



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL A CÁDMIO  
E DIMETOATO SOBRE O COMPORTAMENTO DE  
ANSIEDADE NA PROLE DE RATOS**

**FÁBIO ANSELMO**

**Botucatu - SP**

**2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



# **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL A CÁDMIO E DIMETOATO SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE NA PROLE DE RATOS**

**FÁBIO ANSELMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu para a obtenção do título de mestre.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Francisco Godinho**

**Botucatu - SP**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Anselmo, Fábio.

Efeitos da exposição gestacional a cádmio e dimetoato sobre o comportamento de ansiedade na prole de ratos / Fábio Anselmo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Antonio Francisco Godinho

Capes: 21000000

1. Cádmio. 2. Dimetoato. 3. Ansiedade. 4. Neurotoxicologia. 5. Poluição. 6. Compostos Químicos.

Palavras-chave: ansiedade; cádmio; co-exposição a agentes ambientais; dimetoato; neurotoxicidade.

## ATA DE DEFESA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE FÁBIO ANSELMO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (FARMACOLOGIA), DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.**

Aos 29 dias do mês de fevereiro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro , reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. ANTONIO FRANCISCO GODINHO do(a) Ceatox / Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. CELSO ACÁCIO RODRIGUES DE ALMEIDA COSTA do(a) Departamento de Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu, Profa. Dra. CARLA ADRIENE DA SILVA FRANCHI do(a) Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina de Botucatu, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de FÁBIO ANSELMO, intitulada **EFEITOS DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL A CÁDMIO E DIMETOATO SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANSIEDADE NA PROLE DE RATOS**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ANTONIO FRANCISCO GODINHO

Prof. Dr. CELSO ACÁCIO RODRIGUES DE ALMEIDA COSTA

Profa. Dra. CARLA ADRIENE DA SILVA FRANCHI

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais. O amor de uma mãe e de um pai é o combustível que capacita um ser humano comum a fazer o impossível.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Antonio Francisco Godinho pelos ensinamentos, pela disposição em sempre ajudar, pela compreensão e paciência, pelo apoio em todos os momentos e principalmente pelos conselhos e amizade.

A todos os funcionários do CEATOX, Dr. Alaor Aparecido Almeida, Fábio Iachel da Silva, João Leandro Chaguri, Sarah Setznagl, Juliano da Silva Otoni, Josie Michelle Juvencio, Rita de Cássia Ferrari pela disposição em ajudar e pela colaboração na execução deste projeto.

A atual supervisora do CEATOX, Dr<sup>a</sup>. Valéria Cristina Sandrim, ao antigo supervisor do CEATOX, Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior e ao coordenador do programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia Dr. Luiz Claudio Di Stasi pelos conselhos e disposição em ajudar.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Caique Aparecido Faria, Daniel França Horta, Meyre Mieko Yassuda, Daniela Alessandra Fossato da Silva, Jessica Dorador Kawashima, Daniel de Fraia pela ajuda, disposição e principalmente pela amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Angélica Henrique Fernandes e seu aluno Anderson Kiyoshi Kaga pela fundamental colaboração com este projeto.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

A minha irmã Luciana Anselmo e aos meus queridos sobrinhos Laura Bertin e Luiz Fernando Bertin pelo apoio e carinho.

Aos meus pais José Anselmo e Áurea Roso Anselmo pelo incentivo, compreensão, conselhos, paciência em todos os momentos da minha vida. Sem eles, nada seria possível.

E especialmente a minha namorada Lenita Leme Corrêa que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e me dando força nos momentos mais difíceis, sempre com muito carinho e amor.

**Muito obrigado nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do carinho e dedicação que recebi de todos vocês.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Avaliação do desenvolvimento físico através do ganho de peso corporal (A), descolamento das orelhas (B), abertura dos olhos (C), erupção dos incisivos (D) e aparecimento de pelos (E).....	11
<b>FIGURA 2</b> - Avaliação do desenvolvimento sensório-motor através dos reflexos de endireitamento (A), geotaxia negativa (B) e preensão palmar (C).....	11
<b>FIGURA 3</b> - Arena de Campo Aberto.....	12
<b>FIGURA 4</b> - Labirinto em Cruz Elevado.....	13
<b>FIGURA 5</b> - Caixa claro/escuro.....	14
<b>FIGURA 6</b> - Ganho de peso corpóreo das mães durante o período de gestação.....	15
<b>FIGURA 7</b> - Concentração de cádmio no sangue das mães no 20º dia de gestação.....	16
<b>FIGURA 8</b> - Concentração de dimetoato no sangue das mães no 20º dia de gestação.....	16
<b>FIGURA 9</b> - Peso médio dos filhotes no DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21.....	17
<b>FIGURA 10</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na ACA.....	19
<b>FIGURA 11</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na ACA.....	20
<b>FIGURA 12</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, no LCE.....	20
<b>FIGURA 13</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, no LCE.....	21
<b>FIGURA 14</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na CCE.....	21
<b>FIGURA 15</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na CCE.....	22
<b>FIGURA 16</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na CCE.....	22
<b>FIGURA 17</b> - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole, na CCE.....	23
<b>FIGURA 18</b> - Atividade da colinesterase sanguínea na prole com 30 e 80 dias de idade.....	25
<b>FIGURA 19</b> - Atividade da colinesterase cerebral na prole com 30 e 80 dias de idade.....	25

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** - Nº de filhotes/sexo/mãe e Nº de filhotes vivos/mortos nos diferentes grupos de exposição.....18

**TABELA 2** - Avaliação de parâmetros iniciais físicos e sensório-motores de filhotes de mães do grupo controle e expostas aos diversos tratamentos durante a gestação.....18

**TABELA 3** - Concentração de cádmio no sangue, cérebro e fígado da prole com 30 e 80 dias de idade.....24

**TABELA 4** - Peso relativo (mg) do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração da prole com 80 dias de idade, provinda de mães do grupo controle e expostas ao cádmio (Cd), dimetoato (DM) e cádmio+dimetoato (Cd+DM) durante a gestação.....26



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**%** - Porcentagem

**µg/L** - microgramas por litro

**µg/ml** - microgramas por mililitro

**ACA** - Arena de campo aberto

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** - Acetilcolinesterase

**CCE** - Caixa claro-escura

**Cd** - Cádmiio

**Cd+DM** - Cádmiio+Dimetoato

**cm** - Centímetros

**Ct** - Controle

**DM** - Dimetoato

**DOHaD** - Origens do desenvolvimento da saúde e da doença

**DPN** - Dia pós-natal

**g** - gramas

**l** - litros

**LCE** - Labirinto em cruz elevado

**mg** - miligramas

**mg/kg** - miligramas por quilograma

**mg/l** - miligramas por litro

**min** - Minutos

**NIH** - National Institutes of Health

**Nº** - Número

**OF** - Organofosforados

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PPB** - Parte por bilhão

**seg** - segundos

**SINPAF** - Sindicato Nacional dos trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário

**SNC** - Sistema nervoso central

**U/L** - unidades por litro

**UI** - Uma unidade internacional (UI) é a quantidade de enzima que converte 1µmol de substrato por minuto, em condições padrão.

**v** - volume

**W** - Watt

**HPA** - Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

## RESUMO

Nas últimas décadas os níveis de contaminação ambiental por metais pesados e inseticidas vêm aumentando significativamente, acompanhando exponencialmente o rápido e crescente desenvolvimento industrial levando à exposição simultânea a vários agentes químicos com ação sobre o sistema nervoso central (SNC). Sob o ponto de vista toxicológico, co-exposição a substâncias químicas tende a piorar de forma qualitativa e quantitativa os danos produzidos e a irreversibilidade dos processos de neurotoxicidade. Um dos mais prevalentes tipos de desordens sobre o SNC é o da ansiedade. O objetivo deste trabalho foi estudar a co-exposição gestacional ao metal pesado cádmio (Cd) e ao inseticida organofosforado dimetoato (DM) e sua influência sobre o comportamento de ansiedade na prole de ratos em desenvolvimento. Fêmeas prenhes foram expostas durante toda a gestação, por via oral, a solução de Cd (10mg/l), DM (4mg/kg, gavage) e Cd+DM. Após o nascimento dos filhotes foram avaliados: desenvolvimento físico e sensorio-motor dos filhotes durante os primeiros dias de idade e o comportamento de ansiedade nas idades de 30 e 80 dias, utilizando arena de campo aberto (ACA), labirinto em cruz elevado (LCE) e caixa claro-escuro (CCE). Também foram quantificados o Cd e o DM tecidual e a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) sanguínea e cerebral. Os resultados obtidos mostram que: a co-exposição aos agentes alterou o desenvolvimento físico dos filhotes; Cd, DM e Cd+DM aumentaram a ansiedade da prole, tanto na idade jovem quanto na idade adulta, porém, o aumento da ansiedade provocado pela co-exposição não foi totalmente diferente daquele das substâncias individualmente. A atividade da AChE não foi modificada significativamente, indicando que a enzima parece não estar envolvida nesse aumento da ansiedade. Concluiu-se que apesar da exposição gestacional ao Cd, DM e ao Cd+DM provocar aumento no comportamento de ansiedade na prole, não ficou claro se houve um efeito potencializado sobre a ansiedade, quando da exposição à mistura de Cd+DM. Ainda, que pode ter havido reprogramação fetal para ansiedade já que o efeito neurocomportamental observado permaneceu até a idade adulta da prole, independentemente da presença do agente provocador, principalmente no grupo exposto ao DM.

**Palavras-chave:** cádmio, dimetoato, co-exposição a agentes ambientais, ansiedade, neurotoxicidade.

## ABSTRACT

In the last decades the levels of environmental contamination by heavy metals and insecticides increased significantly, following exponentially the fast and crescent industrial development leading to the simultaneous exposition to some chemical agents with action on the central nervous system (SNC). Under the toxicological point of view, co-exposure enhances qualitatively and quantitatively the damages produced and the irreversibility of the neurotoxicity processes. One of the most prevalent types of disorders on the SNC is the anxiety. The objective of this work was to study the gestational co-exposure to heavy metal cadmium (Cd) and organophosphate insecticide dimethoate (DM), and its influences on anxiety behavior of rats offspring during its development. Pregnant females were exposed during gestational period, by oral view, to the Cd solution (10 mg/l), DM (4 mg/kg, gavage), or Cd+DM. After birth were evaluated: offspring's physical and sensory-motor development in the first days of age, and anxiety behavior in the ages of 30 and 80 days, using open field arena (OF), elevated plus maze (EPM) and light-dark box (LDB) apparatus. Also were quantified Cd and DM in tissues and activity of the acetylcholinesterase enzyme (AChE) in blood and brain. The obtained results show that: co-exposition to chemical agents modified the physical development of the young rats; Cd, DM and Cd+DM increased the anxiety of the offspring in the young and adult age however, the increase of anxiety provoked for the co-exposure was not totally different of that observed with the substances individually. The activity of the AChE was not modified significantly, indicating that the enzyme seems not to be involved in this increase of the anxiety. It was concluded that although the gestational exposure to Cd, DM and to the Cd+DM to provoke increase in the behavior of anxiety in the offspring, were not clearly if had a potentialized effect on anxiety, due to Cd+DM exposure. Still, that it can have occurred fetal reprogramming for anxiety since the observed neurobehavioral effect remained until the adult age of the offspring, independently of the presence of provoking agent, mainly in the group exposed to DM.

