em direção a idade adulta e ao ápice da capacidade reprodutiva. Um número de diferentes estudos tem mostrado que Cd modifica o nível plasmático dos hormônios da puberdade, luteinizante e folículo estimulante [37,38, 39]. Assim, exposição ao Cd poderia ser crítica ao processo normal de desenvolvimento da puberdade. Esses fatos poderiam explicar o efeito sobre a descida do testículo observada neste estudo.

Estudos prévios mostraram que três sistemas periféricos podem estar envolvidos na regulação dos ajustamentos posturais, incluindo os sistemas vestibular, exteroceptivo (por exemplo, tato) e o proprioceptivo [40]. As funções do sistema vestibular ao nascimento são modificadas por imaturidade do sistema motor. O reflexo de endireitamento e as respostas de geotaxia dos filhotes refletem ambos, desenvolvimento motor e atividade dirigida pelo sistema vestibular [23]. No presente estudo, exposição perinatal ao Cd adiantou a perda do reflexo de preensão palmar, mas não modificou os reflexos de geotaxia e postural. Os reflexos de geotaxia negativa e o postural são duas das respostas refletindo uma função dos sistemas cerebelar e

vestibular [41] e eles são envolvidos com a relação espacial do animal [42]. O reflexo de agarrar é um reflexo motor que envolve maturação do SNC e sistema nervoso periférico dos animais, porém existem poucos dados disponíveis descrevendo o desenvolvimento deste reflexo [43]. O adiantamento do desaparecimento deste reflexo sugere que o Cd exerceu efeito sobre a maturação do sistema nervoso desses animais, mas estudos posteriores são necessários para examinar esta noção, mais especificamente.

Concluindo, os resultados obtidos no presente estudo indicam que exposição de filhotes de ratas a baixa dose de cádmio durante a gestação e lactação, pode provocar alterações danosas no desenvolvimento físico e sensorio-motor dos animais e até caracterizar o fenômeno do imprinting. Estes dados vêm de encontro ao que é discutido no mundo todo, que é a grande preocupação expressada pelos toxicologistas com os efeitos de toxicidade provocados pela exposição a agentes químicos na fase pré-natal ou durante o período de desenvolvimento do recém nascido.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. Alaor Aparecido Almeida, do CEATOX, pela dosagem de cádmio tecidual.

Referências

- [1] Yassin AS, Martonik JF. Urinary cadmium levels in the US working population, 1988-1994. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*. 2004, 1:324-333.
- [2] Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-elkins M, Reilly P, Williams DJ, Moore MR. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 2003, 37:65-83.
- [3] Waalkes MP, Misra RR. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: L.W. Chang editors. *Toxicology of Metals*. Boca Raton, CRC Press. Inc., 1996, 241-244.

- [4] Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental Health Perspectives* 2000,108: 45-53.
- [5] Filipic M, Fatur T, Vudrag M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Humam and Experimental Toxicology* 2006, 25:67-77.
- [6] Bachelet M, Pinot F, Polla RI, Francois D, Richard MJ, Vayssier-Taussat M, et al. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radical Research* 2002,36:99–106.
- [7] Yue L. Cadmium in tobacco. *Biomedical Environmental Sciences* 1992, 5:53–6.
- [8] Wu D, Landsberger S, Larson SM. Evaluation of elemental cadmium as a marker for environmental tobacco smoke. *Environmental Sciences and Technology* 1995, 29:2310–2316.
- [9] Ali MM, Murthy RC, Chandra SV. Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in utero cadmium exposure in rats. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 1986, 8:463–8.
- [10] National Institutes of Health. National pregnancy & health survey: drug use among women delivering live births, 1992. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, 1996.
- [11] Radisch B, Luck W, Nau H. Cadmium concentrations in milk and blood of smoking mothers *Toxicology Letters* 1987, 36:147-152.
- [12] Sorel TL, Graciano JH. Effect of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and fetal zinc metabolism in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1990, 102: 537–545.

- [13] Battacharayya MH. Bioavailability of orally administered cadmium and lead to the mother, fetus and neonate during pregnancy and lactation: An overview. *Science of the Total Environment* 1983, 28:327-342.
- [14] Palminger and Askarson, 1993.
- [15] Hypponen, S, Kohila T, Tahti, H. The effects of cadmium. *Neurosciences Research Communications* v.12, p.77–84, 1993.
- [16] Nagymajtenyi L, Schulz H, Desi L. Behavioural and functional neurotoxicological changes caused by cadmium in a three-generational study in rats. *Human and Experimental Toxicology* 1997, 16: 691-699
- [17] Viaene MK, Massachelein R, Leenders L, De Groof M, Swerts LJ, Roels HA. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occupational and Environmental Medicine* 2000, 57:19-27.
- [18] Leret ML, Millan JAS, Antonio MT. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology* 2003, 186:125-130.
- [19] Alder S, Zbinden G. Methods for the evaluation of physical, neuromuscular and behavior development of rats in early postnatal period. In: Neubert D, Merker HJ, Kwasigroch TE, editors. *Methods in prenatal toxicology*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 1977, 175–185.
- [20] Athanasopoulos N. Flame methods: Manual GBC for atomic absorption. Victoria, Australia, 1-11, 1994.
- [21] Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 7th edn. Iowa State University Press, Ames, IA. 1980.
- [22] Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological

significance of the “no observed adverse effect level”. *Reproductive Toxicology* 2008, 25:192–202.

[23] Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Research* 1971, 28:85-95.

[24] Salvatori F, Talasi CB, Salzgeber, SA, Spinosa HS, Bernardi, MM. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 2004, 26:673-680.

[25] Ronco AM, Urrutia M, Montenegro M, Llanos MN. Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. *Toxicology Letters* 2009, 188:186–191.

[26] Csaba G, Inczeffi-Gonda A, Karabélyos CS, Pap E. Hormonal imprinting: neonatal treatment of rat with the peroxisomes Clofibrate irreversibly affects sexual behavior. *Physiology and Behavior* 1995, 58:1203-1207.

[27] Tchernitchin AN, Tchernitchin N, Mena MA, Unda C, Soto J. Imprinting: perinatal exposures cause the development of disease during the adult age. *Acta Biologica Hungarica* 1999, 50: 425-440.

[28] Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, doi:10.1016/j.taap.2009.03.015

[29] Noel L, Guérin T, Kolf-Clauw M. Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food and Chemical Toxicology* 2004, 42:1203–1210.

[30] Dorce ALC, et al. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. *Reproductive Toxicology* 2009, doi:10.1016/j.reprotox.2009.04.008.

- [31] Carney EW, Scialli AR, Watson RE, De Sesso JM. Mechanisms regulating toxicant disposition to the embryo during early pregnancy: an interspecies comparison. *Birth Defects Research Part C Embryo Today* 2004, 72:345–360.
- [32] Odermatt A, Gumy C. Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals? *Biochemical Pharmacology* 2008, 76:1184–1193.
- [33] Takiguchi M, Yoshihara S. New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environmental Sciences* 2006, 13:107–116.
- [34] Zhang W, Pang F, Huang Y, Yan P, Lin W. Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicology Letters* 2008, 182:18–23.
- [35] Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal programming of adult pathophysiology. *National Clinical Practice Endocrinology and Metabolism* 2007, 3:479–488.
- [36] Smith ER, Damassa DA, Davidson JM. Feedback regulation and male puberty: testosterone luteinizing hormone relationship in the developing male rat. *Endocrinology* 1977, 101:173-180.
- [37] Zylber-haran EA, Gershman H, Rosenmaa E, Spitz IM. Gonadotrophin, testosterone and prolactin interrelationships in cadmium treated rats. *Journal of Endocrinology* 1982, 92:123-140.
- [38] Paksy K, Varga B, Horwath E, Tatrai E, Ungvary G. Acute effects of cadmium on preovulatory serum FSH, LH and prolactin levels on ovulation and ovarian hormone secretion in estrus rats. *Reproductive Toxicology* 1989, 3:241-247.
- [39] Clark JT, Jimenez B, Evans R, Barrow R, Winfree k, Morteck JJ. Cadmium-induced sexual dysfunction does not involve increased hepatic metabolism of testosterone nor increased circulating levels of corticosterone. *Physiological Behavior* 1994, 56(5):975-981.

[40] Altman J, Sudarshan k. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behavior* 1975, 23:896-920.

