

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS POR DOSES SUBLETAIS DO
ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE
BARATAS DA ESPÉCIE *PHOETALIA PALLIDA***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

2012

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS POR DOSES SUBLETAIS DO
ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE
BARATAS DA ESPÉCIE *PHOETALIA PALLIDA***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo

São Gabriel

2012

STÜRMER, Grazielle Daiane

Avaliação dos efeitos induzidos por doses subletais do organofosforado Triclorfon sobre o sistema nervoso de baratas da espécie *Phoetalia pallida*/ Grazielle Daiane Stürmer.

53 folhas;

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2012.
Orientação: Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo.

1. Qualidade Ambiental. 2. Neurofarmacologia. 3.
Toxicologia. I. Dal Belo, Cháriston André. II. Doutor

GRAZIELE DAIANE STÜRMER

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS INDUZIDOS POR DOSES SUBLETAIS DO
ORGANOFOSFORADO TRICLORFON SOBRE O SISTEMA NERVOSO DE
BARATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

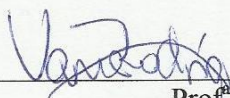
Área de Concentração: Qualidade Ambiental

Dissertação defendida e aprovada em 14 de novembro de 2012.

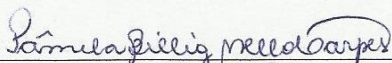
Banca examinadora:



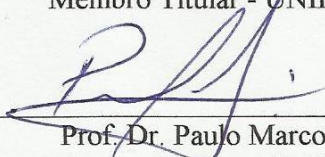
Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
Orientador - UNIPAMPA



Prof.^a Dr.^a Vania Salazar
Membro Titular - USP



Prof.^a Dr.^a Pamela Billing Mello Carpes
Membro Titular - UNIPAMPA



Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto
Membro Titular - UNIPAMPA

Dedico essa dissertação ao meu pai Elton Stürmer e minha irmã Mônica pelo carinho, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Elton Stürmer, pelo amor, apoio, carinho e incentivo sempre. E por ser exemplo de força, competência, superação e honestidade.

A minha irmã, Mônica, pela união, carinho, e apoio que ofereceu durante mais esta etapa da minha vida e principalmente por sempre estar perto, mesmo a longas distâncias.

Ao meu orientador. Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo, pela orientação desde a iniciação científica, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo sempre – está bom, mas podemos melhorar. Muito obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco e a Msc. Ana Paula Zemolin pela ajuda e disponibilidade nos testes bioquímicos.

As Professoras Doutoradas Thaís Posser e Lúcia Vinadé por aceitarem ser banca da minha qualificação, por todas as dicas e correções a fim de tornar essa dissertação melhor. Sou muito grata por toda ajuda oferecida.

Ao Prof. Dr. Cristian Bugs por toda a ajuda oferecida na construção das figuras.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, adorei conhecer todos.

A Afnan Suleiman e Lilian Machado, que são colegas/amigas muito especiais.

A Marines Heberle por toda ajuda prestada nos experimentos.

As minhas amigas de infância - Pricila, Cássia, Aline e Angélica - por ser uma fonte inesgotável de companheirismo e alegrias.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Vanda Lopes e Diogo Spencer da secretaria da pós-graduação.

A todos, que apesar de não citados nominalmente, ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional, e na realização desse trabalho.

“(…) Bons professores são inestimáveis. Eles inspiram e entretêm, e você acaba aprendendo muita coisa mesmo sem se dar conta disso. Simples, pois eles são apaixonados pelo que ensinam.” –NICHOLAS SPARKS

RESUMO

O triclorfon é um inseticida e acaricida organofosforado utilizado na agricultura e na pecuária. Em concentrações normalmente encontradas no meio ambiente, como resultado da acumulação de organofosfato persistente, o triclorfon inibiu significativamente a atividade da enzima acetilcolinesterase, que resulta em um excesso de estimulação colinérgica. Esta inibição enzimática mostrou ser potencialmente tóxica por alterar o perfil de marcha e comportamento de *grooming* do animal. As alterações comportamentais são desenvolvidas principalmente pela modulação da via da dopamina, que inclui a ativação de receptores DA-D1 que pode causar o aumento de atividade de *grooming*. Os receptores muscarínicos da subclasse M1 também foram investigados e revelaram estar estreitamente relacionados com o aumento das alterações comportamentais. Interneurónios nicotínicos neuronais devem estar envolvidos, pois como a *d*-tubocurarina houve uma diminuição do aumento da atividade de limpeza (*grooming*) induzido por triclorfon. Os resultados apontam para uma interação entre os receptores colinérgicos e dopaminérgicos no sistema nervoso dos insetos. E também reforçam que a persistência ambiental de inseticidas e sua influência sobre o sistema nervoso dos animais é um problema que não precisa ser levado em consideração.

Palavras-chave: Triclorfon, *Phoetalia pallida*, Acetilcolinesterase, *grooming*

ABSTRACT

Sublethal doses of the organophosphate trichlorfon induce behavioral alterations in *Phoetalia pallida*. At concentrations normally found in the environment, as a result of persistent organophosphate accumulation, trichlorfon inhibited significantly the acetylcholinesterase activity, resulting in a cholinergic over-stimulation. This enzymatic inhibition proved to be potentially toxic to cause the reinforcement of the drive for walking and the increasing grooming activity. The behavioral alterations are mainly developed by changing dopamine pathway regulation, which at least include the activation of DA-D₁ receptors to cause increase of grooming activity. Muscarinic receptors of M₁-subclass were also investigated and showed to be closely related to the increase of behavioral alterations. Neuronal nicotinic interneurons must be involved as *d*-tubocurarine, was able to decrease the trichlorfon-induced increase of grooming activity. The results point out to the cross-talking between cholinergic and dopaminergic receptors at insect nervous system. They also reinforce the environmental persistence of insecticides and their remaining and important influence on animal nervous system.