**Key Words:** cadmium, dimethoate, co-exposure to environmental agents, anxiety, neurotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1. Exposição ao metal cádmio.....	03
1.2. Exposição ao inseticida dimetoato.....	05
<b>2. HIPÓTESES DE TRABALHO</b> .....	08
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	08
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	09
4.1. Animais.....	09
4.2. Procedimento Experimental.....	09
4.3. Grupos de tratamento para exposição “ <i>in útero</i> ”.....	09
4.4. Justificativa da escolha das doses utilizadas.....	09
4.5. Avaliações realizadas.....	10
4.5.1. Nas mães.....	10
4.5.2. Nos filhotes.....	10
4.5.2.1. Ao nascimento (dia pós-natal zero - DPN0).....	10
4.5.2.2. Durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (DPN1-DPN15).....	11
4.5.2.3. Durante as fases jovem (DPN30) e adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal.....	11
4.5.2.3.1. Avaliação do comportamento de ansiedade.....	11
4.5.2.4. Durante a fase adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal.....	14
4.5.2.4.1. Peso relativo do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração.....	14
4.6. Análise Estatística.....	14
<b>5. RESULTADOS</b> .....	15
5.1. Nas mães.....	15
5.1.1. Ganho de Peso das gestantes.....	15
5.1.2. Determinação de cádmio no sangue no 20º dia de gestação.....	15
5.1.3. Determinação de dimetoato no sangue no 20º dia de gestação.....	16
5.2. Nos filhotes.....	16
5.2.1. Evolução do peso corpóreo após o nascimento (DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21).....	16
5.2.2. Ao nascimento (dia pós-natal zero - DPN0).....	17
5.2.2.1. Número de filhotes/sexo/mãe e número de filhotes vivos/mortos.....	17
5.2.3. Durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (DPN1-15).....	18
5.2.3.1. Avaliação dos parâmetros iniciais físicos e sensorio-motores (DPN1-15).....	18
5.2.4. Durante as fases jovem (DPN30) e adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal.....	19
5.2.4.1. Avaliação do comportamento de ansiedade.....	19
5.2.4.2. Dosagem de Cd no sangue, cérebro e fígado dos animais.....	23
5.2.4.3. Dosagem de DM no sangue, cérebro e fígado dos animais.....	24
5.2.4.4. Dosagem da atividade da colinesterase sanguínea e cerebral.....	25
5.2.5. Durante a fase adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal.....	26
5.2.5.1. Peso relativo do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração.....	26
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	30
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os níveis de contaminação ambiental por metais pesados e inseticidas vêm aumentando significativamente, acompanhando o crescente desenvolvimento industrial. Estudos recentes têm demonstrado que, a co-exposição a substâncias químicas podem provocar danos sistêmicos nos organismos vivos, incluindo seres humanos, produzindo desde os efeitos mais simples normalmente observados, como quadros gastrintestinais, inflamação, cefaleia, até efeitos mais complexos como neurotoxicidade, desregulação endócrina e câncer. Sob o ponto de vista toxicológico, a co-exposição a substâncias químicas tende a piorar de forma qualitativa e quantitativa os danos produzidos e a irreversibilidade destes processos (Leret et al., 2003; Moser et al., 2005).

Pelo fato de inseticidas e metais pesados terem, em muitos casos, 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 sequelas permanentes e uma incidência diversa e mais alta de doenças. Somando-se à atividade industrial, a utilização cada vez maior de fertilizantes fosfatados em solo agrícola trás como consequência alto índice de contaminação das águas (a céu aberto e subterrânea) e do próprio solo, por metais como o cádmio, devido à contaminação destes fertilizantes pelo metal (Laudanski et al., 1991; Satarug et al., 2003).

Ao mesmo tempo, as capacidades atuais, principalmente dos países em desenvolvimento, de produzir e colher grandes quantidades de alimentos e com participação reduzida do trabalho humano, têm sido possíveis especialmente com o uso de praguicidas. Assim como em todo o mundo, as classes mais utilizadas de praguicidas no Brasil são as dos inseticidas, herbicidas e fungicidas. Em conjunto, estas três categorias representam bilhões de quilogramas de praguicidas usados anualmente, principalmente na agricultura (Jardim e Andrade, 2009). Segundo o Sindicato Nacional dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário (SINPAF, 2011) em 2008, o Brasil assumiu a liderança mundial no consumo de agroquímicos, posição antes ocupada pelos Estados Unidos.

Diante deste quadro e somando-se o fato de que o ser humano nunca se expõe a uma única substância e sim a uma variedade delas, a avaliação do risco de toxicidade por misturas de metais pesados e praguicidas agrícolas tem papel fundamental para o entendimento das situações de intoxicação bem como para a prevenção das mesmas.

A via de exposição materna é comumente observada em nosso meio e gera situações diversas e ainda não bem compreendidas de doenças que se desenvolvem de forma sutil e trazem agravos à saúde das populações expostas. Evidências obtidas através de estudos em humanos e animais sugerem que muitas doenças que se manifestam na idade adulta do indivíduo estão associadas a fatores ambientais durante a vida fetal, como consequência da plasticidade metabólica dos organismos e das reprogramações fetais que podem ocorrer, situação também denominada de toxicologia do desenvolvimento (Barker et al., 2002).

A toxicologia do desenvolvimento é um termo relativamente recente encontrado dentro da toxicologia reprodutiva (Udo, 2012). No entanto, ela tem suas raízes relacionadas à teratologia, termo utilizado antigamente para denominar alterações de ordem estrutural no conceito (Górniak et al., 2008), ligadas a perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal, estudando suas anomalias e malformações (Udo, 2012). De modo geral, a toxicologia reprodutiva dedica-se ao estudo de fatores que possam alterar o sistema reprodutor, o desenvolvimento do embrião e feto e o desenvolvimento pós-natal da prole (Santos, 2011).

Um dos efeitos prevalentes dos agentes químicos do tipo metais pesados e inseticidas organofosforados é o de provocar manifestações tóxicas sobre o sistema nervoso, denominado geralmente de efeito de neurotoxicidade. (Leret, 2003). Dentre os diversos efeitos neurotóxicos, a ansiedade é uma das desordens prevalentes e que preocupa bastante pelo fato de influenciar negativamente a saúde pública. De forma geral pode-se definir ansiedade como um estado psíquico de apreensão ou medo devido à antecipação de uma situação desagradável ou mesmo perigosa, acompanhado de sintomas somáticos de tensão (Angélico, 2009).

A ansiedade dentro de certos limites é natural e útil, uma vez que constitui um valioso recurso adaptativo e incita as pessoas a procurar e encontrar soluções positivas. Neste sentido é uma poderosa fonte de ação e evolução do próprio indivíduo. Quando a ansiedade atinge um valor extremo e caráter sistemático torna-se patológica. Neste caso, começa a haver alterações no funcionamento saudável da pessoa nas várias vertentes da vida (Hook, 2002).

Existem vários tipos de perturbação de ansiedade, como por exemplo, a ansiedade generalizada, as fobias, a perturbação de pânico, a perturbação obsessivo-compulsiva e a síndrome de estresse pós-traumático. Sabe-se que não existe um fator único que explique o aparecimento de determinada perturbação de ansiedade. De um modo geral, existem

fatores de natureza biológica e psicológica (acontecimento externos e conflitos internos) envolvidos no desenvolvimento desse transtorno (Angélico, 2009).

### **1.1. Exposição ao metal cádmio**

Muitos íons metálicos, incluindo o cádmio, exercem uma grande variedade de efeitos adversos sobre reprodução (sub-fertilidade em ambos os sexos, abortos, retardo do crescimento intra-uterino, malformações e defeitos congênitos), dificuldade no aprendizado, alterações comportamentais, envelhecimento prematuro, além de efeitos sobre o sistema nervoso central e glândula pituitária (Apostoli e Catalani, 2011).

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 principalmente por causa da sua baixa excreção do corpo e, se a exposição ambiental for contínua, as concentrações desse metal nos tecidos aumentam durante toda vida de forma cumulativa (Klaassen, 2001). Assim, exposição prolongada a ele tem sido ligada a diversos efeitos tóxicos visto que ele se acumula ao longo do tempo, em uma variedade de estruturas incluindo rins, fígado e SNC (Zadorozhnaja et al., 2000). Devido a sua alta liberação no ambiente, é provável que o cádmio no corpo humano aumente progressivamente no futuro. Em consequência, poderia provocar uma incidência mais alta de doenças.

Por ser absorvido através do contato com o solo, o cádmio aparece nas folhas da planta de tabaco (Yue, 1992; Bachelet et al., 2002) e está presente na fumaça do cigarro. Tem sido observado que, fumantes possuem elevada carga de cádmio no corpo (Wu et al., 1995; Jarup et al., 1998; Satarug e Moore, 2004).

Por outro lado, considerando os efeitos neurocomportamentais em longo prazo, da exposição ao cádmio *in utero* (Ali et al., 1986), o hábito de fumar em mulheres grávidas, o qual foi relatado ser maior que 20% na América do norte (NIH, 1996), contribui para o aparecimento de sérios problemas em saúde pública, relacionados ao desenvolvimento dos filhos de mães tabagistas. Baixo nível de exposição ao cádmio em mães no período da lactação levou a alterações dos níveis de serotonina no cérebro dos seus descendentes (Andersson et al., 1997).

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

O cádmio é mais tóxico para ratos recém-nascidos e jovens provavelmente devido às diferenças na integridade da barreira hemato-encefálica (Yargıçoğlu et al., 1997; Antonio et al., 2010). Contudo, este metal pode aumentar a permeabilidade desta barreira, penetrando e acumulando no cérebro de ratos em desenvolvimento e adultos (Méndez-Armenta e Ríos, 2007; Pari e Murugave 2007; Gonçalves et al., 2010), levando a acumulação intracelular cerebral, disfunções celulares e edema cerebral.

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 SNC, pois em estudos feitos com animais foram constatados hiperatividade motora, aumento do comportamento agressivo e prejuízos dos mecanismos de memória social.

Experimentos conduzidos por Ronco et al. (2011) fornecem, pela primeira vez, evidências experimentais demonstrando que a exposição ao cádmio durante o período da gravidez pode reprogramar o desenvolvimento cardiovascular da descendência que por sua vez pode conduzir a um risco aumentado de doenças cardiovasculares, a longo prazo.

Pesquisas desenvolvidas recentemente sobre o cádmio, em nossos laboratórios, têm colaborado para evidenciar alguns dos potenciais efeitos tóxicos deste metal pesado: ratos jovens os quais foram expostos durante quatro semanas ao cádmio tiveram aumento no comportamento de agressividade (Castilho et al., 2007); exposição perinatal a baixo nível de cádmio potencializou a neurotoxicidade subaguda pelo clorpirifós em ratos jovens (Azevedo et al., 2010); ratos expostos concomitantemente ao cádmio e ao estresse, tiveram aumento do comportamento de agressividade (Terçariol et al., 2011); exposição de ratos a baixas doses de cádmio durante a puberdade, mesmo por um curto período de tempo, interferiram na homeostase de epitélio-estroma da próstata, e esta perturbação foi um fator importante no aparecimento de lesões da próstata no final da vida (Lacorte et al., 2011); exposição ao Cd *in útero* e através da lactação afetou negativamente a qualidade do esperma de ratos adultos, evidenciado pelo comprometimento da morfologia e da motilidade do esperma, além do aumento da taxa de morte celular no testículo (Banzato et



al., 2012); ingestão de cafeína reduziu o acúmulo de cádmio total no organismo e aumentou os níveis de expressão de proteínas antioxidantes no epidídimo, sugerindo assim um efeito protetor contra este metal (Lacorte et al., 2013).

Experimentos de Leret et al. (2003) mostraram que filhotes adultos de fêmeas co-expostas ao chumbo e cádmio nos períodos da gestação e lactação, apresentaram aumento do comportamento de ansiedade. Os autores atribuíram este efeito às alterações nos níveis de dopamina e serotonina no hipocampo dos animais.

Gonçalves et al. (2012) estudando ratos recebendo cronicamente Cd por via oral observaram nos animais aumento do comportamento de ansiedade, aumento do Cd no cérebro, aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e diminuição da atividade da enzima Na, K-ATPase, no cérebro.