[41] Secher T, Novitskaia V, Berezin V, Bock E, Glenthøj B, Klementiev BA. Neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGLpeptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. *Neuroscience* 2006,141:1289–99.

[42] Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Developmental Brain Research* 2004,149:85–92.

[43] Wood SL, Beyer BK, Cappon GD. Species comparison of postnatal CNS development: functional measures. *Birth Defects Research B Developmental and Reproductive Toxicology* 2003, 68:391–407.

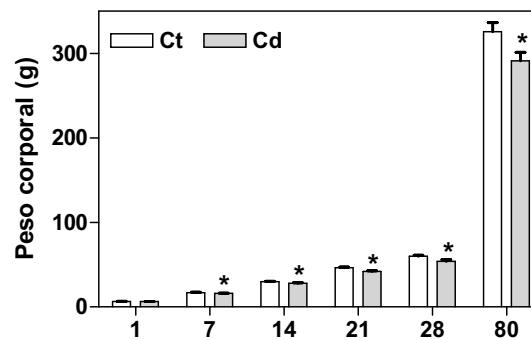


Figura 1 – Ganho de peso corporal em filhotes de ratas expostas ao cádmio nos períodos da gestação e lactação. Os valores representam a média \pm E.P.M. obtida com filhotes de 10 a 15 ninhadas por grupo experimental. * diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (teste t de Student's).

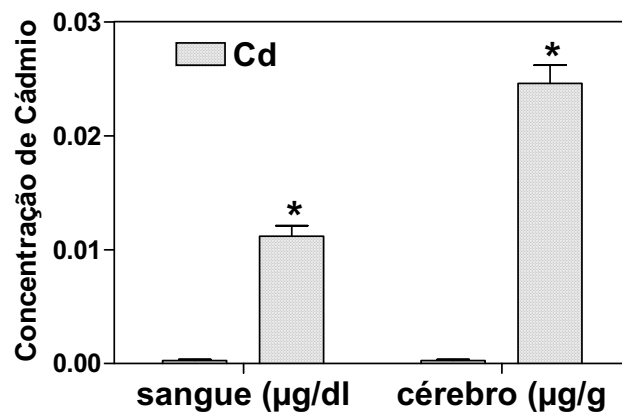


Figura 2 – Dosagem de cádmio em sangue e cérebro de filhotes (DPN28) de ratas expostas ao cádmio nos períodos da gestação e lactação. Os valores representam a média \pm E.P.M. obtida com filhotes de 8 a 10 ninhadas por grupo experimental. * estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (teste t de Student's).

Tabela 1- Desenvolvimento físico ou somático em filhotes de ratas expostas ao cádmio nos períodos da gestação e lactação.

Característica	Ct	Cd
Abertura de olhos	11,72±0,06 a	11,12±0,08 a
Erupção de incisivos	5,41±0,17 a	5,53±0,23 a
Aparecimento de pelos	7,07±0,18 a	7,84±0,21 b
Desdobramento de orelhas	3,67±0,13 a	3,79±0,18 a
Descida dos testículos	17,74±0,42 a	16,51±0,29 b

Os valores representam a média ± E.P.M. obtida com filhotes de 10 a 15 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (Teste t de Student's).

Tabela 2- Desenvolvimento sensório-motor (reflexos) em filhotes de ratas expostas ao cádmio nos períodos da gestação e lactação.

Reflexos	Ct	Cd
Geotaxia negativa	8,52±0,19 a	8,95±0,19 a
Preensão palmar*	4,09±0,13 a	3,01±0,28 b
Postural	4,44±0,13 a	4,68±0,28 a

Os valores representam a média ± E.P.M. obtida com filhotes de 10 a 15 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (Teste *t* de Student's). *Em ratos, o reflexo de preensão palmar está presente ao nascimento e desaparece durante crescimento e desenvolvimento, ao contrário dos outros dois que são adquiridos durante o crescimento e desenvolvimento.

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY – GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Drawing from a large number of disciplines, *Reproductive Toxicology* publishes timely, original research on the influence of chemical and physical agents on reproduction. Written by and for obstetricians, pediatricians, embryologists, teratologists, geneticists, toxicologists, andrologists, and others interested in detecting potential reproductive hazards, the journal is a forum for communication among researchers and practitioners. Articles focus on the application of in vitro, animal and clinical research to the practice of clinical medicine.

All aspects of reproduction are within the scope of *Reproductive Toxicology*, including the formation and maturation of male and female gametes, sexual function, the events surrounding the fusion of gametes and the development of the fertilized ovum, nourishment and transport of the conceptus within the genital tract, implantation, embryogenesis, intrauterine growth, placentation and placental function, parturition, lactation and neonatal survival. Adverse reproductive effects in males will be considered as significant as adverse effects occurring in females. To provide a balanced presentation of approaches, equal emphasis will be given to clinical and animal or in vitro work. Typical end points that will be studied by contributors include infertility, sexual dysfunction, spontaneous abortion, malformations, abnormal histogenesis, stillbirth, intrauterine growth retardation, prematurity, behavioral abnormalities, and perinatal mortality.

Types of paper

In addition to original research articles, *Reproductive Toxicology* also publishes interpretative review articles, editorials, letters, book reviews, and conference announcements. The first section of each issue of the journal is devoted to an in-depth, timely review of research on the effect of particular chemical or physical agents on reproduction. Potential authors are encouraged to contact the Editor-in-Chief before submitting such a review.

Page charges

This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Reproductive Toxicology requires full disclosure of all potential conflicts of interest. At the end of the manuscript text (and in the cover letter of the manuscript), under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest." Signed copies of the *Reproductive Toxicology* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript. The corresponding author is responsible for sharing this document with all co-authors. Each and every co-author must sign an individual disclosure form. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Acknowledgements. All sources of funding supporting the work are to be declared. Authors are to disclose all financial relationships with any persons or organizations that could be perceived to bias the work described in the manuscript. These acknowledgements should be placed after the text and before the references, under the heading "Acknowledgements". In submitting the article for consideration for publication, the author(s) attest that all potential conflicts of interest have been disclosed and addressed in the manuscript.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles

including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy:

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after final publication. Please e-mail us at NIHauthorrequest@elsevier.com that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as name and e-mail address of the Principal Investigator(s) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections

should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that

author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should contain no more than 150 words.**

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 8 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build

footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these

illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-934) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article

prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at 

<http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance


Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from 

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on

how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

V – CAPÍTULO III – ARTIGO

Este artigo foi escrito para ser submetido segundo as normas do periódico **Life Sciences**.

Título:

DESENVOLVIMENTO COMPORTAMENTAL DE RATOS EXPOSTOS NO PERÍODO PERINATAL AO CÁDMIO E NA INFÂNCIA AO CLORPIRIFÓS.

Márcia Andrade Ávila^a, Carolina Gulyas Figueiredo^b, Antonio Francisco Godinho^{b*}

^aUniversidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

^bUniversidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Instituto de Biociências/ CEATOX, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

* Correspondência para:

Dr. Antonio Francisco Godinho

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu/ Instituto de Biociências/ CEATOX, CEP 18618-000, Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil.

Telefone/fax: +55 14 3815 3048, E-mail: godinho@ibb.unesp.br

Resumo

Objetivos: investigar em ratos, as conseqüências neurocomportamentais da exposição perinatal a baixa concentração de cádmio, e a interação com os efeitos da administração subsequente de clorpirifós aos filhotes em desenvolvimento, na fase da infância.

Principais métodos: fêmeas prenhes receberam acetato de cádmio (10ppm de Cd pela água de beber) durante a gestação e lactação. Do 21º. ao 27º. dias de idade (DPN21-27) os filhotes receberam administração oral de clorpirifós (30mg/kg de CPF, gavagem) uma vez ao dia. Ao DPN28 e DPN80, o comportamento geral dos filhotes foi testado em arena de campo aberto (ACA) e o comportamento de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE). Outro grupo de filhotes foi testado para o comportamento de agressividade segundo o paradigma do rato residente/intruso.

Principais achados: Na ACA, Cd e CPF sozinhos diminuíram locomoção e levantar no DPN28; quando juntos, além da diminuírem locomoção e levantar, aumentaram o congelamento e limpeza tanto no DPN28 quanto no DPN80. No LCE, Cd e CPF sozinhos diminuíram entradas e permanência nos braços abertos e aumentaram nos fechados no DPN28; quando juntos, intensificaram este comportamento no DPN28 e mantiveram no DPN80. O comportamento de agressividade não foi modificado por Cd ou CPF sozinhos, porém quando juntos, provocaram agressividade aumentada nos animais.