Keywords: Trichlorfon, *Phoetalia pallida*, Acetylcholinesterase, Grooming

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Estrutura química geral dos compostos organofosforados.....	17
Figura 2 –Estrutura química do triclorfon.....	18
Figura 3 – Sistema nervoso e distribuição dos neurotransmissores em baratas.....	19
Figura 4 –Comportamento de grooming em baratas.....	21
Figura 5 –Determinação da DL50 em moscas da fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>) adiministradas com diferentes concentrações de Triclorfon após 24 e 48 horas.....	46
Figura 6 –Proposta de mecanismo neurofarmacológico do triclorfon.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetilcolina – Ach

Acetilcolinesterase - AChE

Ácido γ -aminobutírico - GABA

Cloreto de pralidoxima - 2-PAM

Dose Letal Mínima – DL₅₀

Receptor Dopaminérgico do tipo D₁ – DA-D₁

Receptor Dopaminérgico do tipo D₂ – DA-D₂

Receptor Muscarínico de Acetilcolina do tipo M₁ – M₁

Receptor Muscarínico de Acetilcolina do tipo M₂ – M₂

Receptor Serotoninérgico -5HT_{2A}

Receptor Serotoninérgico -5HTT₃

Sistema Nervoso Central – SNC

Sistema Nervoso Periférico –SNP

APRESENTAÇÃO

No item INTRODUÇÃO, consta uma breve revisão da literatura sobre o tema abordado nesta dissertação. A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item MANUSCRITO. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O item CONCLUSÕES, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos manuscritos presentes neste trabalho. As REFERÊNCIAS referem-se somente às citações que aparecem nos item INTRODUÇÃO desta dissertação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
APRESENTAÇÃO.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	15
1. 1. Agrotóxicos.....	15
1. 1. 1. Agentes Inseticidas.....	15
1. 1. 2. Organofosforados.....	17
1. 1. 3. Triclorfon.....	18
1. 2. Considerações sobre a espécie estudada.....	19
1. 2. 1. Sistema Nervoso de Insetos.....	19
1. 2. 1. 1. Sistema Colinérgico.....	20
1. 2. 1. 2. Sistema Dopaminérgico.....	20
1. 2. 2. Baratas.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2. 1. Objetivo específicos.....	23

3. MANUSCRITO: Modulation of Dopaminergic Pathway Induced by Sublethal Doses of the Organophosphate Trichlorfon in Cockroaches.....	24
Introduction	
Materials and methods	
Results	
Discussion	
References	
4. MATERIAL E MÉTODOS COMPLEMENTARES.....	45
4. 1. Animais.....	45
4. 1. 1. Moscas.....	45
4. 2. Determinação da DI_{50} do Triclorfon em ensaios com <i>Drosophila melanogaster</i>	45
5. RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	46
5. 1. Determinação da DI_{50} do Triclorfon em ensaios com <i>Drosophila melanogaster</i>	46
6. PROPOSTA DE MECANISMO NEUROFARMACOLÓGICO DO TRICLORFON.....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. Introdução

1. 1. Agrotóxicos

Segundo a lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989 (BRASIL 1989) e o decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002 que regulamenta esta lei (BRASIL 2002) agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Nesse sentido, o Brasil tem se destacado como o maior mercado de agrotóxicos no mundo, ultrapassando os Estados Unidos com um total aproximado de R\$ 17 bilhões de reais comercializados, somente em 2011 (SINDAG 2011). Em termos estatísticos, o mercado de agrotóxicos no Brasil cresceu na última década 190% (ANVISA & UFPR 2012), consolidando ainda o nosso país como aquele com maior expansão no uso de agrotóxicos (CARNEIRO et al 2012).

Em linhas gerais, a classificação dos agrotóxicos obedece a vários critérios – Dose letal mínima para ratos; efeitos nas espécies-alvo; componentes da fórmula, toxicidade ao meio-ambiente - um dos principais critérios é o tipo de espécie-alvo em que atuam. Dessa forma, as quatro classes principais de pesticidas e suas pragas-alvo são os inseticidas (insetos), herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos, bolores) e raticidas (roedores), dentre outras (LINDERS et al 1994).

1. 1. 1. Agentes Inseticidas

Os inseticidas são compostos químicos de origem natural ou sintética usados no controle de insetos-praga¹ (Revisado por VIEGAS JR 2003). Essas substâncias podem ser enquadradas em diferentes subclasses, como produtos químicos substancialmente diferentes e com características toxicológicas diversas. A maioria dos inseticidas afetam um dos cinco sistemas biológicos em insetos. Estes incluem o sistema nervoso, a produção de energia, a

¹ Por definição: o surto de determinados insetos nocivos ao desenvolvimento agrícola ou que destroem a propriedade humana, perturbam os ecossistemas, ou que provocam doenças no homem ou em outros animais.

reciclagem de cutícula, o sistema endócrino e o balanço de água (VALLES & KOEHLER 2011). O sistema nervoso é de longe, o mais importante, uma vez que pode levar a alterações imprevisíveis do comportamento, tais como padrões de alimentação (NICOLAUS & LEE 1999), reprodução (DELPUECH et al 2005), forrageamento (GUEZ et al 2005), migração e termorregulação (GRUE et al 1997), entre outros. Nesse sentido, os alvos moleculares mais comuns dos inseticidas neurotóxicos são as enzimas colinesterases, os canais de sódio, os receptores nicotínicos da acetilcolina, os receptores GABA, os receptores de glutamato e os receptores de octapamina² (RAYMOND-DELPECH et al 2005). Residem nas colinesterases os principais alvos da maioria dos inseticidas encontrados no mercado atualmente.