Também, o Cd pode afetar o grau e balanço da excitação-inibição da neurotransmissão sináptica bem como os níveis de antioxidantes no cérebro animal (Provias et al., 1994; Minami et al., 2001; Méndez-Armenta e Ríos, 2007). Entretanto, estudos em ratos mostraram um aumento do comportamento agressivo e de ansiedade, impedimento dos processos de aprendizado e memória e mudanças no desenvolvimento do sistema visual (Holloway e Thor, 1988; Yargıçoglu et al., 1997; Desi et al., 1998; Gonçalves et al., 2010; Terçariol et al., 2011). Alguns estudos sobre toxicidade do Cd têm encontrado uma associação entre distúrbios comportamentais e transmissão colinérgica visto que um aumento ou uma diminuição na atividade da AChE foi verificada em ambos, modelos animais e humanos que mostraram impedimentos comportamentais após exposição ao Cd (Pari e Murugavel, 2007; Gonçalves et al., 2010). Esta enzima hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina (ACh) na fenda sináptica das sinapses colinérgicas e junções neuromusculares (Soreq e Seidman, 2001).

Alterações na atividade da AChE tem sido observada em várias doenças e envenenamentos, incluindo efeitos neurocomportamentais, sugerindo que esta enzima poderia ser um importante parâmetro fisiológico e patofisiológico (Kaizer et al., 2005; Schmatz et al., 2009; Gonçalves et al., 2010).

## **1.2. Exposição ao inseticida dimetoato**

Praguicidas compreendem um grupo grande de agentes químicos com múltiplas finalidades. Um destes grupos é o dos inseticidas, substâncias utilizadas para controlar insetos (Larini, 1999). Juntamente com a ampla utilização de praguicidas no mundo, as preocupações sobre seus impactos na saúde estão crescendo rapidamente. Há um enorme

conjunto de evidências sobre a relação entre a exposição a eles e frequência elevada de doenças crônicas, tais como diferentes tipos de cânceres, diabetes, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer e Esclerose Lateral Amiotrófica), defeitos congênitos, distúrbios reprodutivos e distúrbios comportamentais (Mostafalou e Abdollahi, 2013).

Geralmente, a exposição humana a inseticidas pode resultar da exposição ambiental, ocupacional, acidental e/ou intencional. Dentre os inseticidas, a classe dos organofosforados (OF) é permitida para uso e estes compostos acabam sendo intencionalmente liberados no ambiente, levando a potenciais perigos para a saúde humana e animal. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 1 milhão de envenenamentos acidentais e de 2 milhões de suicídios com OF são relatados por ano, com mais de 300.000 mortes (Jeyaratnam, 1990).

Inseticidas organofosforados são substâncias capazes de provocar neurotoxicidade ao organismo de mamíferos devido ao seu conhecido efeito inibidor sobre a enzima AChE (Jamal et al., 2002). Exposição aguda a inibidores da colinesterase produz espectro bem definido de efeitos comportamentais em mamíferos que são geralmente bem explicados pela estimulação excessiva dos receptores colinérgicos nos sistemas nervosos, central e periférico (Ecobichon, 1996). Envenenamento agudo pode levar a desordens persistentes do sistema cognitivo, motor, sensorial e do domínio afetivo, sendo o comportamento de ansiedade um dos alterados pela exposição. Compensações para os efeitos neuroquímicos observados complicam a situação quando a exposição é prolongada, repetida ou quando ocorre exposição a múltiplos químicos (Moser et al., 2005). Porém, a questão do potencial de toxicidade com consequências a médio e longo prazo, permanece ainda, obscura.

Muitos modelos animais têm sido desenvolvidos para refletir muitos dos sinais e sintomas da exposição dos humanos, para ambas as exposições (agudas e crônicas), e assim gerar dados críticos para a caracterização e estudo destes efeitos. Neste sentido, exposição de animais experimentais a inseticidas organofosforados e agentes gasosos irritantes nervosos resultaram em alterações da atividade da colinesterase e receptores muscarínicos da acetilcolina em regiões cerebrais (Kobayashi et al., 2007) e, a longo prazo, aumento dos comportamentos de ansiedade e medo (Mamczarz et al., 2010; Moffett et al., 2011).

Recentemente, Braquenier et al. (2010) estudando a ansiedade de filhotes de ratos de fêmeas que receberam o inseticida organofosforado clorpirifós durante os períodos da gestação e lactação, utilizando o labirinto em cruz elevado e o teste da caixa claro-escuro,

observaram aumento de ansiedade na prole adulta (filhotes fêmeas). Os autores relatam que o efeito foi dependente da dose de exposição e o resultado pode estar relacionado com a diminuição da atividade da colinesterase cerebral.

Por causa da importância da ACh como um neurotransmissor no sistema nervoso de mamíferos, os agentes químicos que inibem a AChE podem exercer efeitos profundos nos comportamentos mediados pelo sistema colinérgico. Estes efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais, dependendo da dose e do grau de inibição da enzima e das condições fisiológicas do indivíduo exposto.

Dimetoato (O,O-Dimethyl-S-2-(methylamino)2-oxoethyl phosphoro-dithioate), o inseticida organofosforado escolhido para nosso estudo, tem moderada toxicidade humana (Who, 1989). Seu uso como inseticida e acaricida é difundido no Brasil e em vários países para o controle de grande variedade de insetos da lavoura e para controle de moscas no ambiente externo e no doméstico (Sayim, 2007). Para os seres humanos, o principal grupo de risco com altas taxas de exposição ao dimetoato são aqueles expostos ocupacionalmente (Sharma et al., 2005). A população de modo geral é exposta a menores níveis, possivelmente através dos alimentos, água e ar contaminados.

Alterações neurocomportamentais podem indicar perturbações no funcionamento do sistema nervoso e podem resultar da exposição a agentes químicos ambientais, tais como metais pesados e inseticidas. Testes neurocomportamentais são métodos quantitativos, não invasivos que podem medir uma ampla variedade de funções sensoriais, motoras e cognitivas, servindo assim como biomarcadores de efeito para agentes químicos ambientais que são capazes de provocar efeitos neurotóxicos. Neurotoxicidade durante o desenvolvimento constitui efeitos que ocorrem na prole principalmente como resultado da exposição da mãe durante a gravidez e/ou lactação (Andersen et al., 2000).

Acredita-se que as alterações metabólicas *in utero* podem estabelecer em longo prazo padrões fisiológicos e estruturais que o "programam" para a saúde ou doença, durante a vida adulta. Esta hipótese é atualmente conhecida como a hipótese de "origens do desenvolvimento da saúde e da doença" - DOHaD (Baker et al., 2007).

Nas últimas décadas, tem sido sugerido em várias áreas de pesquisa que eventos adversos ocorridos durante a vida intra-uterina têm efeito em longo prazo e podem reprogramar o desenvolvimento de órgãos e favorecer o aparecimento de doenças mais tarde na vida, quando há um impacto adicional do estilo de vida e outros fatores convencionais adquiridos, incluindo fatores de risco ambientais, que interagem com fatores genéticos (Ramírez-Vélez, 2012).

Oberlander (2012) relacionou uma série de evidências mostrando que a programação para a sinalização de serotonina fetal pode definir os caminhos para o comportamento e o desenvolvimento infantil e auxiliar na explicação das diferenças individuais observadas durante o desenvolvimento e na vida adulta.

Através de efeitos *in utero*, agentes químicos ambientais tais como metais pesados e praguicidas poderiam ser responsáveis por várias doenças, incluindo alterações comportamentais observadas durante o desenvolvimento que, por deixar uma marca, podem permanecer até a vida adulta do indivíduo.

## **2. HIPÓTESES DE TRABALHO**

1- Exposição animal e humana a mistura de agentes ambientais pode aumentar o caráter de neurotoxicidade destes agentes;

2- Exposição a agentes ambientais *in utero* altera a programação fetal para o comportamento de ansiedade o qual tende a permanecer por toda a vida do indivíduo.

## **3. OBJETIVOS**

1- Comparar experimentalmente se exposição à mistura dos compostos dimetoato e cádmio poderia se mostrar mais tóxica do que exposição aos dois compostos individualmente;

2- Estudar se a exposição gestacional aos compostos ambientais neurotóxicos dimetoato, cádmio e sua mistura, poderia influenciar a programação fetal para o comportamento de ansiedade;

3- Determinar se as possíveis alterações da ansiedade na prole jovem poderiam permanecer até a idade adulta dos animais;

4- Estudar se a atividade da enzima acetilcolinesterase poderia estar implicada nestas alterações.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (fêmeas e machos para o acasalamento), obtidos da colônia do Biotério Central da UNESP, câmpus de Botucatu. Os animais foram retirados do Biotério Central logo após o desmame (21 dias) e durante toda a fase experimental permaneceram no biotério do CEATOX, sob condições controladas de temperatura e umidade relativa, ciclo de luz de 12 horas claro/escuro, exaustão contínua, recebendo água e ração sem restrição, durante o período de aclimatação e crescimento, até atingirem a idade desejada (cerca de 80 dias de idade) para participarem nos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética institucional (protocolo nº 606/2014).

### 4.2. Procedimento Experimental

O acasalamento foi realizado colocando-se, numa mesma gaiola, três fêmeas com um macho; as fêmeas foram consideradas fecundadas, quando foram encontrados espermatozoides no líquido do lavado vaginal (considerado o dia zero da gestação).

### 4.3. Grupos de tratamento para exposição “*in útero*”

Para os tratamentos, 60 fêmeas prenhes foram divididas em quatro grupos experimentais de 15 animais cada um, recebendo um dos seguintes tratamentos:

- **Grupo I - controle** : animais que receberam água filtrada normal;
- **Grupo II - tratado**: animais que receberam solução de acetato de cádmio (10mg/l que corresponde a 2mg/kg), durante todo o período da gestação;
- **Grupo III - tratado**: animais que receberam dimetoato por gavage (4mg/kg), durante todo o período da gestação;
- **Grupo IV - tratado**: animais que receberam cádmio+dimetoato durante todo o período da gestação.

### 4.4. Justificativa da escolha das doses utilizadas

Para estudos de toxicidade neurocomportamental as doses utilizadas devem ser próximas do NOAEL/LOAEL, quando estes dados forem disponíveis uma vez que nem sempre o são, e distantes da DL50, para que as observações/avaliações possam ser feitas

adequadamente sem a interferência de efeitos de letalidade ou outros marcantes como, por exemplo, convulsões, tremores, etc., que possam confundir ou dificultar a quantificação neurocomportamental. As doses dos compostos utilizados foram selecionadas de acordo com aquelas utilizadas previamente em trabalhos reportados na literatura e extremamente inferiores a DL50 desses compostos.

A dose de Cd de 10mg de Cd<sup>++</sup>/litro pela água de beber que corresponde a 2mg/Kg foi escolhida porque a exposição materna a esta dose foi capaz de alterar o sistema nervoso dos filhotes durante o desenvolvimento, provocando distúrbios neuroquímicos nos sistemas serotoninérgicos e aminoacidérgicos, além de não causar nenhum efeito tóxico aparente nas gestantes. (Antonio et al., 2010).

A dose de dimetoato de 4mg/kg foi escolhida baseada no trabalho de Srivastava e Raizada (1996) os quais demonstraram que nenhum efeito tóxico, em ratas prenhes, foi observado em doses de até 30 mg/kg de dimetoato.

As doses escolhidas foram extremamente inferiores a DL50 dos dois compostos, que é de 88mg/kg para o cádmio e 250mg/kg para o dimetoato (Merck, 1996).

#### **4.5. Avaliações realizadas**

##### 4.5.1. Nas mães:

Durante o período de gestação e lactação foram avaliados semanalmente o ganho de peso corporal, a ingestão de líquido (2 vezes por semana), a ingestão de ração (2 vezes por semana), sinais clínicos como comportamento e reflexos (piloereção, agressividade, formação de ninho e manutenção dos filhotes no mesmo, forma de manuseio e tratamento dos filhotes, etc.) e mortalidade; dosagem do teor de Cd (espectrofotometria de absorção atômica) e DM (cromatografia gasosa) no sangue, no 20º dia de gestação.