Significância: Tanto exposição perinatal ao Cd quanto neonatal ao CPF são capazes de provocar, isoladamente, efeitos comportamentais nos filhotes jovens no DPN28. Quando estes tratamentos são associados, ocorre interação com intensificação da toxicidade comportamental que se mantém até a idade adulta dos animais. O provável efeito de desregulação endócrina e os neurotransmissores possivelmente envolvidos são discutidos.

Palavras chave: exposição perinatal e neonatal; cádmio; clorpirifós; atividade neurocomportamental; interação entre agentes químicos; arena de campo aberto; labirinto em cruz elevado; agressividade.

Introdução

Nas últimas décadas houve um aumento progressivo das pesquisas sobre as conseqüências da exposição ao metal pesado cádmio, despertando o interesse pelo seu potencial toxicológico. Ele produz inúmeras desordens relacionadas à saúde dos indivíduos, ocorrendo desde tumores no pulmão, disfunção renal e hepática, até deficiências neurológicas graves (Waalkes and Misra, 1996). O sistema reprodutor masculino também pode ser particularmente afetado pelo cádmio uma vez que o metal pesado pode funcionar como um desregulador endócrino modificando a função reprodutiva e interferir com a qualidade do sêmen (Telisman et al. 2000). Evidências experimentais recentes sugerem que exposição à baixa concentração de cádmio do meio ambiente, induz mutação e dano no DNA, o que diminui a estabilidade genética inibindo o reparo endógeno e exógeno das lesões no DNA levando, em conseqüência, ao aumento da probabilidade de mutações e, por conseguinte a iniciação do câncer (Filipic et al. 2006).

Como resultado das emissões industriais e por causa da contaminação dos fertilizantes utilizados nas plantações, no século XX tem aumentado bastante a concentração do cádmio no solo, implicando em uma maior retenção pelos vegetais (Ssatarug et al. 2003), que serão utilizados pelos animais e/ou homem, inclusive como alimentos. Por ser distribuído através do contato com o solo, o cádmio aparece nas folhas da planta de tabaco (Bachelet et al. 2002; Yue, 1992) e tem sido observado que fumantes de tabaco possuem elevada carga de cádmio no corpo, duas vezes mais do que não fumantes (Wu and Larson 1995). Considerando os efeitos neurocomportamentais em longo prazo, da exposição ao cádmio in útero (Ali et al. 1986), o hábito de fumar em mulheres grávidas, o qual foi relatado ser maior que 20% na América do norte (National Institutes of Health 1996), contribui para o aparecimento de sérios problemas em saúde pública, relacionados ao desenvolvimento dos filhos de mães com adição para o tabaco.

É bem conhecido que a placenta acumula cádmio e que este atravessa, da mãe para o feto e se acumula nos tecidos fetais durante a gestação (Sorell and Graciano 1990). Esse toxicante também é ofertado através do leite durante a lactação (Bhattacharyya 1983). Visto que absorção gastrointestinal pode ser aumentada durante este período, junto com absorção aumentada de cálcio, praticamente todo o cádmio ingerido no leite contaminado é absorvido pelos filhotes. Apesar da existência de

trabalhos documentando efeitos da exposição perinatal ao cádmio, pouco se sabe ainda a respeito das conseqüências sobre o sistema nervoso central (Hypponen et al. 1993; Nagymajtenyi et al. 1997), ao longo da vida do indivíduo e, menos ainda, sobre as interações possíveis de ocorrer com outras substâncias químicas, ao nível desse mesmo sistema, nos indivíduos expostos perinatalmente.

Estudos indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (Viaene et al. 2000; Leret et al. 2003). Em trabalhadores expostos ocupacionalmente dificulta a funcionalidade visual motora, promove alterações de equilíbrio emocional e prejudica a concentração (Viaene et al. 2000).

Avaliação de exposição a agentes químicos múltiplos envolve avaliação crítica de dados sobre o ambiente e efeitos sobre a saúde, os quais incluem dados toxicológicos, experimentais e laboratoriais, ocupacionais e informação epidemiológica (Mumtaza et al. 2007). Devido ao grande número dos toxicantes distribuídos no meio ambiente por ação antropogênica, multiexposição a agentes químicos potencialmente tóxicos e interações toxicológicas decorrentes podem ser esperadas, porém, poucos estudos experimentais existem neste sentido. Mais especificamente, interações relatadas entre exposição ao cádmio e a outros toxicantes disseminados no meio ambiente como, por exemplo, inseticidas organofosforados, poderiam elevar o potencial de intoxicação devido às interações danosas que poderiam ocorrer nos organismos animal e humano.

Clorpirifós é um dos inseticidas organofosforados amplamente utilizado, o qual induz toxicidade por inibir a enzima acetilcolinesterase (Ache), a molécula chave na transmissão colinérgica, no sistema nervoso central e periférico (Qiao et al. 2001; Riccieri et al. 2003). Nos anos recentes o CPF tem substituído muitos outros organofosforados devido sua relativa segurança e persistência, contudo o potencial de provocar efeitos danosos sobre a saúde associado com exposição humana tem sido objeto de sérias discussões, principalmente quando neonatos ou indivíduos jovens são atingidos (Dam et al. 2000; Carr et al. 2001)

Tem sido demonstrado que CPF pode causar neurotoxicidade em organismos em desenvolvimento, com prejuízos à capacidade de memória, atividade locomotora e funcionamento de sistemas cerebrais (Icenogle et al. 2004; Levin et al. 2004). Levin et

al. (2004) mostraram em ratos, que a exposição pré-natal ao CPF causa persistentes efeitos comportamentais, principalmente diminuição da capacidade de memória e alterações da atividade locomotora. Estes autores mostraram que estes efeitos comportamentais estão relacionados a prejuízos afetando a replicação celular e interrupção de uma variedade de sistemas cerebrais, e os mesmos persistem desde o estágio jovem até a vida adulta do indivíduo. Icenogle et al. (2004) demonstraram alterações neurocomportamentais em ratos adolescentes e adultos os quais sofreram exposição à dose subtóxica de CPF no período de neurulação.

Outros autores demonstraram que num período neonatal crítico, a exposição a doses subtóxicas de clorpirifós induz deficiências no desenvolvimento de coordenação motora e atividade locomotora e que estes efeitos podem ser sexo-dependentes (Dam et al. 2000). Slotkin and Seidler (2007) também observaram efeitos dependentes de sexo em animais adolescentes, por exposição pré-natal ao clorpirifós, associada a hiperatividade serotoninérgica e dopaminérgica.

Por outro lado também foi demonstrado, além do efeito de neurotoxicidade em animais expostos ao organofosforado clorpirifós, que o mesmo pode provocar geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo o qual poderia ser uma das formas do clorpirifós impedir o desenvolvimento neurocomportamental adequado em crianças em desenvolvimento (Crumpton et al. 2000; Quiao et al. 2005).

Este trabalho teve como objetivo investigar em ratos, as conseqüências neurocomportamentais da exposição perinatal a baixa concentração de cádmio, e a interação com os efeitos da administração subsequente de clorpirifós aos filhotes em desenvolvimento, na fase da infância.

Material e Métodos

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar obtidos da colônia do Biotério Central da Unesp, Campus de Botucatu. Durante as fases de adaptação, crescimento e experimental, os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo líquido e ração sem restrição. O presente estudo foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal (CEAA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP de Botucatu.

Aos 80 dias de idade os animais foram acasalados, colocando-se na mesma gaiola 3 fêmeas com 1 macho; as fêmeas foram consideradas fecundadas, quando encontrados espermatozoides no líquido do lavado vaginal (considerado o dia zero do acasalamento). As fêmeas consideradas prenhes foram colocadas individualmente em gaiolas e, durante todo o período de gestação passaram a receber *ad libitum* solução de acetato de cádmio (Synth-Brasil) em água destilada (10 mg de Cd⁺⁺/litro) ou de acetato de sódio (Dinâmica-Brasil) como controle (Ct) em água destilada (solução equimolar à de acetato de cádmio). Neste período as mães foram avaliadas quanto ao peso corporal, ingesta de líquido e ração (uma vez por semana), alterações de comportamento e possível sintomatologia.