Nesse aspecto, as carboxiesterases são enzimas hidrolases pertencentes a um diverso grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de um grande número de esters alifáticos e aromáticos, esters de colina e compostos organofosforados (MOHARIL et al 2008). As carboxiesterases estão envolvidas no mecanismo de resistência dos insetos ao uso de compostos organofosforados. Por se constituírem um alvo falso, essas enzimas previnem os inseticidas de atingir as enzimas acetilcolinesterases (AChE) (SHONO et al 1979; 1985).

Dessa forma, devido a esse mecanismo de defesa dos insetos, grandes quantidades de compostos organofosforados tem sido empregados para produzir a atividade inseticida, causando a persistência dos efeitos inibitórios da colinesterase no ambiente, não só em insetos úteis (GALLO et al 2002), como também em outros animais (MEDGELA et al 2010). Assim, a aplicação desses compostos nas doses recomendadas pelos fabricantes, geralmente favorece a permanência dos mesmos no meio ambiente através de doses subletais que carecem de um estudo mais aprofundado (GUEDES 1999).

A observação dos efeitos subletais de pesticidas sobre o comportamento de insetos são raros, pela dificuldade de estudo e bem como pela sua previsão no ambiente. Dessa forma, esses estudos tornam-se vitais para o desenvolvimento de melhores métodos de avaliação de risco e/ou para a avaliação do impacto ecológico e econômico de inseticidas e agrotóxicos em geral. Por exemplo, evidenciou-se que doses sub-letais de pesticidas organofosforados podem alterar o comportamento normal das abelhas por induzir maturidade precoce causando a morte de colônias inteiras (GUEZ et al 2005).

² Uma amina biogênica que tem o papel de Neurotransmissor e neuromodulador de insetos. Possui funções similares a adrenalina e noradrenalina em vertebrados.

1. 1. 2. Organofosforados

O desenvolvimento de compostos sintéticos de fósforo orgânico como inseticidas, ocorreu apenas no final dos anos de 1930 e 1940. O químico alemão Gerhard Schrader é creditado pela descoberta da estrutura química geral dos compostos organofosforados (figura 1), e pela síntese do primeiro organofosforado comercializado como inseticida, o parathion, em 1944 (CASARETT & DOULL 2008). Os compostos organofosforados reagem no sítio esterásico da acetilcolinesterase inibindo essa enzima de maneira irreversível (Revisado por SANTOS et al 2007). Em geral, são muito menos seletivos que os carbamatos, inibindo muitas enzimas que contém uma molécula de serina num centro ativo, por exemplo a buritilcolinesterase e a carboxilesterase (CRAIG & STITZEL 2004).

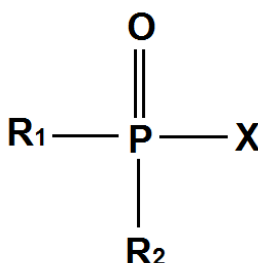


Figura 1- Estrutura química geral dos compostos organofosforados, onde: X geralmente é representado por halogenio, alquil, aril ou heterocíclicos. O R₁ e o R₂ são geralmente os grupos alquil, SR', OR' ou NHR' ou grupos alcoxi (OCH₃, ou seja, OC₂H₅). Fonte: CASARETT & DOULL 2008.

Os exemplos do grupo X que compõe a estrutura química dos organofosforados incluem o flúor no isofluorato (*Floropryl*, que não é mais usado nos EUA e no Canadá) e o ecotiofato (*Phospholine*). O paration e o malation (inseticidas) são tiofosfatos que devem ser convertidos em oxianálogos para se tornarem ativos (CRAIG & STITZEL 2004). Os organofosforados, à excessão do ecotiofato e metrifonato, são muito lipossolúveis, assim, uma característica importante da inibição induzida pelos organofosforados reside na acentuada estabilidade da ligação entre o fosfato e a enzima. Enquanto a regeneração da maioria das enzimas carbamiladas (inibição por carbamatos) ocorre com meia-vida de poucos minutos ou horas, a recuperação espontânea de uma enzima fosforilada (inibida por organofosforados) é muito difícil. Por esse motivo esses agentes são conhecidos por serem inibidores irreversíveis da AChE (BARTH & BIAZON 2010).

Embora a hidrólise espontânea de uma enzima fosforilada seja, em geral, muito lenta, os compostos denominados oximas podem produzir a sua desfosforilação. A principal limitação

no emprego dessa substância como antídoto para o envenenamento por organofosforados consiste no fato de que, em poucas horas, a enzima fosforilada sofre alteração química (“envelhecimento”) que a torna não mais suscetível à reativação; por essa razão a pralidoxima precisa ser administrada o mais cedo possível para que funcione. O cloreto de pralidoxima (2-PAM) é uma oxima utilizada na medicina para reativar a AChE fosforilada. Como característica adicional, o seu grupo de amônio quaternário liga-se ao sítio aniônico da enzima promovendo a sua desfosforilação (EYE & BUCKLEY 2006).

1. 1. 3. Triclorfon

O triclorfon (dimetil 2,2,2 tricloro-1-hidroxi-etilfosfanato ou Metrifonato) (Figura 2) é um inseticida e acaricida organofosforado, solúvel em água, amplamente utilizado no controle de várias pragas em campos, lares, plantas e contra parasitas em animais domésticos e comerciais (LOPES et al 2006).