##### 4.5.2. Nos filhotes:

Para o estudo da toxicidade comportamental, foi utilizado um filhote de cada fêmea, às vezes dois (para evitar qualquer tendência) para a formação dos grupos relativos à avaliação para cada tratamento.

##### **4.5.2.1. Ao nascimento (dia pós-natal zero - DPN0):**

O número de filhotes/sexo/mãe; eventualmente o número de filhotes vivos/mortos; o peso médio; eventuais alterações da integridade física macroscópica. Em seguida, os

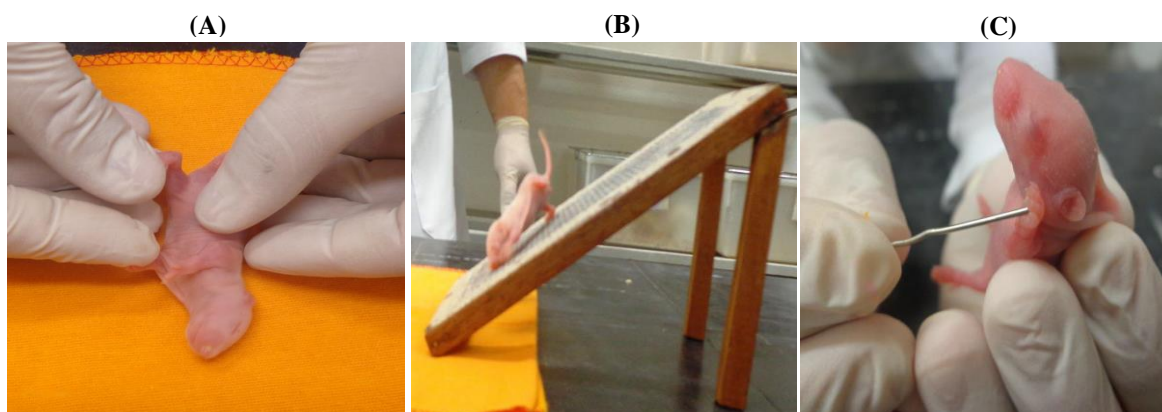
filhotes foram ajustados para oito filhotes por mãe (como a intenção do projeto foi fazer um estudo apenas com os filhotes machos, filhotes fêmeas apenas foram utilizados para completar cada ninhada para oito filhotes, quando necessário).

#### 4.5.2.2. Durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (DPN1-DPN15):

Diariamente foi observado nos filhotes, o desenvolvimento físico (que incluiu: ganho de peso corporal, descolamento das orelhas, abertura dos olhos, erupção dos incisivos, aparecimento de pelos) e o desenvolvimento sensório-motor (que incluiu o aparecimento dos reflexos de endireitamento ou postural, de geotaxia negativa, e o desaparecimento do reflexo de preensão palmar) (Alder e Zbinden, 1977) (Figuras 1 e 2).



**Figura 1** - Avaliação do desenvolvimento físico através do ganho de peso corporal (A), descolamento das orelhas (B), abertura dos olhos (C), erupção dos incisivos (D) e aparecimento de pelos (E). **Fonte:** Arquivo pessoal.



**Figura 2** - Avaliação do desenvolvimento sensório-motor através dos reflexos de endireitamento (A), geotaxia negativa (B) e preensão palmar (C). **Fonte:** Arquivo pessoal

#### 4.5.2.3. Durante as fases jovem (DPN30) e adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal:

##### 4.5.2.3.1. Avaliação do comportamento de ansiedade

- Utilizando a arena de campo aberto - ACA:

A atividade geral dos animais foi avaliada segundo metodologia descrita em Trombini et al. (2001) por meio de observação direta em arena de campo aberto, aparelho construído conforme especificado por Broadhurst (1960), para observação do estado de emocionalidade dos animais. Após colocado o animal no centro da arena, foram avaliados o tempo que o animal permaneceu circulando pela arena junto às paredes sem cruzar o centro da arena e o número de cruzamentos pelo centro da arena. A dificuldade do animal em abandonar a proteção da parede da arena e cruzar o centro, reflete a ansiedade aumentada. Ao final de cada sessão com cada animal na arena de campo aberto o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor (Figura 3).



**Figura 3** - Arena de Campo Aberto. **Fonte:** Arquivo pessoal

- Utilizando o labirinto em cruz elevado - LCE:

LCE - Este teste utilizou a metodologia que foi descrita por Pellow e Chopin (1985) e convalidada por Pellow e File (1986), para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo de permanência e número de entradas nos braços fechados do aparelho, levando em conta que na condição de ansiedade o animal interage mais com os braços fechados do aparelho, ou seja, entra mais e dispõe mais tempo nos mesmos. Ao final de cada sessão com cada animal no labirinto em cruz elevado, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor (Figura 4).





**Figura 4** - Labirinto em Cruz Elevado. **Fonte:** Arquivo pessoal

- Utilizando a caixa claro/escuro - CCE:

O aparelho usado para o teste de exploração claro/escuro (Costall et al., 1989; Bourin e Hascoet, 2002) consiste de uma caixa com dois compartimentos: um compartimento iluminado (45x40x25cm), com as paredes circundantes e piso pintados de branco, e um compartimento escuro (34x40x25cm) com as paredes circundantes e piso pintados de preto. O compartimento claro é iluminado (luz de 80W) e o escuro recebe apenas iluminação da sala (luz de 20W). O piso do compartimento claro é dividido em 12 quadrados iguais por linhas pretas e o compartimento escuro é dividido em 9 quadrados iguais por linhas brancas. Os dois compartimentos são separados por uma divisória com uma abertura para permitir a passagem de um compartimento para o outro. A caixa tem um painel de acrílico transparente de um lado para facilitar a observação do rato. Para o teste, os ratos foram cuidadosamente colocados no canto do compartimento iluminado, de frente para a parede oposta à abertura e foram observados por 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: (1) tempo de latência para a primeira travessia para o compartimento escuro (quanto menor a latência, maior a ansiedade); (2) o número de transições entre os compartimentos claro e escuro do aparelho (quanto mais transições, maior a ansiedade); (3) o tempo total gasto na parte iluminada da gaiola (quanto menor o tempo gasto na parte iluminada do aparelho, maior a ansiedade); (4) o índice de comportamento de avaliação de risco - RA, ou seja, o número de vezes que o animal no compartimento escuro explorou o compartimento iluminado (quanto maior o RA, maior é a ansiedade). Ao final de cada sessão com cada animal na CCE, o aparelho foi limpo com algodão embebido em álcool etílico (5%, v/v) para eliminar os vestígios do animal antecessor (Figura 5).



**Figura 5** - Caixa claro/escuro. **Fonte:** Arquivo pessoal

4.5.2.3.2. Dosagem de Cd no sangue, cérebro e fígado dos animais foi feita por espectrofotometria de absorção atômica, de acordo com metodologia preconizada por Roberts e Clark (1986).

4.5.2.3.3. Dosagem de DM no sangue, cérebro e fígado dos animais foi feita por cromatografia gasosa, de acordo com metodologia preconizada por Van der Hoff e Van Zoonen (1999).

4.5.2.3.4. Dosagem da atividade da colinesterase sanguínea e cerebral foi realizada através de kits específicos disponíveis no mercado e que tem por princípio químico, as reações desenvolvidas na metodologia espectrofotométrica descrita por Ellman et al. (1961).

#### **4.5.2.4. Durante a fase adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal:**

##### **4.5.2.4.1. Peso relativo do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração**

O peso relativo consiste em dividir o peso do órgão de interesse pelo peso total do animal. Foram calculados os pesos relativos dos cérebros, fígados, baços, rins, testículos e corações da prole com 80 dias de idade nos diferentes grupos experimentais e posteriormente comparados.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os dados coletados nas análises e os dados de comportamento foram comparados estatisticamente através de Análise de Variância (ANOVA), com medidas repetidas, complementado com o teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa INSTAT (Software

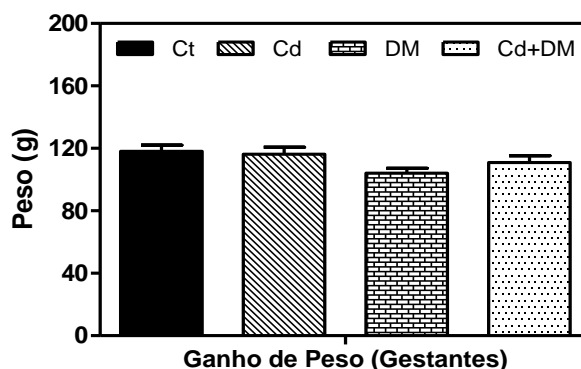
estatístico GraphPad Prism version 3.00 for Windows, San Diego - Califórnia, EUA) (Snedecor e Cochran, 1980).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Nas mães:

#### 5.1.1. Ganho de Peso das gestantes

O ganho de peso corpóreo das mães durante a gestação não apresentou nenhuma diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento (Figura 6).



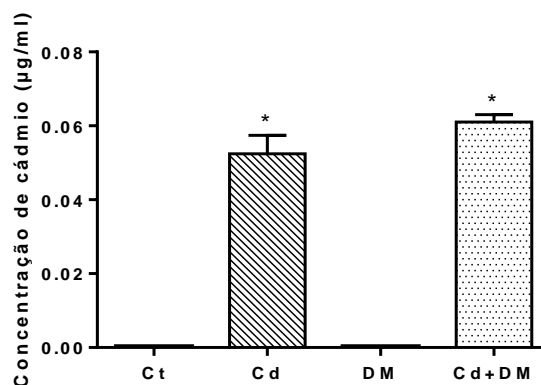
**Figura 6** - Ganho de peso corpóreo das mães durante o período de gestação (n=15 animais/grupo). Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

Ainda se tratando das mães, durante o período de gestação nenhum animal apresentou qualquer alteração de sinais clínicos como comportamento e reflexos (piloereção, agressividade, formação de ninho e manutenção dos filhotes no mesmo, forma de manuseio e tratamento dos filhotes, etc.). Também não houve nenhum animal morto durante o período da gestação, em que ocorreram as exposições. Quanto à ingestão de água e ração, durante a gestação, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais.

#### 5.1.2. Determinação de cádmio no sangue das mães, no 20º dia de gestação

Os dados mostraram a presença de cádmio no sangue das gestantes expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato durante a gestação. Foi observada diferença significativa

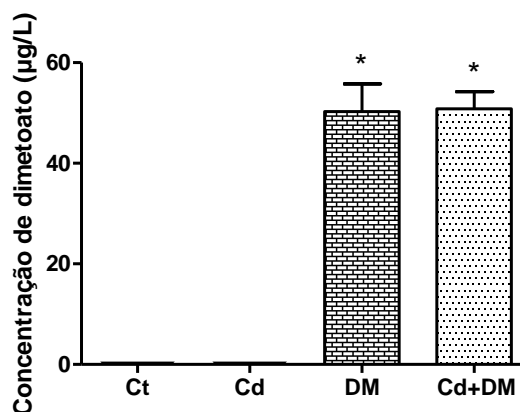
entre os grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato (Figura 7).



**Figura 7** - Concentração de cádmio no sangue das mães no 20º dia de gestação (n=5 animais/grupo). Os valores expressam a média ± E.P.M. (ANOVA), \*p<0,05 em relação ao Ct e DM. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

### 5.1.3. Determinação de dimetoato no sangue no 20º dia de gestação

Os dados mostraram a presença de dimetoato no sangue das gestantes expostas ao dimetoato e ao cádmio+dimetoato durante a gestação. Foi observada diferença significativa entre os grupos dimetoato e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e cádmio (Figura 8).