Ao nascimento, os filhotes foram contados, examinados quanto a alterações físicas macroscópicas grosseiras, pesados e as ninhadas aceitáveis (mais que 10 filhotes por mãe) obtidas de mães expostas ao acetato de cádmio e controle, foram ajustadas para oito filhotes por mãe, mantendo o maior número possível de filhotes machos; as soluções de cádmio e controle continuaram sendo administradas às mães durante todo o período da lactação. Os filhotes foram mantidos junto com as mães até o DPN21 e depois separados em grupos de 15 filhotes, sendo para isto utilizado um filhote de cada mãe, para evitar tendências provindas da ninhada que pudessem mascarar ou deturpar os resultados obtidos para cada grupo. Do DPN21 ao DPN27 um grupo de filhotes (N=15) de mães controle e um grupo de mães expostas ao cádmio, receberam clorpirifós (Lorsban 480BR[®]-Dow Agrosiences-Brasil) uma vez ao dia, na dose de 30 mg/kg, (via oral - gavage), completando assim 4 grupos experimentais para o estudo, respectivamente grupos Ct, Cd, CPF e Cd+CPF.

Avaliação da atividade neurocomportamental

Para a avaliação comportamental dos filhotes, foram utilizados os testes de arena de campo aberto (ACA), labirinto em cruz elevado (LCE) e da agressividade utilizando o paradigma do animal residente/intruso. Para as avaliações em ACA e LCE os animais foram testados uma única vez, sem prévia habituação. Esses dois modelos experimentais foram escolhidos para avaliação de comportamento porque são utilizados para demonstrar efeitos de drogas sobre o sistema nervoso central (Long et al. 1996, Trombini et al. 2001, Godinho et al. 2002). Para tanto, no dia anterior ao teste, os animais foram transferidos em sua gaiolas para uma sala com atenuação de som, com temperatura controlada e iluminada com lâmpadas vermelhas opacas. O período de

observação comportamental foi definido entre 9 e 11 horas da manhã. Para prevenir tendências na observação, os responsáveis pelos testes desconheciam a natureza dos grupos experimentais.

Arena de campo aberto

Filhotes jovens (DPN28) e adultos (DPN80) foram testados na arena de campo aberto segundo metodologia descrita em Godinho et al. (2002), sendo a atividade geral dos animais avaliada por meio de observação direta no aparelho, o qual foi construído conforme especificado por Broadhurst (1960). Após colocar o animal no centro da arena foram avaliados os parâmetros locomoção, levantar, limpeza e congelamento, durante 3 minutos. Ao final de cada sessão com cada animal na arena o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

Labirinto em cruz elevado

Filhotes jovens (DPN28) e adultos (DPN80) foram testados no labirinto em cruz elevado, segundo metodologia que foi descrita por Pellow and Chopin (1985) e convalidada por Pellow and File (1986), para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos. Os seguintes parâmetros foram avaliados no teste: número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados do aparelho. Ao final de cada sessão com cada animal no labirinto, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor.

Comportamento de Agressividade

Este teste comportamental foi descrito por Long et al. (1996) para se avaliar o comportamento agressivo em ratos expostos a agentes químicos e é baseado no paradigma do animal residente/intruso. Este método permite a observação da interação social e do comportamento ofensivo do animal residente bem como os elementos defensivos por parte do intruso e reflete a agressão intraespecífica (Koolhaas and Bohus, 1991). Este modelo tem a vantagem de detectar agressividade moderada envolvendo injúria mínima ao animal. Para a avaliação, animais denominados residentes (filhotes controle e expostos perinatalmente ao Cd), no DPN45, foram colocados individualmente nas gaiolas e assim permaneceram pelo período de quatro semanas. Outro grupo de animais denominados intrusos, com tamanho e peso aproximados aos

dos residentes, no DPN45, foram colocados naturalmente agrupados nas gaiolas para manter o seu hábito de sociabilização, não recebendo nenhum tratamento e assim permaneceram pelo período de quatro semanas. O período de isolamento dos residentes e de duração dos experimentos foi de 5 semanas. Neste período foi trocada somente a forração das gaiolas nas primeiras quatro semanas e não na última semana.

Para a avaliação da agressividade, um animal intruso foi colocado na gaiola de um residente (DPN80) e durante 15 minutos foram observados: o tempo de latência para o primeiro ataque, o número total de ataques e o tempo total de episódios de ataque (compreendendo desde explosões de mordida, ameaças laterais, limpeza mais intensa e contenção do outro animal com as patas dianteiras). Os animais intrusos foram utilizados uma única vez ao dia para os testes sem nunca voltar ao mesmo animal residente. O teste realizado com cada par de animais foi filmado para posterior avaliação.

Análise Estatística dos resultados obtidos:

Os dados obtidos no presente experimento foram comparados através de análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre grupos foram consideradas significantes ao nível de 5% ($p < 0,05$) (Snedecor and Cochran, 1980).

Resultados

Avaliação das mães

No presente trabalho, durante os períodos da gestação e lactação, não foram observadas variações no peso corporal das mães, no volume de ingesta de líquidos e ração e no comportamento, com relação aos grupos controles (dados não mostrados). Nenhum sinal ou sintoma clínico de intoxicação foi observado no mesmo período, nas mães recebendo acetato de cádmio.

Avaliação da Atividade neurocomportamental

Comportamento na arena de campo aberto

Na tabela 3, os resultados obtidos com os filhotes jovens (DPN28) mostram que houve diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do comportamento de locomoção nos filhotes expostos ao cádmio e ao clorpirifós; nos animais expostos ao Cd mais CPF, a locomoção foi ainda menor, mas significativamente diferente ($p < 0,05$)

apenas com relação ao controle. O comportamento de levantar foi diminuído de forma estatisticamente significativa pela exposição ao Cd ($p < 0,05$) e ao CPF ($p < 0,05$), porém, a exposição ao Cd mais CPF não modificou a intensidade da diminuição. O congelamento de animais expostos ao Cd ou ao CPF, apesar de maior que o controle (48% e 37% respectivamente) não foi significativo ($p > 0,05$) e a exposição ao Cd mais CPF, apesar de intensificar um pouco o aumento do congelamento, foi estatisticamente significativa apenas com relação ao controle ($p < 0,05$). O comportamento de limpeza não variou nos filhotes expostos ao Cd ou CPF individualmente em relação ao controle ($p > 0,05$), mas foi maior em relação ao controle e ao clorpirifós, quando houve exposição ao Cd associado ao CPF ($p < 0,05$). Nos animais adultos (DPN80), os resultados mostram que nos filhotes expostos ao Cd ou CPF isoladamente não ocorreu modificação significativa de nenhum dos comportamentos avaliados na arena, porém quando foram avaliados animais expostos ao Cd mais CPF, houve significativa ($p < 0,05$) diminuição da locomoção principalmente e do levantar, bem como significativo aumento do congelamento e da limpeza ($p < 0,05$).

Comportamento no labirinto em cruz elevado

Na tabela 4, os resultados obtidos com os filhotes jovens (DPN28) mostram que houve apenas uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do comportamento de entrada nos braços abertos do labirinto nos filhotes expostos ao cádmio e ao clorpirifós, embora o Cd tenha provocado alterações não estatisticamente significantes ($p > 0,05$) na entrada nos braços fechados e no tempo de permanência, principalmente no braço fechado. Quando ocorreu exposição ao Cd mais CPF, houve intensificação dos efeitos, ocorrendo respectivamente diminuição significativa ($p < 0,05$) de entradas nos braços abertos com aumento nos fechados e diminuição significativa ($p < 0,05$) do tempo de permanência nos braços abertos com aumento nos fechados. Nos animais adultos (DPN80), os resultados mostram que nos filhotes expostos ao Cd ou CPF isoladamente não ocorreu modificação significativa ($p > 0,05$) de nenhum dos comportamentos avaliados no labirinto, porém quando foram avaliados animais expostos ao Cd mais CPF, houve significativa ($p < 0,05$) diminuição das entradas nos braços abertos principalmente e aumento significativo ($p < 0,05$) nos braços fechados.