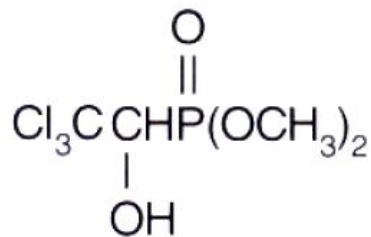


Figura 2- Estrutura química do Triclorfon (dimetil 2,2,2 tricloro-1-hidroxi-etilfosfanato). Fórmula molecular: $\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_3\text{O}_4\text{P}$. Fonte: ANVISA *apud* LOPES et al 2006.

A hidrólise do Triclorfon ocorre rapidamente, gerando o metabólito diclorvós, que é um organofosforado altamente tóxico, devido a sua alta atividade anticolinesterásica. O metabólito diclorvós, e não o triclorfon, é o agente potencialmente tóxico (HIRATA et al 2003). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Triclorfon é classificado como de classe toxicológica II – altamente tóxico ao meio ambiente (ANVISA *apud* LOPES et al 2006). Como um organofosforado clássico, sua atividade inseticida está ligada a inibição da enzima AChE no sistema nervoso dos insetos, favorecendo a intoxicação colinérgica (SANTOS et al 2011).

A partir de 26/02/2008 o triclorfon passou por uma reavaliação pela ANVISA, por apresentar neurotoxicidade, potencial carcinogênico e toxicidade reprodutiva. Conforme

publicado no Diário Oficial em 24/02/2010 o triclorfon foi retirado do mercado brasileiro (ANVISA 2010).

1. 2. Considerações sobre as espécies estudadas

1. 2. 1. O Sistema nervoso de insetos

Tipicamente, cada segmento do corpo dos insetos possui um par de gânglios ligados por comissuras³ e unidos aos gânglios dos segmentos adjacentes por conectivos (Figura 3) (RANDALL et al 2000; GALLO et al 2002). Nenhum dos gânglios contém um centro absolutamente vital, razão pela qual um inseto decapitado ainda pode caminhar (Revisado por OSBOURE 1996).

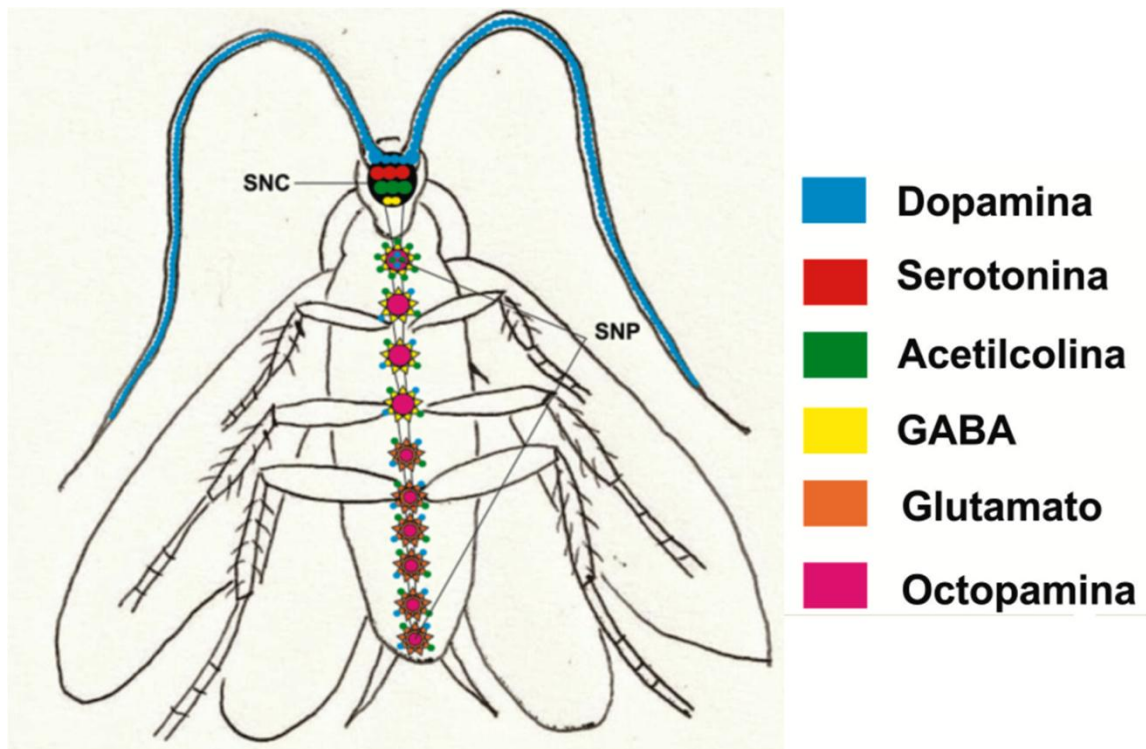


Figura 3: Sistema nervoso e distribuição dos neurotransmissores em baratas. O sistema nervoso é localizado ventralmente no animal. E é composto principalmente por cérebro, gânglio subesofágico, três gânglios metatorácicos e seis gânglios abdominais. Fonte: Autoria própria.

Evidências experimentais demonstram que a acetilcolina, a dopamina, a octopamina, a 5-hidroxitriptamina e a histamina são os principais neurotransmissores do sistema nervoso ganglionar e central dos insetos. Por outro lado, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório da junção neuromuscular de insetos, e o ácido γ -aminobutírico (GABA) o

³ Comissuras: Região que reúne as duas metades simétricas dos centros nervosos

neurotransmissor inibitório nessa sinapse periférica (TAYLOR & NEWBURGH 1979; Revisado por OSBOURE 1996).