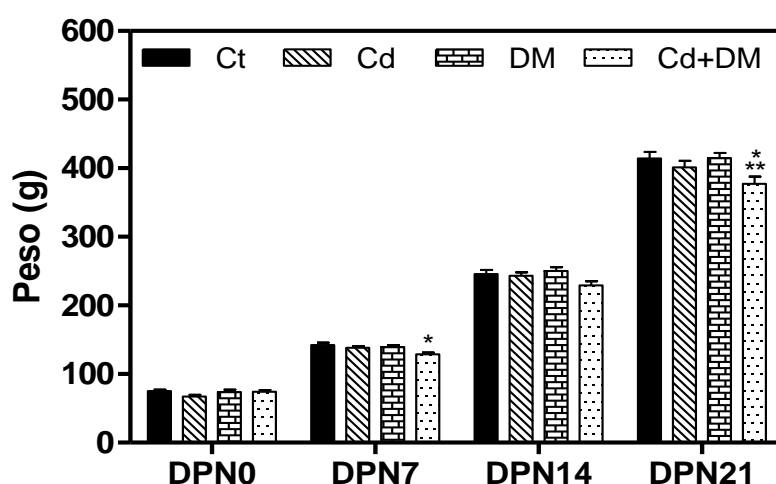


**Figura 8** - Concentração de dimetoato no sangue das mães no 20º dia de gestação (n=5 animais/grupo). Os valores expressam a média ± E.P.M. (ANOVA), \*p<0,05 em relação ao Ct e Cd. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

## 5.2. Nos filhotes:

### 5.2.1. Evolução do peso corpóreo após o nascimento (DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21)

No dia pós-natal 0 (DPN0), ou seja, no dia do nascimento, o peso médio dos filhotes não apresentou diferenças significativas nos diferentes grupos de exposição. No dia pós-natal 7 (DPN7), foi observada redução do peso corpóreo dos filhotes do grupo cádmio+dimetoato, quando comparado ao grupo controle. No dia pós-natal 14 (DPN14), o peso médio dos filhotes não apresentou diferenças significativas nos diferentes grupos de exposição. E no dia pós-natal 21 (DPN21), foi observada redução significativa do peso corpóreo dos filhotes do grupo cádmio+dimetoato, quando comparados aos grupos controle e dimetoato (Figura 9).



**Figura 9** - Peso médio dos filhotes no DPN0, DPN7, DPN14 e DPN21 (n=15 animais/grupo). Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct; \*\* $p < 0,05$  em relação ao DM. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

## 5.2.2. Ao nascimento (dia pós-natal zero - DPN0):

### 5.2.2.1. Número de filhotes/sexo/mãe e número de filhotes vivos/mortos

O número de filhotes por mãe, bem como o sexo dos filhotes por mãe e ainda o número de filhotes vivos e mortos, nos diferentes grupos, podem ser observados na tabela abaixo (Tabela 1). Não houve diferenças significativas nos diferentes grupos experimentais nos diferentes parâmetros analisados.

**Tabela 1** - N° de filhotes/sexo/mãe e N° de filhotes vivos/mortos nos diferentes grupos de exposição. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA).

GRUPOS (n=15)	N° de filhotes nascidos		Sexo	
	Vivos	Mortos	Machos	Fêmeas
Controle	11,33 $\pm$ 0,47	0,20 $\pm$ 0,14	6,13 $\pm$ 0,53	5,20 $\pm$ 0,50
Cádmio	10,93 $\pm$ 0,52	0,06 $\pm$ 0,06	6,00 $\pm$ 0,46	4,93 $\pm$ 0,39
Dimetoato	12,53 $\pm$ 0,50	0,06 $\pm$ 0,06	6,86 $\pm$ 0,52	5,66 $\pm$ 0,44
Cádmio+Dimetoato	12,33 $\pm$ 0,51	0,06 $\pm$ 0,06	5,86 $\pm$ 0,47	6,46 $\pm$ 0,32

### 5.2.3. Durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal (DPN1-15):

#### 5.2.3.1. Avaliação dos parâmetros iniciais físicos e sensório-motores (DPN1-15)

Quanto aos parâmetros sensório-motores, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Já nos parâmetros físicos, os filhotes dos grupos dimetoato e cádmio+dimetoato mostraram retardo para o aparecimento dos dentes incisivos quando comparados aos filhotes do grupo cádmio, mas não quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2** - Avaliação de parâmetros iniciais físicos e sensório-motores de filhotes de mães do grupo controle e expostas aos diversos tratamentos durante a gestação. Os valores expressam a média dos dias  $\pm$  E.P.M. (ANOVA).

Parâmetro (dias)	Ct (n=15)	Cd (n=15)	DM (n=15)	Cd+DM (n=15)
Reflexo de endireitamento	3,56 $\pm$ 0,30	3,56 $\pm$ 0,30	4,11 $\pm$ 0,32	4,38 $\pm$ 0,27
Preensão palmar <sup>Ψ</sup>	4,33 $\pm$ 0,25	4,31 $\pm$ 0,23	5,05 $\pm$ 0,30	5,07 $\pm$ 0,23
Geotaxia negativa	8,31 $\pm$ 0,25	7,68 $\pm$ 0,25	8,46 $\pm$ 0,31	8,53 $\pm$ 0,18
Descolamento das orelhas	3,68 $\pm$ 0,27	3,50 $\pm$ 0,29	4,11 $\pm$ 0,32	4,38 $\pm$ 0,27
Abertura dos olhos	13,87 $\pm$ 0,19	13,81 $\pm$ 0,14	13,83 $\pm$ 0,14	13,84 $\pm$ 0,13
Erupção dos incisivos	8,81 $\pm$ 0,21	8,43 $\pm$ 0,25	9,55 $\pm$ 0,28*	9,38 $\pm$ 0,15*
Aparecimento de pelos	4,93 $\pm$ 0,15	4,81 $\pm$ 0,18	5,05 $\pm$ 0,17	5,30 $\pm$ 0,16

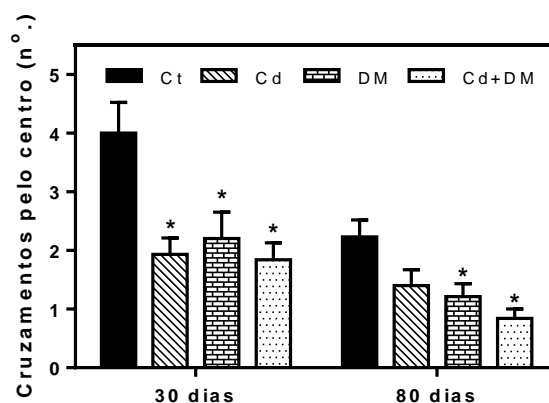
\* $p < 0,05$  em relação ao grupo cádmio; Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato  
 Ψ O reflexo de prensão palmar é o único com o qual os animais nascem e depois perdem, durante o seu desenvolvimento.

#### 5.2.4. Durante as fases jovem (DPN30) e adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal:

##### 5.2.4.1. Avaliação do comportamento de ansiedade

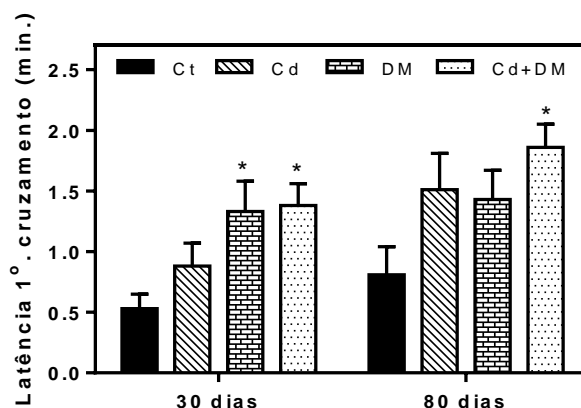
###### - Utilizando a arena de campo aberto - ACA:

Houve uma redução significativa no número de cruzamentos pelo centro da arena nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Com 80 dias de idade, houve uma redução significativa no número de cruzamentos pelo centro da arena nos grupos dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle (Figura 10).



**Figura 10** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15animais/grupo), na ACA. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

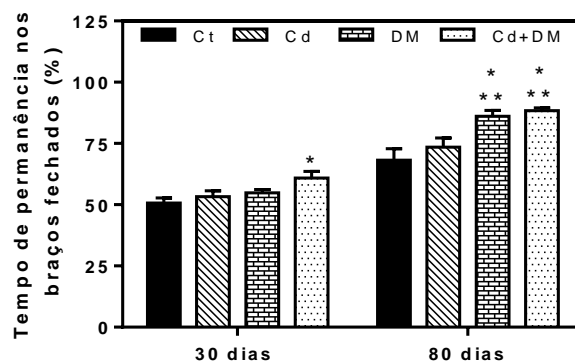
Quanto à latência para o primeiro cruzamento, houve um aumento significativo na latência dos grupos dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Com 80 dias de idade, apenas o grupo cádmio+dimetoato apresentou um aumento significativo da latência para o primeiro cruzamento em relação ao grupo controle (Figura 11).



**Figura 11** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), na ACA. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

#### - Utilizando o labirinto em cruz elevado - LCE:

Houve um aumento significativo no tempo de permanência nos braços fechados do aparelho no grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Já na prole com 80 dias de idade houve um aumento significativo no tempo de permanência nos braços fechados do aparelho nos grupos dimetoato e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e cádmio (Figura 12).

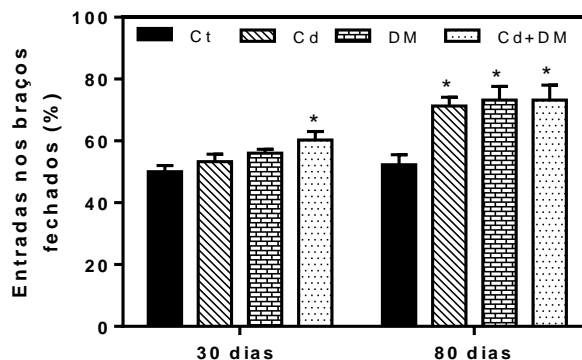


**Figura 12** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), no LCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct; \*\* $p < 0,05$  em relação ao Cd. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

Quanto ao número de entradas nos braços fechados do aparelho, houve um aumento significativo no grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Já na prole com 80 dias de idade houve um aumento significativo no número



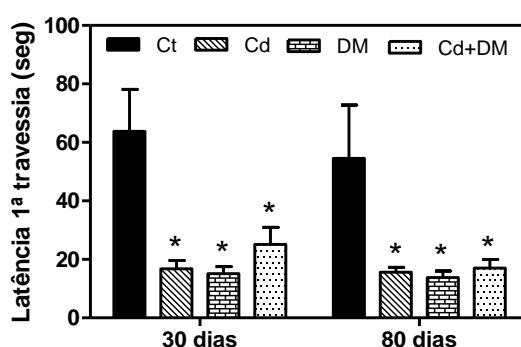
de entradas nos braços fechados do aparelho nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle (Figura 13).



**Figura 13** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), no LCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \*p<0,05 em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

#### - Utilizando a caixa claro/escuro - CCE:

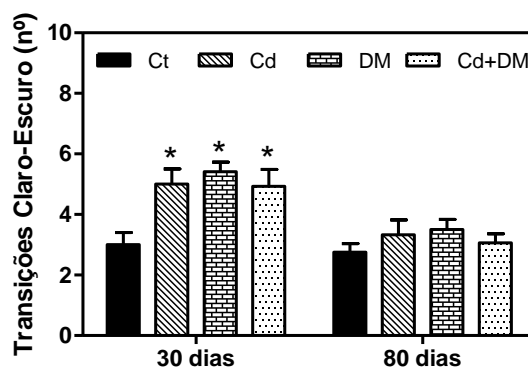
Houve diminuição significativa na latência para primeira travessia nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Na prole com 80 dias de idade, também houve diminuição significativa na latência para primeira travessia nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle (Figura 14).