Comportamento de agressividade

Os dados obtidos na avaliação do comportamento de agressividade mostram que exposição ao Cd ou ao CPF isoladamente não influenciaram de forma significativa ($p>0,05$) o tempo de latência para a primeira mordida, apesar de diminuírem este parâmetro em 34 e 26% respectivamente (Figura 1), nem o tempo total de manifestações de ataque, apesar de o aumentarem em 24 e 21% respectivamente (Figura 2). O número total de manifestações de ataque não foi influenciado ($p>0,05$) pela exposição ao Cd ou CPF (Figura 3). Porém, nos filhotes que foram expostos concomitantemente ao Cd e ao CPF, observa-se que houve intensificação tanto da diminuição do TL1M ($p<0,05$), em relação aos filhotes controle e expostos ao CPF, quanto do aumento ($p<0,05$) do TTMA, em relação aos filhotes controle e expostos ao Cd e ao CPF. O NTMA foi aumentado ($p<0,05$) nos animais expostos ao Cd mais CPF, em relação ao grupo exposto apenas ao Cd.

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a exposição gestacional ao Cd não promoveu toxicidade materna ou fetal porque nenhuma diferença no ganho de peso materno (dados não mostrados) ou dos filhotes, ao nascimento, foi observada entre animais controle e experimentais. Um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso (Chernoff et al. 2008). Assim, alterações na homeostase materna, a qual poderia indiretamente interferir com o desenvolvimento dos filhotes (Smarting and Dolbing 1971; Salvatori et al. 2004), não seria provavelmente a responsável por qualquer efeito posterior que pudesse ser observado, devido à exposição ao Cd. Como o comportamento das mães expostas ao Cd também não teve variação, este possível fator de interferência sobre o futuro comportamento dos filhotes, também foi descartado.

Nos animais testados na arena de campo aberto, tanto a exposição perinatal ao Cd quanto a exposição pós-natal ao CPF, diminuíram significativamente os comportamentos de locomoção e levantar e aumentou não significativamente o comportamento de congelamento (48,5% e 37%) nos filhotes DPN28. Nos filhotes DPN80 apenas o comportamento de locomoção permaneceu diminuído (31% menor) de modo não significativamente, sugerindo a princípio que tanto Cd quanto CPF não provocaram efeitos permanentes sobre o sistema nervoso dos animais. Locomoção e levantar são considerados dois comportamentos positivamente correlacionados

(Satinder 1968) sendo que ambos podem refletir a exploração de um novo e desconhecido ambiente, pelos animais.

Estudos anteriores indicam que exposições crônicas a baixas doses de cádmio podem causar problemas neurocomportamentais em humanos e animais, até mesmo quando nenhum dano renal for descoberto (Leret et al. 2003; Viaene et al. 2000). A fase da vida na qual o organismo vivo é exposto às substâncias químicas pode modificar drasticamente o efeito tóxico final. Os resultados obtidos nos presentes experimentos contradizem resultados anteriores de Ali et al. (1990), Leret et al. (2003) e Grawé et al. (2004, os quais encontraram experimentalmente que exposições pré e neonatal de filhotes de ratos ao cádmio, resultaram em hiperatividade locomotora. Já em outro estudo mais recente, Salvatori et al. (2004) não observaram nenhuma mudança nos parâmetros avaliados na ACA, em filhotes adultos de ratas expostas a dose subteratogênica de Cd, do 6º. ao 14º. dias da gestação. Nossos resultados corroboram com resultados obtidos por Lukawski et al. (2005), que demonstraram diminuição da atividade locomotora espontânea em ratos adultos pela exposição ao Cd e com Baranski et al. (1983), que também observaram uma redução na atividade locomotora, medida numa caixa automatizada, em filhotes de ratas expostas a dose subcrônica de cádmio na gestação. As diferenças encontradas podem ser devido aos diferentes procedimentos experimentais, doses, etc.

Ao exercer toxicidade em mamíferos, o inseticida organofosforado clorpirifós tem como alvo primário a enzima acetilcolinesterase (Richardson et al. 1993), porém vários efeitos neurotóxicos que incluem alterações da atividade locomotora tem sido descritos na literatura (Icenogle et al. 2004; Levin et al. 2004). Envolvimento de outros sistemas neurais em adição ao sistema colinérgico também tem sido observados nos efeitos de neurotoxicidade (Ricceri et al. 2003). Estudos de Chanda and Pope (1996) utilizando baixo nível de exposição repetida ao organofosforado CPF na gestação, demonstraram ocorrência de amplas alterações neuroquímicas e neurocomportamentais em ratos em desenvolvimento, na ausência de toxicidade materna, e observaram que o feto é mais protegido antes do nascimento que o filhote após o parto. Além disso, administração de CPF tardiamente na gestação de ratos em desenvolvimento (dias gestacional 17-20) levou a alterações em longo prazo na performance cognitiva, que foram idade dependente (Levin et al. 2002).

Pitts and Horvitz (2000) demonstraram que desregulação do sistema do neurotransmissor dopamina prejudica as atividades locomotora e exploratória de ratos. Toxicidade ao sistema dopaminérgico poderia, portanto estar também envolvida nos efeitos sobre a locomoção/exploração observados nos filhotes expostos ao Cd e ao CPF.

Por outro lado, foi demonstrado que exposição ao Cd em ratos adultos pode modular os receptores opióides mu, delta e kappa (Tejwani and Hanissian, 1990). Neste sentido, o comportamento de levantar tem sido utilizado previamente como uma medida do efeito locomotor após administração de opióides, observando-se que a morfina diminui este comportamento de levantar (Patti et al. 2005). É importante observar que outros fatores como sedação, diminuição da motivação e aumento de ansiedade, podem levar a diminuição desta atividade comportamental (Neubert et al. 2007). Dados de Privette and Terrian (1995) sugerem o envolvimento do sistema do receptor kappa na resposta à ansiedade em roedores. Nossa argumentação é que mudança no comportamento é um relevante *endpoint*, pois qualquer evento que produza esta mudança poderia provavelmente estar afetando o sistema nervoso. Neste sentido, atividade neurocomportamental tem sido preconizada como marcador ou bio-indicador de função para neurotoxicidade (Wormley et al. 2004).

Desordens comportamentais acompanhadas de disfunções bioquímicas têm sido observadas em indivíduos expostos ao Cd (De Castro et al.1996; Dési et al. 1998). Os efeitos sobre a função do cérebro que resultam da exposição ao Cd durante o desenvolvimento, são observados por se relacionar a vários níveis celulares. As transmissões tanto catecolaminérgica, serotoninérgica quanto colinérgica no cérebro, podem ser alteradas por metais pesados como o cádmio (Antonio et al. 1998,1999; Dési et al. 1998). Os danos provocados pelo Cd ao nível de produção, estocagem, liberação e recaptção de neurotransmissores, poderiam explicar os efeitos comportamentais provocados pela ação do cádmio sobre o sistema nervoso. Alterações anormais nos sistemas de neurotransmissores de jovens filhotes podem produzir alterações comportamentais nestes animais, como por exemplo, hipoatividade devido a mudanças do sistema dopaminérgico (Wirtshafter et al. 1988).

Quando os animais expostos perinatalmente ao Cd foram seqüencialmente também expostos ao clorpirifós na infância, houve uma intensificação nas alterações comportamentais já observadas pelos toxicantes individualmente, e ainda aumento dos comportamentos de congelamento e limpeza, não só nos filhotes DPN28 como também nos DPN80, caracterizando o imprinting neurocomportamental. Como os

comportamentos de congelamento e limpeza refletem a emocionalidade e o medo dos animais, respectivamente (Godinho et al. 2002), estes resultados indicam que o dano provocado pela interação entre os efeitos de Cd e CPF juntos são maiores e mais preocupantes.

Quando os animais expostos ao Cd e ao CPF isoladamente, foram testados no LCE, a única alteração estatisticamente significativa foi a diminuição das entradas nos braços abertos do aparelho visto com os animais do DPN28, sugerindo efeito ansiogênico, mas nos animais expostos a ambos, o efeito foi exacerbado, ficando bem claro a preferência dos animais pelos braços fechados do aparelho, enfatizando ansiedade aumentada nos animais. À semelhança do observado na ACA, a ansiedade ainda pode ser observada nos animais no DPN80. Infelizmente não encontramos estudos dos efeitos de Cd ou CPF sobre a ansiedade o que prejudica a comparação de dados.

No estudo do comportamento de agressividade observou-se um quadro de resultados semelhante ao que foi antes obtido na ACA e LCE, pois aqui Cd ou CPF isoladamente não modificaram significativamente este comportamento, mas quando os animais foram expostos aos dois toxicantes, observou-se intensificação de todos os parâmetros indicativos de agressividade aumentada nos animais.