1. 2. 1. 1. Sistema Colinérgico

Em relação ao sistema colinérgico, que utiliza a acetilcolina como neurotransmissor, a maioria dos elementos necessários para o funcionamento das sinapses desse sistema foram identificadas em insetos (KERKUT et al 1969). Receptores nicotínicos, muscarínicos, e mistos nicotínicos/muscarínicos têm sido relatados no tecido nervoso de várias espécies de insetos, inclusive no de baratas (BREER & SATTELLE 1987). Sinapses colinérgicas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) de insetos parecem possuir autoreceptores muscarínicos, que estão localizados sobre o nervo terminal pré-sináptico, onde ocorre o controle da liberação de acetilcolina (Revisado por OSBOURE 1996).

A acetilcolina está localizada principalmente nos axônios, dendritos dos neurônios do SNC e, em menor quantidade, nos gânglios ao longo do cordão nervoso. Os receptores muscarínicos estão localizados principalmente no SNC, SNP e Sistema estomogástrico. Os receptores nicotínicos de acetilcolina estão localizados no SNC e Sistema estomogástrico. Os receptores mistos (muscarínicos e nicotínicos) estão localizados no SNC (Revisado por OSBOURE 1996).

1. 2. 1. 2. Sistema Dopaminérgico

A dopamina e seus receptores estão amplamente distribuídos por todo o sistema nervoso dos insetos (Revisado por OSBOURE 1996).

A dopamina desempenha um importante papel na regulação do comportamento motor das insetos (MUSTARD et al 2010). Podendo agir em vários locais para influenciar o comportamento locomotor, afetando a informação sensorial na periferia, a regulação de geradores de padrão central e/ou de processamento da informação no cérebro (MUSTARD et al 2010).

O *grooming* em insetos tem a função de limpeza da superfície exterior do corpo (Figura 4) e pode ter também outras funções, como comportamento de corte, sinalização social,

atividade de deslocamento e de excitação (SPRUIJT et al 1992). Esse padrão de comportamento é provavelmente provocado através da estimulação dos receptores da dopamina no SNC da barata (WEISEL-EICHLER et al 1999; LIBERSAT & PFLUEGER 2004).

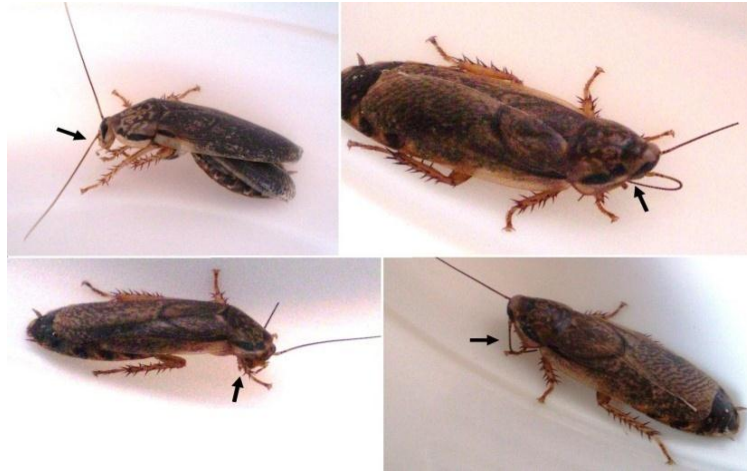


Figura 4: Baratas realizando o comportamento de grooming. Esse comportamento é observado quando o animal limpa as antenas e patas várias vezes ao dia. Fonte das fotos: Própria autoria.

1. 2. 2. Baratas

As baratas são insetos-praga primitivos nos quais a maioria dos sistemas fisiológicos é carente de especialização. Se por um lado, a falta de especialização pode ser um entrave para a comparação com alguns sistemas biológicos animais, do ponto de vista da neurotoxicologia, torna-se um importante instrumento na investigação do mecanismo de ação de compostos químicos com atividade tóxica sobre o sistema nervoso (Revisado por STANKIEWICZ et al 2012). Por exemplo, já foram identificados mais de 200 neurotransmissores e seus respectivos receptores no sistema nervoso de baratas, que são idênticos aos de outros insetos mais evoluídos, e apresentam grande homologia em sua estrutura molecular aos de animais vertebrados, dentre eles os seres humanos (HUBER et al 1990).

Uma grande vantagem do uso desses animais em experimentos no campo da toxicologia é a possibilidade de se investigar várias funções do sistema nervoso, por meio do estudo de unidades do sistema nervoso da barata, muitas delas sendo investigadas em modelos naturais *in vivo*, *in situ* ou mesmo *in vitro*. Além disso, no caso dos inseticidas piretróides, o alvo principal é o sistema nervoso periférico, o que facilita, de certa forma, a descrição do seu

mecanismo de ação, bem como a evidenciação do grau de seletividade (Revisado por STANKIEWICZ et al 2012). Outros, como por exemplo, as toxinas de venenos animais, preferem a ligação ao sistema nervoso central do inseto, levando a um aumento na liberação do neurotransmissor dopamina, induzindo efeitos como letargia e diminuição da locomoção (WEISEL-EICHLER et al 1999). Além desses mecanismos celulares, também tem sido descritos aspectos bioquímicos na intoxicação induzida por agentes inseticidas (BULLANGPOTI et al 2006). Dentre os alvos biológicos inerentes a essa atividade, destacam-se as enzimas colinesterases que, em baratas, perfazem mais de oito subtipos (HAUBRUGE et al 2002). Por fim e em paralelo às interações com a(s) enzima(s) colinesterase também têm sido descritos outros aspectos bioquímicos relacionados a um aumento do estresse oxidativo, associados à atividade letal de compostos inseticidas em insetos (JAMES & XU 2012).