**Figura 14** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratas no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), na CCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \*p<0,05 em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

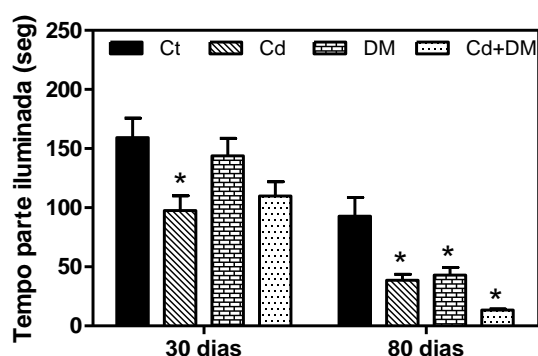
Quanto ao parâmetro do número de transições do compartimento claro para o compartimento escuro, houve um aumento significativo no número de transições nos

grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle na prole com 30 dias de idade. Já na prole com 80 dias de idade, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 15).



**Figura 15** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratos no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), na CCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

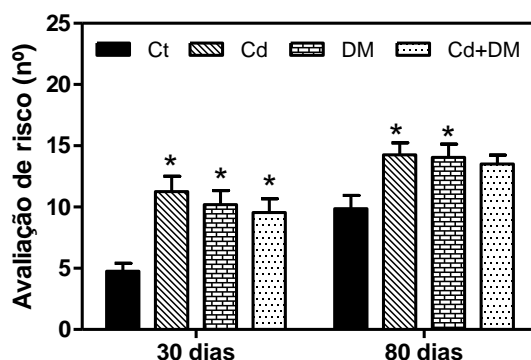
No terceiro parâmetro analisado, tempo gasto na parte iluminada do aparelho, houve diminuição significativa do tempo gasto na parte iluminada no grupo cádmio em relação ao grupo controle, isso na prole com 30 dias de idade. Na prole com 80 dias de idade, houve diminuição significativa do tempo gasto na parte iluminada do aparelho nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle (Figura 16).



**Figura 16** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratos no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), na CCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \* $p < 0,05$  em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

E por fim, no último parâmetro analisado do aparelho, denominado avaliação de risco, houve aumento significativo da avaliação de risco nos grupos cádmio, dimetoato e cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle, isso na prole com 30 dias de idade. Na

prole com 80 dias de idade, houve aumento significativo do número de avaliações de risco nos grupos cádmio e dimetoato em relação ao grupo controle (Figura 17).



**Figura 17** - Efeito da exposição ao Cd e DM em ratos no período gestacional, sobre o comportamento de ansiedade na prole (n=15 animais/grupo), na CCE. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA), \*p<0,05 em relação ao Ct. Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

#### 5.2.4.2. Dosagem de Cd no sangue, cérebro e fígado dos animais

Foi realizada a dosagem de cádmio no sangue, cérebro e fígado da prole, tanto na idade jovem (DPN30) quanto na idade adulta (DPN80).

Os dados mostraram a presença de cádmio no sangue da prole com 30 dias de idade nos grupos em que as mães foram expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio nos grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato. Também houve um aumento significativo da quantidade de cádmio encontrado no grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo cádmio. Na prole com 80 dias de idade, os dados mostraram a presença de cádmio no sangue nos grupos em que as mães foram expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio dos grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato (Tabela 3).

No cérebro, os dados mostraram a presença de cádmio na prole com 30 dias de idade nos grupos em que as mães foram expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio nos grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato. Também houve um aumento significativo da quantidade de cádmio encontrado no grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo cádmio. Na prole com 80 dias de idade, os dados mostraram a presença de cádmio no cérebro do grupo em que as mães foram expostas ao cádmio. Já no grupo em que as mães foram expostas ao cádmio+dimetoato a quantidade de cádmio

encontrada no cérebro foi insignificante. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio encontrada no grupo cádmio em relação aos grupos controle, dimetoato e cádmio+dimetoato (Tabela 3).

No fígado, os dados mostraram a presença de cádmio na prole com 30 dias de idade nos grupos em que as mães foram expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio dos grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato. Na prole com 80 dias de idade, os dados mostraram a presença de cádmio no fígado dos grupos em que as mães foram expostas ao cádmio e ao cádmio+dimetoato. Houve diferença significativa na quantidade de cádmio nos grupos cádmio e cádmio+dimetoato em relação aos grupos controle e dimetoato. Também houve um aumento significativo da quantidade de cádmio encontrado no grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo cádmio (Tabela 3).

**Tabela 3** - Concentração de cádmio no sangue, cérebro e fígado da prole com 30 e 80 dias de idade. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA).

TECIDO ( $\mu\text{g/ml}$ )	Controle	Cádmio	Dimetoato	Cádmio+Dimetoato
<b>Sangue (30 dias)</b>	0	0,125 $\pm$ 0,016*	0	0,231 $\pm$ 0,039* <sup>&amp;</sup>
<b>Sangue (80 dias)</b>	0	0,048 $\pm$ 0,003*	0	0,046 $\pm$ 0,004*
<b>Cérebro (30 dias)</b>	0	0,061 $\pm$ 0,018*	0	0,117 $\pm$ 0,009* <sup>&amp;</sup>
<b>Cérebro (80 dias)</b>	0	0,045 $\pm$ 0,010 <sup>#</sup>	0	0,013 $\pm$ 0,007
<b>Fígado (30 dias)</b>	0	0,204 $\pm$ 0,014*	0	0,208 $\pm$ 0,010*
<b>Fígado (80 dias)</b>	0	0,176 $\pm$ 0,015*	0	0,223 $\pm$ 0,006* <sup>&amp;</sup>

\*p<0,05 em relação aos grupos controle e dimetoato

<sup>&</sup>p<0,05 em relação ao grupo cádmio

<sup>#</sup>p<0,05 em relação aos grupos controle, dimetoato e cádmio+dimetoato

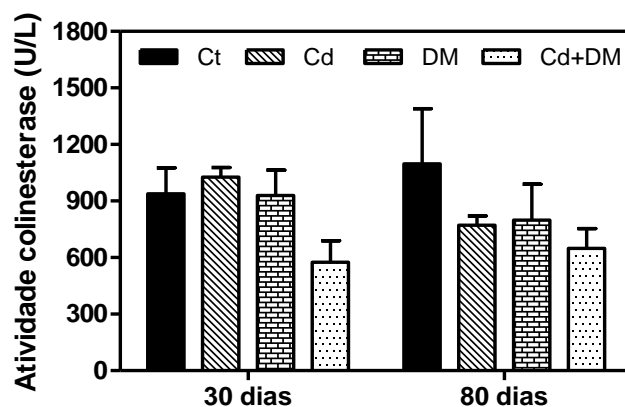
#### 5.2.4.3. Dosagem de DM no sangue, cérebro e fígado dos animais

Foi realizada a dosagem de dimetoato no sangue, cérebro e fígado da prole, tanto na idade jovem (DPN30) quanto na idade adulta (DPN80). Tanto no sangue, quanto no cérebro e fígado dos animais jovens e adultos não foi detectado DM (ao nível de ppb) em nenhum dos grupos experimentais.

#### 5.2.4.4. Dosagem da atividade da colinesterase sanguínea e cerebral

##### - Sanguínea:

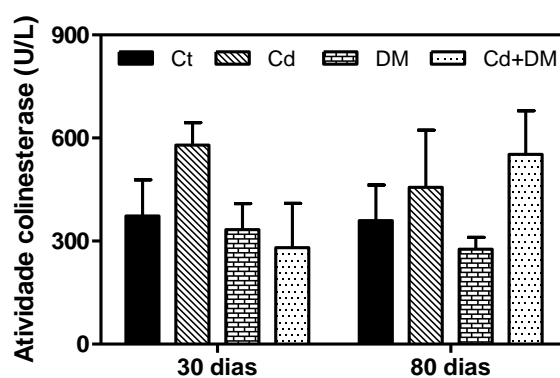
Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais quanto à atividade da enzima colinesterase no sangue, tanto na prole jovem, com 30 dias de idade, quanto na prole adulta, com 80 dias de idade (Figura 18).



**Figura 18** - Atividade da colinesterase sanguínea na prole com 30 e 80 dias de idade (n=5 animais/grupo). Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

##### - Cerebral:

Não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais quanto à atividade da enzima colinesterase no cérebro, tanto na prole jovem, com 30 dias de idade, quanto na prole adulta, com 80 dias de idade (Figura 19).



**Figura 19** - Atividade da colinesterase cerebral na prole com 30 e 80 dias de idade (n=5 animais/grupo). Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA). Ct=controle; Cd=cádmio; DM=dimetoato; Cd+DM=cádmio+dimetoato.

## 5.2.5. Durante a fase adulta (DPN80) de desenvolvimento pós-natal:

### 5.2.5.1. Peso relativo do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração

A tabela abaixo (Tabela 4) compara os pesos relativos de diferentes órgãos nos diferentes grupos experimentais. Se tratando do peso relativo do cérebro, houve uma diminuição significativa dos grupos cádmio e dimetoato em relação ao grupo controle. No baço, houve diminuição significativa do peso relativo do grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle. Da mesma forma, os rins apresentaram diminuição significativa do peso relativo do grupo cádmio+dimetoato em relação ao grupo controle. E por fim, o coração apresentou diminuição significativa do peso relativo no grupo cádmio+dimetoato quando comparado ao grupo cádmio.

**Tabela 4** - Peso relativo (mg) do cérebro, fígado, baço, rins, testículos e coração da prole com 80 dias de idade, provinda de mães do grupo controle e expostas ao cádmio (Cd), dimetoato (DM) e cádmio+dimetoato (Cd+DM) durante a gestação. Os valores expressam a média  $\pm$  E.P.M. (ANOVA).

Órgãos	Controle (n=10)	Cd (n=10)	DM (n=10)	Cd+DM (n=10)
Cérebro	0,48 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01*	0,37 $\pm$ 0,01*	0,44 $\pm$ 0,02
Fígado	4,43 $\pm$ 0,15	4,37 $\pm$ 0,17	4,32 $\pm$ 0,13	4,11 $\pm$ 0,14
Baço	0,19 $\pm$ 0,008	0,16 $\pm$ 0,008	0,16 $\pm$ 0,005	0,15 $\pm$ 0,004*
Rins	0,79 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,01*
Testículos	0,79 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02
Coração	0,30 $\pm$ 0,009	0,33 $\pm$ 0,010	0,30 $\pm$ 0,007	0,29 $\pm$ 0,011**

\*p<0,05 em relação ao grupo Ct; \*\*p<0,05 em relação ao grupo Cd.

## 6. DISCUSSÃO

Evidências experimentais e observações em humanos sugerem que a exposição simultânea a poluentes podem potencializar a toxicidade dos componentes individuais sobre funções importantes do organismo (Chen, 2013). Sabe-se que a exposição gestacional do SNC a baixos níveis de cádmio ou dimetoato está correlacionada com alterações comportamentais e cognitivas que podem perdurar até a idade adulta do indivíduo

(Finkelstein, 1998). No entanto, os efeitos combinados do Cd e DM são pouco estudados, sobretudo em relação aos conceitos da programação fetal e baixas dosagens.

Como esperado, encontrou-se cádmio no sangue das gestantes apenas nos grupos em que elas foram expostas somente ao Cd ou ao Cd+DM. O fato de os níveis sanguíneos de Cd nas mães não se alterar nestes dois grupos de tratamento, indica que provavelmente o DM não modificou parâmetros da cinética do Cd durante o período da exposição. Neste mesmo sentido o observado com o DM também segue o mesmo perfil. A presença de baixos níveis do Cd e do DM no sangue das mães confirma a exposição gestacional.

Durante o período de exposição das mães não se observou qualquer tipo de alteração nas mesmas, incluindo todo o processo gestacional. Um dos óbvios sinais de toxicidade materna é a perda de peso. Além disso, alterações na homeostase materna, poderia indiretamente interferir com o desenvolvimento dos filhotes (Salvatori et al., 2004). A não ocorrência de sinais de toxicidade materna sugere que qualquer alteração encontrada nos filhotes ocorreu devido à exposição aos agentes estudados.