Embora alguns trabalhos existentes apontem o cádmio como um agente capaz de provocar agressividade anormal e os dados ainda sejam insuficientes e os mecanismos permaneçam não identificados, aumento do comportamento agressivo forma observados em ratos adultos (Arito et al. 1981), juvenis (Baranski 1984; Holloway and Thor 1988; Leret 2003) e em desenvolvimento (Desi et al. 1998) pela administração repetida de cádmio. Dados de nossos laboratórios mostram que ratos jovens expostos ao Cd, pela água de beber, de forma prolongada, tem agressividade aumentada e o efeito é dose dependente (Castilho et al. 2007).

As vias colinérgicas no cérebro estão associadas com vários tipos de comportamento e funções, incluindo fome, sede, termoregulação, respiração, cognição e agressividade (Furtado and Chan, 2004). Como tanto CPF quanto Cd são capazes de provocar inibição da enzima acetilcolinesterase (Antonio et al. 2003; El-Demerdash, 2004), interferência com as vias colinérgicas poderia ser uma das formas de provocar aumento da agressividade nos animais. Por outro lado, como tem sido sugerido por Nelson e Chiavegato (2001, 2003), um papel importante das vias serotoninérgicas na agressão anormal e como Cd interfere com este neurotransmissor (Leret et al. 2003),

toxicidade a este nível do SNC também poderia estar contribuindo para os efeitos observados aqui. Não encontramos na literatura corrente, dados sobre efeitos do CPF sobre esta via de neurotransmissão. Adicionalmente, resultados obtidos por Sánchez (1995) sugerem que o comportamento exploratório parece depender dos mecanismos serotoninérgicos. O fato dos filhotes expostos ao Cd e CPF mostrarem exploração diminuída indica menor atividade com efeitos danosos sobre o sistema serotoninérgico e este achado corrobora com a hipótese de Nelson & Chivegato (2003) sobre a importância da serotonina como molécula neurotransmissora implicada na agressividade anormal.

Concluindo, interação entre substâncias químicas é um dos grandes problemas com os quais a toxicologia se depara hoje, devido ao problema sério da multiexposição a um sem número de substâncias químicas. Quando mais de uma substância de exposição atuam provocando efeitos tóxicos num mesmo sistema, a resultante é geralmente um quadro aumentado de sinais e sintomas clínicos, com uma letalidade ainda maior e os riscos aumentam na medida em que indivíduos jovens são atingidos mais precocemente (Pohl and Abadin 2008). A grande dificuldade de estudar e compreender os efeitos da multiexposição, é a de que as substâncias químicas podem modificar sua forma de atuação quando estão na forma de misturas e a resultante final pode ser diversa daquela observada na situação de exposição a uma única substância isoladamente (Rice et al 2008). Os resultados do presente trabalho indicam que quando Cd e CPF estão presentes simultaneamente no organismo de ratos em desenvolvimento pode ocorrer interação negativa entre ambos, resultando em intensificação do quadro de neurotoxicidade.

Referências

- Ali MM, Murthy RC, Chandra SV. Developmental and longterm neurobehavioral toxicity of low level in utero cadmium exposure in rats. *Neurobehavioral Toxicology Teratology* 8, 463–8, 19 86.
- Ali M.M., Mathur N. & Chandra S.V. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 28, 653-659, 1990.

- Antonio MT, Benito MT, Leret ML, Corpas I. Gestational administration of cadmium alters the neurotransmitter levels in newborn rat brains. *Journal of Applied Toxicology* 18, 83–88, 1998.
- Antonio MT, Corpas I, Leret ML. Neurochemical changes in newborn rat's brain after gestational cadmium and lead exposure. *Toxicology Letters* 104, 1-9, 1999.
- Antonio MT, Corredor L, Leret ML. Study of the activity of several enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicology Letters*, 143, 331-340, 2003.
- Arito H, Sudo A, Suzuki Y. Aggressive behavior of the rat induced by repeated administration of cadmium. *Toxicology Letters* 7, 457-461, 1981.
- Bachelet M, Pinot F, Polla RI, Francois D, Richard MJ, Vayssier-Taussat M, et al. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radical Research* 36, 99–106, 2002.
- Baranski B, Stetkiewics I, Sitarek K, Szymczak W. Effects of oral, subchronic cadmium administration on fertility, prenatal and postnatal progeny development in rats *Archives of Toxicology* 54,297-302, 1983.
- Baranski B. Behavioural alterations in offspring of female rats repeatedly exposed to cadmium oxide by inhalation. *Toxicology Letters* 22, 53-61, 1984.
- Battacharayya MH. Bioavailability of orally administered cadmium and lead to the mother, fetus and neonate during pregnancy and lactation: An overview. *Science of Total Environment* 28, 327-342, 1983.
- Broadhurst P.L. 1960. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk, H.J. *Experiments in Personality*. London: Rutledge and Keagan Paul, p. 31-61.
- 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* 59, 260–267, 2001.
- Castilho HS, Souza, RP, Lacorte LM, Terçariol SG, Almeida, AA. Administração prolongada de cádmio aumenta a agressividade em ratos jovens. *Revista Brasileira de Toxicologia* 20, 116, 2007.
- Chanda SM, Pope CN. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal developing rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 53, 771-776, 1996.
- Chernoff N, Rogers EH, Gage MI, Francis BM. The relationship of maternal and fetal toxicity in developmental toxicology bioassays with notes on the biological

- significance of the “no observed adverse effect level”. *Reproductive Toxicology* 25, 192–202, 2008.
- Crumpton TL, Seidler TA, Slotkin TA. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? *Developmental Brain Research* 121, 189-195, 2000.
- 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* 121, 179–187, 2000.
- De Castro E, Ferreira H, Cunha M, Bulcao C, Sarmiento C, De Oliveira I, Fregoneze Jb. Effect of central acute administration of cadmium on drinking behavior. *Pharmacology and Biochemistry Behavior* 53(3), 687-693, 1996.
- Desi I, Nagyrnajtenyi L, Schulz H. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. *Journal of Applied Toxicology* 18, 63-70, 1998.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation. Blood hematology, biochemical parameters, and semem quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food and Chemical Toxicology, Exeter*, 42(10), 1563-1571, 2004.
- Filipic M, Fatur T, Vudrag M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. *Humam and Experimental Toxicology* 25, 67-77, 2006.
- Furtado M, Chan L. 2004: <http://www.emedicine.com/med/topic1677.htm>
- Godinho AF, Trombini TV, Oliveira EC. Effects of elevated calcium on motor and exploratory activities of rats. *Brazilian Journal Medical and Biological Research* 35, 451-457, 2002.
- Grawé KP, Teiling-Gårdlund A, Jalkestén E, Oskarsson A. Increased spontaneous motor activity in offspring after maternal cadmium exposure during lactation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 17, 35–43, 2004.
- Holloway WR, Thor DH. Cadmium exposure in infancy affects activity and social behaviour of juvenile rats. *Neurotoxicology and Teratology* 10, 135-142, 1988.
- Hypponen, S, Kohila T, Tahti, H. The effects of cadmium. *Neurosciences Research Communications* 12, 77–84, 1993.
- Icenogle L., Christopher N., Blackwelder W., Ccaldwell D., Quiao D., Seidler T., Slotkin T., Levin E. Behavioral alterations in adolescent and adult rats after brief

- subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology Teratology* 26, 95-101, 2004.
- Koolhaas, J.M., Bohus, B., 1991. Animal models of human aggression. In: *Animal models in Psychiatry II*, Alan A. Boulton, et al. (Eds.). Human Press, Clifton, New Jersey, p.249-271.
- Leret ML, Millan JAS, Antonio MT. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology* 186, 125-130, 2003.
- Levin ED, Addy N, Baruah A, Elias A, Christopher NC, Seidler FJ, Slotkin TA. Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 733-741, 2002.
- Levin E.D., Swain H.A., Donerly S. & Linney E. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 719-723, 2004.
- Long SF, Wilson MC, Sufka KJ, Davis WM. The effects of cocaine and nandrolone co-administration on aggression in male rats. *Progress in Neuro- Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 20, 839-856, 1996.
- Lukawski K., Nieradko B. & Sieklucka-Dziuba M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. *Neurotoxicology Teratology* 27, 575-584, 2005.
- Mumtaza MM, Ruiza P, De Rosaa CT. Toxicity assessment of unintentional exposure to multiple chemicals *Toxicology and Applied Pharmacology* 223(2), 104-113, 2007.
- National Institutes of Health (NIH). *National pregnancy & health survey: drug use among women delivering live births, 1992*. Rockville, MD: Department of Health and Human Services; 1996.
- Nagymajtenyi L, Schulz H, Desi L. Behavioural and functional neurotoxicological changes caused by cadmium in a three-generational study in rats. *Human and Experimental Toxicology* 16, 691-699, 1997.
- Neubert JK, Rossi HL, Pogar J, Jenkins AC, Caudle AARM. Effects of mu- and kappa-2 opioid receptor agonists on pain and rearing Behaviors. *Behavioral and Brain Functions* 3, 49-57, 2007.
- Nelson RJ, Chiavegatto S. Molecular basis of aggression. *Neurosciences* 24, 713-719, 2001.