Atualmente, o modelo experimental utilizando a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, tem sido bastante utilizado para estudos toxicológicos (revisado por DALE 2010; HIRATA et al 2003). Cabe destacar que a mosca-da-fruta além da sua elevada sensibilidade para detectar a presença de substâncias tóxicas, é um inseto de fácil criação, manutenção e manipulação em condições de laboratório, apresentando, assim, vantagens frente a outros organismos para a realização de bioensaios (ALMEIDA et al 2001).

2. OBJETIVO

- Identificar o mecanismo de ação residual do Triclorfon por meio do uso de subdoses desse agrotóxico em preparações *in vivo* e *in vitro* de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

2. 1. Objetivos específicos

- Determinar o mecanismo de neurotoxicidade periférica induzida pelo triclorfon por meio do teste de neurolocomoção em baratas;
- Determinar o mecanismo de neurotoxicidade central em insetos exposto ao triclorfon por meio da técnica de *grooming*;
- Identificar quais receptores podem estar envolvidos na modulação do comportamento de *grooming* em baratas utilizando moduladores colinérgicos e dopaminérgico;
- Avaliar o efeito de subdoses do Triclorfon na cinética de inibição da enzima colinesterase;

3. Manuscript: Submetido a Journal of Comparative Physiology. A: Sensory, Neural and Behavioral. Em 01/08/2012.

Modulation of Dopaminergic Pathway Induced by Sublethal Doses of the Organophosphate Trichlorfon in Cockroaches

Graziele Daiane Sturmer¹, Thiago Carrazoni de Freitas¹, Ana Paula Zemolin¹, Marines de Avila Heberle¹, Lúcia Vinadé¹, Antônio Batista Pereira¹, Jeferson Luis Franco¹, Chariston André Dal Belo^{1*}

¹PPG-Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Sublethal doses of the organophosphate trichlorfon induce behavioral alterations in *Phoetalia pallida*. At concentrations normally found in the environment, as a result of persistent organophosphate accumulation, trichlorfon inhibited significantly the acetylcholinesterase activity, resulting in a cholinergic over-stimulation. This enzymatic inhibition proved to be potentially toxic to cause the reinforcement of the drive for walking and the increasing grooming activity. The behavioral alterations are mainly developed by changing dopamine pathway regulation, which at least include the activation of DA-D₁ receptors to cause increase of grooming activity. Muscarinic receptors of M₁-subclass were also investigated and showed to be closely related to the increase of behavioral alterations. Neuronal nicotinic interneurons must be involved as *d*-tubocurarine, was able to decrease the trichlorfon-induced increase of grooming activity. The results point out to the cross-talking between cholinergic and dopaminergic receptors at insect nervous system. They also reinforce the environmental persistence of insecticides and their remaining and important influence on animal nervous system.

Keywords: Trichlorfon, *Phoetalia pallida*, Acetylcholinesterase, Dopamine signaling

*Chariston André Dal Belo, PhD. Address Federal University of Pampa (UNIPAMPA) Av. Antônio Trilha, 1847 – Centro, CEP 97300-000, São Gabriel-RS, Brazil.
Phone/Fax: +55 55 3232-6075;
e-mail:charistonbelo@unipampa.edu.br; charistondb@gmail.com

1-Introduction

Organophosphate insecticides (OP), derived from phosphoric or thiophosphoric acid, include Parathion, Malathion, Diazinon, Fenthion, Clhorpyrifos (Nishizawa 1960; Fest and Schmidt 1982; Medegela et al. 2010) and trichlorfon among others. Trichlorfon (metrifonate), is the dimethyl 2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate, an insect acetylcholinesterase (AChE) inhibitor, due to its ability to phosphorylate this serine hydrolase in its esterase active site. Inhibition of AChE and consequent accumulation of acetylcholine at cholinergic junction in nerve tissue and effector organs, produce acute muscarinic, nicotinic and central nervous system (CNS) effects (Torres-Altore et al. 2011; Cummings and Ringman 1999). Trichlorfon was first registered in the United States in 1955, and nowadays is a worldwide diffused systemic insecticide with a variety of domestic and agricultural applications (EPA 2006). Although highly toxic to the primary target, its effects on the secondary organisms in the surrounding environment are thought to be very limited or absent. However, sublethal effects of pesticides on behavior are difficult to study or predict. Nevertheless, such studies are vital to the development of improved methods of risk assessment and to the evaluation of ecological and economical impact of insecticides and pesticides in general. It is therefore important to study the potential effects of such molecules on behaviors that are relevant to the organism under study. For example, there has been evidence that sublethal doses of organophosphate pesticides can alter the normal behavior of honey bees by turn the young prematurely older (Guez et al. 2005).

Although the role of dopamine in modulating behavior in insects has been extensively studied, the influence of cholinergic modulators (e.g. sublethal doses of organophosphate insecticides) in this parameter is not well understood. Furthermore, most neurons in the nervous system appear to contain and release more than one chemical acting as neurotransmitter or neuromodulator. Thus, such cotransmission can therefore be considered a rule other than an exception (Trudeau and Gutiérrez 2007). Cockroaches are primitive insects, in which most of functional systems are fairly unspecialized. The cockroach nervous system has been used not only to understand the physiological aspects between insect and natural compounds, but also as an important model of biomedical research (Stankiewicz et al. 2012). The aim of this work was to investigate the whole of sublethal doses of trichlorfon in modulating biochemical and neurophysiological parameters affecting insect behavior. For this, we used *in vitro* and *in vivo* models of *Phoetalia pallida* and compared the effects of trichlorfon in presence or absence of dopaminergic and cholinergic modulators.