No presente estudo foram observadas alterações no desenvolvimento físico dos filhotes referentes ao ganho de peso e ao aparecimento dos incisivos, com especial ênfase nos grupos expostos ao Cd+DM. É provável que a carga corpórea dos agentes químicos nos filhotes, recebida cineticamente através das mães, possa ter provocado alterações sobre a homeostasia e maturação do organismo dos mesmos. Efeitos pós-natais mediados por agentes químicos encontrados no leite materno podem provocar desenvolvimento físico alterado nos filhotes (Salvatori et al., 2004). Outras causas geradoras de deficiência do desenvolvimento físico poderiam ser, por exemplo, efeitos tóxicos de agentes químicos sobre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e sobre glicocorticoides (Seckl e Holmes, 2007). Nossos experimentos não discriminam sobre estes acontecimentos e isto poderia ser investigado futuramente.

O fato de neste estudo não terem sido observadas alterações dos parâmetros sensório-motores pode indicar que os efeitos que poderiam ser observados por ação *in útero*, não ocorreram ou foram de muito baixa intensidade. Na literatura corrente existem observações que comprovam esta sugestão (Górniak et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que ratos expostos ao Cd, ao DM e ao Cd+DM tiveram alterações de comportamento as quais são sugestivas de ansiedade. Assim como observado neste trabalho, outros autores também observaram alterações do comportamento de ansiedade em animais expostos ao Cd (Leret et al., 2003; Braquenier et al., 2010) ou ao DM (Gonçalves et al., 2012) porém, ainda faltam

experimentos que relacionem efeitos comportamentais em animais expostos simultaneamente a estes dois agentes.

O conjunto dos resultados da avaliação do comportamento de ansiedade utilizando ACA, LCE e CCE sugerem que na idade de 30 e 80 dias, os animais apresentaram aumento da ansiedade, tanto nos grupos que as mães foram expostas ao Cd quanto nos grupos que as mães foram expostas ao DM. Estas observações corroboram com as de Gonçalves et al. (2012) que estudando ratos recebendo cronicamente Cd por via oral também observaram nos animais aumento da ansiedade. Corroboram também com as observações de Mamczarz et al. (2010) que expondo ratos cronicamente a um inseticida organofosforado, percebeu um aumento significativo do comportamento de ansiedade desses animais.

Braquenier et al. (2010) estudando a ansiedade da prole de fêmeas que receberam um inseticida organofosforado, o clorpirifós, durante os períodos da gestação e lactação, observaram aumento de ansiedade na prole adulta utilizando o labirinto em cruz elevado e o teste da caixa claro-escuro. Este efeito foi dependente da dose de exposição e os autores sugerem que o resultado pode estar relacionado com a diminuição da atividade da colinesterase cerebral.

Os resultados também sugerem de forma geral, que a co-exposição ao Cd+DM não parece ter sido mais ansiogênica que a exposição só ao Cd ou só ao DM. Apesar disso, em alguns poucos parâmetros, o grupo da co-exposição foi o único que apresentou um aumento significativo da ansiedade, sugerindo assim que a mistura poderia ser mais crítica para esse efeito neurocomportamental. Neste mesmo sentido Leret et al. (2003), trabalharam com co-exposição de metais pesados e observaram que filhotes adultos de fêmeas expostas à mistura de chumbo e cádmio, nos períodos da gestação e lactação, também apresentaram aumento do comportamento de ansiedade. Os autores atribuíram este efeito às alterações do nível de dopamina e serotonina no hipocampo dos animais.

Sabe-se que a principal propriedade toxicológica do cádmio é a sua meia-vida longa (10-30 anos) e, desse modo, sua taxa de excreção é baixa, e se torna ineficiente. Portanto, se a exposição ambiental for contínua, as concentrações de cádmio nos tecidos tendem a aumentar de forma cumulativa (Alissa, 2011).

O cádmio é um metal tóxico e cancerígeno, amplamente distribuído no ambiente, que depois de absorvido acumula irreversivelmente em locais do organismo como, por exemplo, fígado e cérebro (Bachelet, 2002). Os dados do presente estudo confirmam o caráter bioacumulativo do Cd uma vez que, após a determinação das concentrações de cádmio no sangue, cérebro e fígado, da prole com 30 e 80 dias de idade, foram encontradas



quantidades de cádmio em todos esses tecidos, embora no cérebro da prole com 80 dias de idade, especificamente no grupo de co-exposição, a quantidade de cádmio encontrada tenha sido desprezível.

Outro dado interessante é que no sangue e cérebro da prole com 30 dias de idade e no fígado da prole com 80 dias de idade a quantidade de cádmio encontrada foi significativamente maior no grupo em que as gestantes foram expostas a Cd+DM em relação ao grupo em que as mães foram expostas apenas ao Cd. Este fato parece indicar que a co-exposição aos dois agentes poderia interagir e o DM exercer alguma modulação de nível cinético que interferiria na eliminação do cádmio.

O dimetoato por sua vez não foi encontrado em nenhum tecido da prole, porém, este fato era esperado já que ele e os organofosforados de modo geral, são eliminados rapidamente do organismo (Larini, 1999). Apesar do DM não estar presente no organismo dos animais da prole das mães a ele expostas, os animais apresentaram ansiedade aumentada em relação ao grupo controle, o que pode caracterizar uma reprogramação fetal para o comportamento da ansiedade. Esses dados parecem caracterizar "imprinting" e corroboram com a hipótese de Baker et. al. (2007) em que se acredita que as alterações metabólicas *in útero* podem estabelecer em longo prazo padrões fisiológicos e estruturais que o "programam" para a saúde ou doença, durante a vida adulta. Adicionalmente, a presença de efeito ansiogênico devido aos tratamentos, nos animais com 80 dias, também favorece esta hipótese. De acordo com Baker et. al. (2007) essas alterações podem ser funcionais e não estruturais, como por exemplo, alterações de caráter epigenético. Esta hipótese é atualmente conhecida como a hipótese de "origens do desenvolvimento da saúde e da doença - DOHaD". Nossos resultados não discriminam sobre um caráter epigenético nas observações obtidas.

Quanto à atividade da enzima colinesterase sanguínea e cerebral, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de tratamento o que contraria o estudo de Braquenier et al. (2010), que relata que o efeito de ansiedade poderia estar relacionado com a diminuição da atividade da colinesterase cerebral. Contrariam também os resultados observados por Antonio et al. (2003) que sugerem uma atividade anticolinesterásica cerebral induzida pelo cádmio em ratos em desenvolvimento. Estes dados também reforçam a sugestão do "imprinting" e reprogramação fetal. Talvez as diferenças observadas em relação aos outros autores, sejam por causa de diferentes procedimentos experimentais utilizados, diferentes doses, etc.

Ainda, nossos experimentos mostraram que houve uma diminuição do peso relativo de alguns órgãos. No cérebro, por exemplo, houve uma diminuição do peso relativo dos grupos Cd e DM em relação ao grupo controle, sendo que a mistura não apresentou essa diminuição. Diferente do baço e rins em que a mistura Cd+DM teve efeito sobre o peso relativo, ou seja, diminuindo significativamente o peso desses órgãos em relação ao grupo controle. E ainda o coração apresentou uma diminuição do peso relativo do grupo Cd+DM quando comparado ao grupo Cd. Estas observações são sugestivas de que a exposição a estes agentes, principalmente no caso da co-exposição poderia estar interferindo nos processos de formação e maturação dos órgãos, durante períodos críticos do desenvolvimento dos animais.

## 7. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados obtidos no presente trabalho permite concluir principalmente que:

- Apesar da exposição gestacional ao Cd, DM e ao Cd+DM provocar aumento no comportamento de ansiedade na prole, não foram obtidas evidências claras de um efeito potencializado sobre a ansiedade, quando da exposição à mistura de Cd+DM;
- Pode ter havido reprogramação fetal para ansiedade já que o efeito neurocomportamental estudado permaneceu até a idade adulta da prole, independentemente da presença do agente xenobiótico, principalmente para o grupo de exposição ao DM;
- A enzima acetilcolinesterase não parece estar implicada nos efeitos observados sobre o comportamento de ansiedade;
- Alterações na maturação de órgãos podem também estar implicadas nos efeitos de neurotoxicidade aqui observados já que a co-exposição modificou parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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, 175-185, 1977.
- Ali, M.M.; Murthy, R.C.; Chandra, S.V. Developmental and long-term neurobehavioral toxicity of low level in utero cadmium exposure in rats. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, 8, 463-468, 1986.
- Ali, M.M.; Mathury, N.; Chandra, S.V. Effect of chronic cadmium exposure on locomotor behaviour of rats. **Ind. J. Expl. Biol.**, 28, 653-658, 1990.
- Alissa, E. M.; Ferns, G. A. Heavy Metal Poisoning and Cardiovascular Disease. **J. Toxicol.**, 87-125, 2011.
- Andersen, H.R.; Nielsen, J.B.; Grandjean, P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. **Toxicology**, 144, 121-127, 2000.
- Andersson, H.; Petersson-grawe, K.; Londqvist, E.; Luthman, J.; Oskarsson, A.; Olson, L. Low-level cadmium exposure of lactating rats causes alterations in brain serotonin levels in the offspring. **Neurotoxicol. Teratol.**, 19(2), 105-115, 1997.
- Angélico, A.P. **Transtornos de ansiedade social e habilidades sociais: estudo psicométrico e empírico**. 2009. 215f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.
- 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.**, 143, 331-340, 2003
- Antonio, M.T.; Peinado, V.; González, J.C.; Leret, M.L. Effects of maternal cadmium administration on development of monoaminergic, GABAergic and glutamatergic systems. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 29, 87-90, 2010.
- Apostoli, P.; Catalani, S. Metal ions affecting reproduction and development. **Met Ions Life Sci.**, 8, 263-303, 2011.
- Arito, H.; Sudo, A.; Suzuki, Y. Aggressive behavior of the rat induced by repeated administration of cadmium. **Toxicol. Lett.**, 7, 457-461, 1981.
- Azevedo, M.A.A.; Figueiredo, C.G.; Godinho, A.F. Exposição perinatal a baixo nível de cádmio potencia a neurotoxicidade subaguda pelo clorpirifós em ratos jovens. **Rev. Bras. Toxicol.**, 23(3-4), 1-5, 2010.
- Bachelet, M. ; Pinot, F. ; Polla, R.I. ; Francois, D. ; Richard, M.J. ; Vaissier-Taussat, M. et al. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. **Free Radic. Res.**, 36, 99-106, 2002.

- Baker, J.L.; Olsen, L.W.; Sorensen, T.I.A. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. **N. Engl. J. Med.**, 357, 2329-2333, 2007.
- Banzato, T.P.; Godinho, A.F.; Zacarin, E.C.M.S.; Perobelli, J.E. Fernandez, C.D.B. Favareto, A.P.A.; Kempinas, W.G. Sperm quality in adult male rats exposed to cadmium in utero and lactation. **J. Toxicol. Environ. Health Part A**, 75, 1047-1058, 2012.
- Barker, D.J.; Eriksson, J.G.; Forsen, T.; Osmond, C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int. J. Epidemiol.**, 31, 1235-1239, 2002.
- Bourin, M.; Hascoet, M. The mouse light/dark box test. **Eur. J. Pharmacol.**, 463, 55-65, 2002.
- Braquenier, J.B.; Quertemont, E.; Tirelli E Plumier, J.C. Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. **Neurotoxicol Teratol.**, 32(2), 234-239, 2010.
- Broadhurst, P.L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H.J. **Experiments in personality**. London: Rutledge and Keagan Paul, 31-61, 1960.
- 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.
- Chen, L.; Qu, G.; Sun, X.; Zhang, S.; Wang, L.; Sang, N.; Du, Y.; Liu, J.; Liu, S. Characterization of the Interaction between Cadmium and Chlorpyrifos with Integrative Techniques in Incurring Synergistic Hepatotoxicity. **PLoS ONE**, 8(3): e59553. doi:10.1371/journal.pone.0059553, 2013.
- Costall, B.; Jones, B.J.; Kelly, M.E.; Naylor, R.J.; Tomkins, D.M. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety, **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 32, 777-785, 1989.
- Desi, I.; Nagyrnajtenyi, L.; Schulz, H. Behavioural and neurotoxicological changes caused by cadmium treatment of rats during development. **J. Appl. Toxicol.**, 18, 63-70, 1998.
- Ecobichon, D.J. Toxic effects of pesticides, in: C.D. Klaassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology. **The Basic Sciences of Poisons**, fifth ed., McGraw-Hill, New York, p.643-689. 1996.
- Ellmam, G.L.; Coutney, K.D.; Andres, V.J.; Earherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, 7, 88-95, 1961.
- Finkelstein, Y.; Markowitz, M.E.; Rosen, J.F. Low-level lead-induced neurotoxicity in children, **Brain Res. Rev.**, 27, 168-176, 1998.