- Nelson RJ, Chiavegatto S. Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Hormones and Behavior* 44, 233–241, 2003.
- Patti CL, Frussa-Filho R, Silva RH, Carvalho RC, Kameda SR, Takatsu-Coleman AL, Cunha JL, Abilio VC. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 81(4), 923-927, 2005.
- Pitts SM, Horvitz JC. Similar effects of D₁/D₂ receptor blockade on feeding and locomotor behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65 (3), 433-438, 2000.
- Pellow, S.; Chopin, M. The effect os putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. *Physiology Behavior* 35, 587-590, 1985.
- Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 24,525-529, 1986.
- Pohl HR, Abadin HG. Chemical mixtures: Evaluation of risk for child-specific exposures in a multi-stressor environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233, 116–125, 2008.
- Privette TH, Terrian DM. Kappa opioid agonists produces anxiolytic-like behavior on the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 118, 444-450, 1995.
- Quiao D, Seidler FJ, Slotikin TA. Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 17-26, 2005.
- Ricceri L, Markina N, Valanzano A, Fortuna S, Cometa MF, Meneguz A, Calamandrea G. Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 191, 189-201, 2003.
- Rice G, MacDonell M, Hertzberg RC, Teuschler L, Picel K, Butler J, Chang IS, Hartmann H. An approach for assessing human exposures to chemical mixtures in the environment. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233:126–136, 2008.
- Richardson RJ, Moore TB, Kayyali US, Fowke JH, Randall JC. Inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase by chlorpyrifos in vivo and kinetics of inhibition by chlorpyrifos oxon in vitro: application to assessment of neuropathic risk. *Fundamental and Applied Toxicology* 20, 273–279, 1993.

- Salvatori F, Talasi CB, Salzgeber SA, Spinosa HS, Bernardi, MM. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 673-680, 2004.
- Sánchez C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white test box. *Pharmacology and Toxicology* 77, 71-78, 1995.
- Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-elkins M, Reilly P, Williams DJ, Moore MR. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology Letters* 37, 65-83, 2003.
- Satinder KP. A note on the correlation between open-field and escape avoidance behavior in the rat. *Journal of Psychology*, 69: 3-6, 1968.
- Slokin TA, Seidler FJ. Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: critical periods for regional and sex-selective effects. *Reproductive Toxicology* 23, 421-427, 2007.
- Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain: II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour on the rat. *Brain Research* 28, 85-95, 1971.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 7th Ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 1980.
- Tejwani GA, Hanissian SH. Modulation of mu, delta and kappa opioid receptors in rat brain by metal ions and histidine. *Neuropharmacology* 29(5), 445-52, 1990.
- Telisman S, Cvitkovic P, Jurasovic J, Pizent A, Gavella M, Rocic B. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environmental Health Perspectives* 108, 45-53, 2000.
- Trombini T.V., Pedroso C.G., Ponce D., Almeida A.A. & Godinho A.F. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at f2 generation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 67, 743-751, 2001.
- Viaene MK, Massachelein R, Leenders L, De Groof M, Swerts LJ, Roels HA. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. *Occupational and Environmental Medicine* 57, 19-27, 2000.
- Waalkes MP, Misra RR. Cadmium carcinogenicity and genotoxicity. In: L.W. Chang editors. *Toxicology of Metals*. Boca Raton, CRC Press. Inc., 1996, 241-244.

- Wirtshafter G, Klitenick MA, Asin K E. Is dopamine involved in the hyperactivity produced by injections of muscinol into the median raphe nucleus? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 30, 577-583, 1988.
- Wormley DD, Ramesh A, Hood DB. Environmental contaminant-mixture effects on CNS development, plasticity, and behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology* 197, 49-65, 2004.
- Wu D, Landsberger S, Larson SM. Evaluation of elemental cadmium as a marker for environmental tobacco smoke. *Environmental Science and Technology* 29, 2310–6, 1995.
- Yue L. Cadmium in tobacco. *Biomed Environ Sci* 5, 53-6, 1992.

Tabela 1 – Avaliação do comportamento em arena de campo aberto, de filhotes de ratas recebendo Cd perinatal e CPF pós-natal.

DPN 28				
Teste	Ct	Cd	CPF	Cd+CPF
Locomoção	95,44±9,01 a	67,44±7,02 b	67,22±7,11 b	49,77±5,10 b
Levantar	29,80±3,07 a	19,91±2,01 b	19,07±2,22 b	19,84±2,02 b
Congelamento	4,22±0,62 a	6,27±0,70 ab	5,81±0,61 ab	8,12±0,87 b
Limpeza	14,42±1,57 a	16,19±1,45 ab	9,02±1,12 ac	22,01±1,97 b
DPN 80				
Locomoção	101,23±11,47 a	70,11±7,55 ac	89,15±9,17 acb	55,07±5,84 b
Levantar	36,32±3,88 a	28,14±2,97 ab	26,12±2,78 ab	22,55±2,79 b
Congelamento	3,97±0,41 a	5,64±0,51 ab	4,07±0,51 ab	5,98±0,60 b
Limpeza	13,49±1,40 a	16,98±2,01 ab	17,22±1,81 ab	22,07±2,37 b

Os valores representam a média ± E.P.M. obtida com filhotes de 15 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (ANOVA).

Tabela 2 – Avaliação do comportamento em labirinto em cruz elevado, de filhotes de ratas recebendo Cd perinatal e CPF pós-natal.

DPN 28				
Teste	Ct	Cd	CPF	Cd+CPF
EA	6,37±0,64 a	4,39±0,55 b	4,32±0,49 b	2,32±0,29 c
EF	7,07±0,81 a	11,40±1,51 ab	10,74±1,4 ab	12,33±1,85 b
TA	87,01±9,47 a	60,07±7,13 ab	67,75±8,13 ab	55,18±5,67 b
TF	130,66±14,43 a	187,51±19,90 ab	180,22±11,71 ab	201,13±22,45 b
DPN 80				
EA	6,79±0,67 a	4,69±0,48 a	5,88±0,67 a	4,07±0,51 b
EF	8,17±0,91 a	10,99±1,22 ab	7,49±0,78 a	12,80±1,22 b
TA	114,88±12,74 a	90,77±11,14 a	127,89±13,44 a	96,67±10,07 a
TF	148,03±15,72 a	184,84±19,47 a	144,18±15,67 a	171,48±17,54 a

Os valores representam a média ± E.P.M. obtida com filhotes de 15 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (ANOVA). EA-entradas nos braços abertos; EF-entradas nos braços fechados; TA-tempo de permanência nos braços abertos; TF-tempo de permanência nos braços fechados.

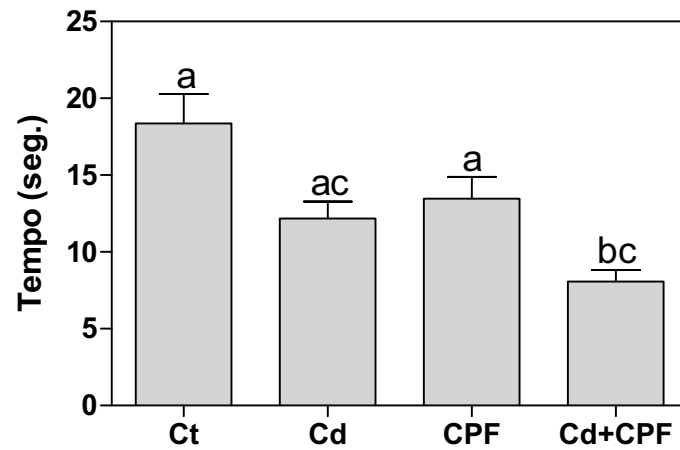


Figura 1 – Tempo de latência para a primeira mordida obtido durante a avaliação do comportamento de agressividade em filhotes de ratas recebendo Cd perinatal e CPF pós-natal. Os valores representam a média \pm E.P.M. obtida com filhotes de 10 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (ANOVA).