2. Materials and methods

2.1. Experimental Animals

All experiments were performed on adult male *Phoetalia pallida* cockroaches (3-4 month after adult molt). The animals were reared at laboratory conditions of controlled temperature (22-25°C) on a 12 h:12 h L:D cycle. All cockroaches were provided with water and dog food *ad libitum*.

2.2. Drugs and Chemicals

Trichlorfon, atropine, tyramine, methoclopramide, pyrenzepine, methoctramine, d-tubocurarine, oxothremorine, tropicamide, nifedipine and SCH23-390 were obtained from Sigma-Aldrich (USA), and were freshly prepared in HEPES saline of the following composition (in mMol l⁻¹): NaCl, 214; KCl, 3.1; CaCl₂, 9; sucrose, 50; HEPES buffer, 5 and pH 7.2 (Wafford and Sattelle 1986). All drugs were administered at the third abdominal hemocoel segment, at final volume of 20µl by means of a Hamilton syringe. Experiments were done at controlled room temperature (22-25°C) in accordance with the guidelines of the National Counselor to Control Animal Experimentation-CONCEA.

2.3. Assay for determining sublethal doses

The insecticidal assay against adult *Phoetallia pallida*, was conducted essentially as described by Kagabu et al. (2007). Various concentrations of trichlorfon dissolved in HEPES saline were injected into the abdomen of *P. pallida*. The doses were varied by every 2 times in moles. Three insects were used to test each dose of trichlorfon and were kept at 22-25°C for 24 h after injection. The minimum dose at which two of three insects were considered killed was taken as the minimum lethal dose (MLD in moles). Paralyzed insects were also counted as having died.

2.4. Assay for Cholinesterase Activity

The *in vitro* inhibition of AChE was evaluated according to the assays described by Ellman et al. (1961) modified by Franco et al. (2009). The whole amount of protein was measure according to Bradford (1976). In brief, three cockroaches injected with trichlorfon (0.25, 0.50, 1 μ M) six hours before the acetylcholinesterase analysis were anesthetized by chilling at -5°C and their brains collected after cuticle removal. The material were mixed with 750 μ L of Kpi buffer pH 7.0 (500rpm/5min/4°C) and 400 μ l of supernatant was collected. From this sample (50 μ l) was added to 50 μ l of 50mM DTNB, 500 μ l Kpi (pH 8.0) and 2.5 μ l acetylthiocoline. The reaction was measured after 60segundos (s) at 412nm using a UV- Visible Spectrophotometer (model Evolution 60S, Thermoscientific, New Hampshire, USA) and analyzed by the software VISION lite (Thermoscientific).

2.5. Video-mounting apparatus for biological assays

For each specific biological assay, the activities were recorded during 30 min by using a video-camera (Panasonic coupled to a 50mm Karl-Zeiz lens) connected or not to an eyepiece of microscopy (Olympus, model SZ51, Germany). The camera had a frame-by-frame (60/s) and was connected to a PC (Infoway, ItauTec, Brazil). Video movies were latter analyzed using a HD Writer AE 2.6T system (Panasonic) with variable speed control.

2.6. Biological Assays

2.6.1 Behavioral assays

For general behavioral study, animals were placed in a demarked open-field arena with a video camera mounted overhead.

2.6.1.2. Sustained Locomotor activity

To analyze walking maintenance, were adopted a behavior paradigm based on the methodology described by Gal and Libersat (2008), namely the forced swimming test. For cockroaches, which are terrestrial insects, water immersion provides a reliable and continuous stressful stimulus that typically produces strong, stereotypic aversion responses (Cocatre-Ziligien and Delcomyn 1990; Gal and Libersat 2008). Swimming in a modified forced

swimming test was induced by placing a cockroach in an opaque pool (25 cm in diameter) filled with water to a height of 10 cm, maintained at 25°C. The duration of swimming in a 1 min period was measured, and swimming behavior was recorded with a camera for later analysis of motion duration.

2.6.1.3. Grooming activity

The grooming behavior of cockroaches was monitored in an opaque plastic box (29 cm x 18 cm x 13 cm) with a clear plastic cover (Weisel-Eichler et al. 1999) and was recorded with a camera for later analysis of motion duration. The duration of continuous grooming in seconds was measured for a 30 min period immediately following treatment. Animals had never been in the testing box previously, and it was therefore a novel environment in all cases. The temperature in the testing room was maintained at 25–30 °C. Testing was performed 2–8 h after the beginning of the light cycle. Control cockroaches were induced to groom by handling (Weisel-Eichler et al. 1999).

2.7. Data Statistical Analysis

The results were expressed as the mean \pm SEM and were analyzed using analysis of variance (Two-Way ANOVA), followed by non parametric Student “t” test as a *post hoc*. A *p*-value ≤ 0.05 indicated significance. Statistics and graphs were made using the Software OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation, MA, USA).