- Gonçalves, J.F.; Fiorenza, A.M.; Spanevello, R.M.; Mazzanti, C.M.; Bochi, G.V.; Antes, F.G.; Stefanello, N.; Rubin, M.A.; Dressler, V.L.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C. N-Acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. **Chem. Biol. Interact.**, 186, 53-60, 2010.
- Gonçalves, J.F.; Nicoloso, F.T.; Costa P.; Farias, J.G.; Carvalho, F.B.; Rosa, M.M.; Gutierrez, J.M.; Abdalla, F.H.; Pereira, J.S.F.; Dias, G.R.M.; Barbosa, N.B.V.; Dressler, V.L.; Rubin, M.A.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C. Behavior and brain enzymatic changes after long-term intoxication with cadmium salt or contaminated potatoes. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 3709-3718, 2012.
- Górniak, S.L.; Spinosa, H.S.; Bernardi, M.M. Toxicologia do desenvolvimento. In: Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Palermo-Neto, J. In: Toxicologia aplicada à medicina veterinária. São Paulo: Manole, 2008. Capítulo 25. 942p.
- Holloway, W.R.; Thor, D.H. Cadmium exposure in infancy: effects on activity in synaptic neurotransmission in the brain. **Brain Res.**, 894, 336-339, 1988.
- Hook, J.N.; Valentiner, D.P. Are Specific and Generalized Social Phobias Qualitatively Distinct? **Clinical Psychology: Science and Practice**, Malden, v.9, n.4, Winter 2002.
- Jamal, G.A.; Hansen, S.; Julu, P.O.O. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, 181-182, 23-33, 2002.
- Jardim, I.C.S.F.; Andrade, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global - um enfoque às massas. **Quím. Nova**, 32(4), 996-1012, 2009.
- 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**, 24, 1- 51, 1998.
- Jeyaratnam, J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World Health Stat. Q.**, 43, 139-144, 1990.
- Kaizer, R.R.; Corrêa, M.C.; Spanevello, R.M.; Morsch, V.M.; Mazzanti, C.M.; Gonçalves, J.F.; Schetinger, M.R.C. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **J. Inorg. Biochem.**, 99, 1865-1870, 2005.
- Klaassen, C.D. Metais pesados e antagonistas dos metaís pesados. In: Goodman & Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Molinoff, P.B. and Ruddon, R.W. (Eds.) Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, cap. 67, 1389-1407, 2001.
- Kobayashi, H.; Suzuki, T.; Sakamoto, M.; Hashimoto, W.; Kashiwada, K.; Sato, I.; Akahori, F.; Satoh, T. Brain regional acetylcholinesterase activity and muscarinic acetylcholine receptors in rats after repeated administration of cholinesterase inhibitors and its withdrawal. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 219, 151-161, 2007.

- Lacorte, L.M.; Delella, F.K.; Amorim, E.M.P.; Justulin Jr., L.A.; Godinho, A.F.; Almeida, A.A.; Pinheiro, P.F.F.; Amorim, R.L.; Felisbino, S.L. Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates. **Microscopy Research and Technique**, 74(11), 988-997, 2011.
- Lacorte, L.M.; Seivac, F.R.F.; Rinaldia, J.C.; Delella, F.K.; Moroza, A.; Sarrobo, C.; Godinho, A.F.; Favaro, W.J.; Fernandes, A.A.H.; Felisbino, S.L. Caffeine reduces cadmium accumulation in the organism and enhances the levels of antioxidant protein expression in the epididymis. **Reprod. Toxicol.**, 35, 137-143, 2013.
- Larini, L. Toxicologia dos praguicidas. 1<sup>a</sup>. Edição, Editora Manole, São Paulo, 1999.
- Laudanski, T.; Sipowicz, M.; Modzelewski, P. Influence of high lead and cadmium soil content on human reproductive outcome. **Internat. J. Gynecol. Obst.**, 36, 309-315, 1991.
- Leret, M.L.; Millán, J.A.S.; Antonio, M.T. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. **Toxicology**, 186, 125-130, 2003.
- Lukawski, K.; Nieradko, B.; Sieklucka-Dziuba, M. Effects of cadmium on memory processes in mice exposed to transient cerebral oligemia. **Neurotoxicol. Teratol.**, 27, 575-584, 2005.
- Mamczarz, J.; Pereira, E.F.; Aracava, Y.; Adler, M.; Albuquerque, E.X. An acute exposure to a sub-lethal dose of soman triggers anxiety-related behavior in guinea pigs: interactions with acute restraint. **Neurotoxicology**, 31, 77-84, 2010.
- Méndez-Armenta, M.; Ríos, C. Cadmium neurotoxicity. **Environ. Toxicol. Appl. Met. Ions Life Sci.**, 8, 263-303, 2007.
- Merck Index 12<sup>a</sup> Ed., 1996, p.1665 e p.3270. Merck & CO., INC, White house Station, N.J., U.S.A.
- Minami, A.; Takeda, A.; Nishibaba, D.; Takefuta, S.; Oku, N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. **Brain Res.**, 894(2), 336-339, 2001.
- Moffett, M.C.; Schultz, M.K.; Schwartz, J.E.; Stone, M.F.; Lumley, L.A. Impaired auditory and contextual fear conditioning in soman-exposed rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, Mar; 98(1):120-9. doi: 10.1016/j.pbb.2010.11.022. Epub 2010 Dec 7, 2011.
- Moser, V.C.; Phillips, P.M.; McDaniel, K.L.; Marshall, R.S.; Hunter, D.L.; Padilla, S. Neurobehavioral effects of chronic dietary and repeated high-level exposure to chlorpyrifos in rats. **Toxicol. Sci.**, 86, 375-386, 2005.
- Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 268, 157-177, 2013.

- National Institutes of Health (NIH). **National pregnancy & health survey: drug use among women delivering live births**, 1992. Rockville, M.D.: Department of Health and Human Services, 1996.
- Oberlander, T.F. Fetal Serotonin Signaling: Setting Pathways for Early Childhood Development and Behavior. **J. Adolesc. Health**, 51, 9-16, 2012.
- Pari, L.; Murugavel, P. Diallyl tetrasulfide improves cadmium induced alterations of acetylcholinesterase, ATPases and oxidative stress in brain of rat. **Toxicology**, 234, 44-50, 2007.
- Pellow, S.; Chopin, M. The effect of putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. **Physiol. Behav.**, 35, 587-590, 1985.
- Pellow, S.; File, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 24, 525-529, 1986.
- Provias, J.P.; Ackerley, C.A.; Smith, C.; Becker, L.E. Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. **Acta Neuropathol. Berl.**, 88, 583-586, 1994.
- Ramírez-Vélez, R. In utero fetal programming and its impact on health in adulthood. **Endocrinol Nutr.**, 59(6), 383-393, 2012.
- Roberts, C.A.; Clark, J.M. Improved determination of cadmium in blood and plasma by flameless atomic absorption spectroscopy. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 36, 496-499, 1986.
- Ronco, A.M.; Montenegro, M.; Castillo, P.; Urrutia, M.; Saez, D.; Hirsch, S.; Zepeda, R.; Llanos, M.N. Maternal exposure to cadmium during gestation perturbs the vascular system of the adult rat offspring. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 251, 137-145, 2011.
- Salvatori, F.; Talasi, C.B.; Salzgeber, S.A.; Spinosa, H.S.; Bernardi, M.M. Embryotoxic and Long-term Effects of Cadmium Exposure During Embryogenesis in Rats. **Neurotoxicology and Teratology**, 26, 673-680, 2004.
- Santos, T.R. Desenvolvimento neonatal de crias de ratas Wistar (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) tratadas com Flavanóide Ipriflavona durante a lactação plena. 2011. 52f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- Saratug, 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.**, 137, 65-83, 2003.
- Satarug, S.; Moore, M.R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environ. Health Perspect.**, 112, 1099-1103, 2004.

- Sayim, F. Dimethoate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, 59, 237-243, 2007.
- Schmatz, R.; Mazzanti, C.M.; Spanevello, R.; Stefanello, N.; Gutierrez, J.; Corrêa, M.; Rosa, M.M.; Rubin, M.A.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 610, 42-48, 2009.
- Seckl, J.R.; Holmes, M.C. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal programming of adult pathophysiology. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metabol.**, 3, 479-488, 2007.
- Sharma, Y.; Bashir, S.; Irshad, M.; Gupta, S.D.; Dogra, T.D. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. **Toxicology**, 206, 49-57, 2005.
- Sindicato dos Trabalhadores de Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário (SINPAF). [www.sinpaf.org.br/dodules/smartsection/item.php?itemid=644](http://www.sinpaf.org.br/dodules/smartsection/item.php?itemid=644). [Acesso em 15 de agosto de 2015].
- Snedecor, G.W.; Cochran, W.G. **Statistical Methods**. 7<sup>a</sup> ed. Iowa: Iowa State University Press, p. 593, 1980.
- Soreq, H.; Seidman, S. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2, 294-302, 2001.
- Srivastava, M.K.; Raizada, R.B. Development of technical dimethoate in rats: maternal and fetal toxicity evaluation. **Indian J. Exp. Biol.**, 34(4), 329-333, 1996.
- Terçariol, S.G.; Almeida, A.A.; Godinho, A.F. Cadmium and exposure to stress increase aggressive behavior. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, 32, 40-45, 2011.
- 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. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 67, 743-751, 2001.
- Udo, M.S.B. Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar. 2012. 146f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Van der hoff, G.; Van Zoonen, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **J. Chromatogr. A.**, 843(1-2), 301-322, 1999.
- Viaene, M.K.; Masschelein, R.; Leenders, L.; De Groof, M.; Swerts, L.J.; Roels, H.A. Neurobehavioural effects of occupational exposure to cadmium: a cross sectional epidemiological study. **Occup. Environ. Med.**, 57, 19-27, 2000.
- Who, Dimethoate. **Environmental Health Criteria** 90 Who, Geneva, 1989.



- Wu, D.; Landsberger, S.; Larson, S.M. Evaluation of elemental cadmium as a marker for environmental tobacco smoke. **Environ. Sci. Technol.**, 29, 2310-2316, 1995.
- Yargıçoglu, P.; Agar, A.; Oguz, Y.; Izgüt-Uysal, V.N.; Sentürk, Ü.K.; Öner, G. The effect of developmental exposure to cadmium (Cd) on visual evoked potentials (VEPs) and lipid peroxidation. **Neurotoxicol. Teratol.**, 19, 213-219, 1997.
- Yue, L. Cadmium in tobacco. **Biomed. Environ. Sci.**, 5, 53-56, 1992.
- Zadorozhnaja, T.D.; Little, R.E.; Miller, R.K.; Mendel, N.A.; Taylor, R.J.; Presley, B.J.; Gladen, B.C. Concentrations of arsenic, cadmium, copper, lead, mercury, and zinc in human placentas from two cities in Ukraine. **J Toxicol Environ Health A.**, 61(4), 255-263, 2000.