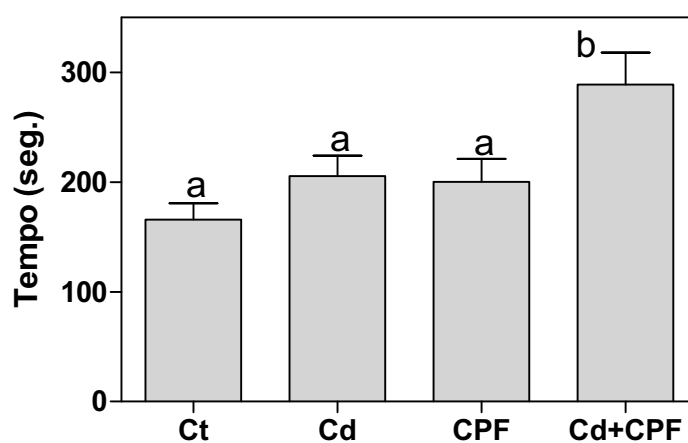


Figura 2 – Tempo total de manifestações de ataque obtido durante a avaliação do comportamento de agressividade em filhotes de ratas recebendo Cd perinatal e CPF pós-natal. Os valores representam a média \pm E.P.M. obtida com filhotes de 10 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (ANOVA).

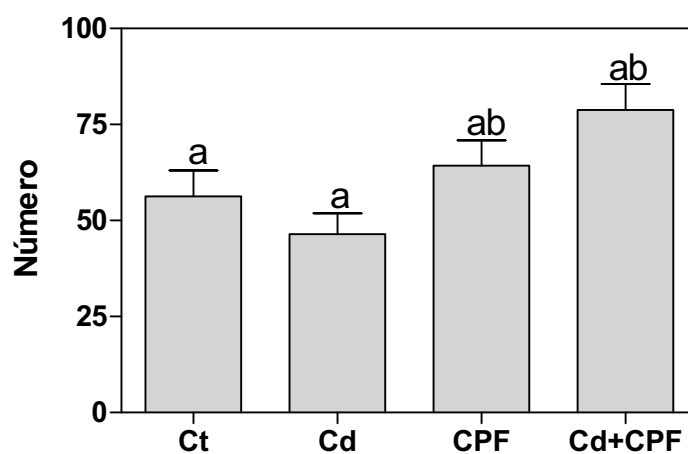


Figura 3 – Número total de manifestações de ataque obtido durante a avaliação do comportamento de agressividade em filhotes de ratas recebendo Cd perinatal e CPF pós-natal. Os valores representam a média \pm E.P.M. obtida com filhotes de 10 ninhadas por grupo experimental. Valores com letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes para $p < 0,05$ (ANOVA).

VI – CONCLUSÃO GERAL

Como pode ser observado pelo conjunto dos dados obtidos, o presente trabalho fornece subsídios para que o cádmio seja classificado como um metal de alto poder toxicológico, principalmente quando se trata de neurotoxicidade por exposição perinatal, mesmo a baixa dose por via oral.

Os efeitos aqui observados permitem também visualizar o poder de imprinting desta natureza de exposição ao metal e as conseqüências danosas e mais adversas, da interação negativa com uma substância do grupo químico dos praguicidas, o clorpirifós.

Os dados aqui expostos são alarmantes em termos de saúde pública, pois tanto animais quanto humanos estão expostos a níveis destas duas substâncias, que se assemelham aos do presente experimento.

Outros experimentos necessitam serem realizados para evidenciar os mecanismos celulares pelos quais esta interação ocorre.

LIFE SCIENCE - GUIDE TO AUTHORS

PREPARATION

Language

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). For language assistance, please see Language Services, above. Use decimal points (not decimal commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Formatting instructions

1. Prepare the text in Microsoft Word in order to prevent conversion errors.
2. Use double line spacing with no paragraph indents.
3. All manuscript pages should be numbered.
4. Use the word-processor's word-wrap feature. Use hard returns only at the end of paragraphs.
5. Do not italicize common Latin terms (i.e., *in vivo*, *in vitro*, et al., *ad libitum*).

Organization of the manuscript

Beginning with the first page, present your manuscript in the order below:

1. Title: First letter capitalized, subsequent letters in lower case. Maximum length 150 characters including spaces. Avoid abbreviations.
- 2a. Names of all authors.
- 2b. Affiliations of all authors. If necessary, use superscripted lowercase letters after the author's name to distinguish affiliations.
3. Author to whom proofs and correspondence should be sent, including name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address.
4. Structured abstract of no more than 250 words. The following headings must be used:
Aims:
Main methods:
Key findings:
Significance:
5. Three or more key words for indexing purposes. In addition to key words from the title, please suggest other terms that help define the study. We encourage authors to test the relevance of their key words by using them for a database search and comparing the results with the topic of their own paper.

Word limits: In **full papers**, individual sections should be no longer than Abstract 250 words, Introduction 500 words, Discussion 1500 words, Conclusion 150 words. Materials and Methods and Results sections should be concise but there is no formal word limit. **Review articles** should be no longer than 8000 words.

Headings: Papers must include the major headings Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgments, and References. Include subheadings as appropriate. Review articles must contain Abstract and Introduction, with subsequent headings and subheadings as appropriate.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section.

Abbreviations

Abbreviations must be explained the first time they are used, both in the Abstract and again in the main text.

Abbreviations used as names of cell lines do not need to be explained, but the species and tissue of origin should be made clear in text the first time the cell line is mentioned. Examples: "the human colonic adenocarcinoma cell line Caco-2" or "the porcine renal endothelial cell line LLC-PK1".

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Please note that funding information must appear under the Acknowledgments heading.

Electronic Artwork

Placement of figures and tables will be determined by the printer at the time of publication; do not indicate where they appear in the text. Avoid using patterns in histograms/bar graphs. Solid white/gray/black bars are preferred. Do not import figures into the manuscript file. Figures composed of many similar panels should be submitted both in compiled form for review and as separate high-resolution images for production. Tables must be submitted in word processing format, not as images.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions as part of the manuscript following References, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

- Single author (Smith 2003)
- Two authors (Smith and Thompson 2003)
- Three or more authors (Smith et al. 2003) (N.B.: note period after et al.)
- Multiple references (Smith et al. 2003; Jones et al. 2003) (N.B.: note semicolon)
- Same author(s), same year (Smith and Thompson 2000a,b,c)
- Same author(s), different years (Smith et al. 1999, 2001)

Reference list

List references alphabetically. Include the full title of the article referred to, capitalizing

only the initial letter of the title. Spell out all words in journal titles. All major words in journal titles should be capitalized. Sample references:

Journal articles: Feldman RD, Gros R. New insights into the regulation of cAMP synthesis beyond GPCR/G protein activation: Implications in cardiovascular regulation. *Life Sciences* 81(4), 267-271, 2007

Books: Strunk W Jr, White EB. *The Elements of Style*, third ed. MacMillan, New York (Chapter 4), 1979

Articles or chapters in edited books: Zhang SS, Bruneau BG. Transcriptional control of the cardiac conduction system (Chapter 10). In: Bodmer R (Ed) *Cardiovascular Development, Advances in Developmental Biology*, Vol 18. Elsevier, Amsterdam/Oxford, pp 219-258, 2008

Articles published on the Internet: Kuiper JWP, Pluk H, Oerlemans F, van Leeuwen FN, de Lange F, Fransen J, Wieringa B. Creatine kinase-mediated ATP supply fuels actin-based events in phagocytosis. *PLoS Biology* 6(3) doi:10.1371/journal.pbio.0060051, 2008 *Articles from conferences:* Cooke JP. Angiogenesis and the role of the endothelial nicotinic acetylcholine receptor. In: Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Wessler I (Eds) *Proceedings of the Second International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine*, Mainz, Germany, August 31-September 2, 2006. *Life Sciences* 80(24/25), 2347-2351, 2007

Articles in Special Issues: Please ensure that the words "this issue" are added (in the list and text) to any references to other articles in the Special Issue.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. Video files: please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your supplementary information. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.

<http://epsupport.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a

printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.