3. Results

3.1. Effect of sublethal doses of Trichlorfon on Brain AChE activity

The analysis of AChE activity of cockroach brain homogenates before and after injection of cockroaches with different sublethal concentrations of trichlorfon revealed a time and dose-dependent enzyme inhibition. Thus, the control values, before injection of trichlorfon with saline was 60 ± 14 mU/mg protein. When trichlorfon ($0.25 \mu\text{M}$) was assayed the AChE activity was decreased to 46 ± 6 mU/mg protein ($n=3$; $p>0.05$). When trichlorfon ($0.5 \mu\text{M}$) was incubated there was a significant decrease of AChE activity (38 ± 3 mU/mg protein; $n=3$; $p<0.05$) compared to saline. A further increase in trichlorfon concentration ($1 \mu\text{M}$), resulted in increase of AChE inhibition (24 ± 6 mU/mg protein; $n=3$; $p<0.05$) (Fig.1).

3.2. *Effect of sublethal doses of trichlorfon on cockroach neurolocomotor activities*

To analyze the influence of trichlorfon on walking maintenance we used the forced swimming test. Control and organophosphate-injected individuals were immersed in a water-filled tank and the duration of spontaneous active swimming was recorded during 1 min trial. All control individuals initiated swimming upon immersion, quickly reaching the wall and continuing to swim rigorously close to the rim. Overall, control subjects ($n=30$) spent 30 ± 8 s of the 1min trial actively swimming. Swimming behavior normally stopped to end of 1min, but it continuous to move their antennae in an exploratory manner, while floating passively in water surface. In this state the application of tactile stimuli evoked another active swimming state. Like control counterparts 66% of trichlorfon-treated cockroaches initiated a vigorous wall-oriented swimming immediately upon immersion. However, there was not a dose-dependent effect within the three concentrations of trichlorfon assayed. Nevertheless, in marked contrast to members of the control group, swimming in trichlorfon-treated individuals increased soon afterwards, although antennal movements, as in control, persisted. The mean duration of active swimming at $0.25\mu\text{M}$ was 42 ± 5 s ($n=10$; $p>0.05$). The dose of $0.5\mu\text{M}$ was not significant compared to saline controls (34 ± 1 s; $n=10$; $p>0.05$). When the concentration of $1\mu\text{M}$ was assayed there was a maximum increase of activity (46 ± 5 s; $n=10$; $p<0.05$) (Fig.2).

3.3. *Effect of sublethal doses of trichlorfon on grooming activity*

In saline inject cockroaches the mean time of continuous grooming was 75 ± 8 s ($n=20$). We found that only the manipulation of the animal and the introduction of the rod of the syringe does not significantly interfere with the animal's normal behavior (87.5 ± 12 s; $n=10$; $p>0.05$).

All cockroaches treated with trichlorfon showed a high dose-dependent increase in grooming activity. Thus, trichlorfon ($0.25\mu\text{M}$) induced a significant increase in grooming activity (344 ± 18 s; $n=10$; $p<0.05$). With the highest dose ($0.5\mu\text{M}$) there was a further increase in the grooming parameters (388 ± 18 s; $n=10$; $p<0.05$). However, at the highest dose ($1\mu\text{M}$) there was also an increase in time spending grooming, but below the former and second concentrations (228 ± 12 s; $n=10$; $p<0.05$) (Fig. 3).

3. 4. *Effect of cholinergic modulators on trichlorfon-induced grooming activity*

When atropine (3 μ M), a non-selective cholinergic muscarinic receptor inhibitor, was assayed alone (76 \pm 2s) there was no alteration compared to control grooming levels (75 \pm 14s). The injection of atropine (3 μ M) combined with trichlorfon (0.5 μ M) significantly reduced the grooming levels to below the control levels (30 \pm 3s; n=10; p <0.05). When pirenzepine (3 μ M), a selective M₁-cholinergic blocker was combined with trichlorfon (0.5 μ M) there was also an inhibition of the grooming pattern of trichlorfon (15 \pm 8s; n=10; p <0.05). However, methoctramine (1 μ M), a selective inhibitor of M₂-M₃ cholinergic receptor, added 5min earlier to trichlorfon (0.5 μ M) there was no significant alteration in the grooming levels induced by the organophosphate solely (418.5 \pm 15s; n=10; p >0.05). Tropicamide (4.5 μ M) a selective M₄-cholinergic antagonist also induced a decrease of trichlorfon (0.5 μ M) -induced grooming activity, although, to levels over the control saline (105 \pm 11s; n=10; p <0.05). *d*-tubocurarine (1.5 μ M) , a competitive blocker of neural and muscle-type ionotropic receptors, applied 15min previously to trichlorfon (0.5 μ M)-also reduced the grooming levels (85 \pm 5s; n=10; p <0.05). Nevertheless, oxotremorine (3 μ M), a non-selective muscarinic agonist, administered 10min before trichlorfon (0.5 μ M), inhibited the grooming increasing activity (44 \pm 12s; n=10; p <0.05) (Fig. 4).

3. 5. *Effect of dopamine modulators on trichlorfon-induced grooming activity*

Since dopamine (DA) activity is mediated by dopamine receptors at pre- and postsynaptic neuronal membrane (e.g D₂ and D₁ receptors families), the protocols described below aimed to verify the influence of dopaminergic modulators on trichlorfon-induced grooming activity. Thus, metoclopramide (0.4 μ M), a DA-D₂ receptor antagonist, injected 10min before trichlorfon (0.5 μ M) inhibited the trichlorfon-induced grooming activity (158 \pm 12s; n=10; p <0.05). When the SCH 23390 (1.85 μ M), a selective DA-D₁ receptor blocker was administered 15min earlier treatment with trichlorfon (0.5 μ M) there was a significant inhibition of grooming levels, even to below of saline levels (54 \pm 6s; n=10; p <0.05). Dopamine release depends on calcium entrance at nerve terminals in order to induce exocytose (Rozov et al. 2001). The voltage-gated calcium channel blocker nifedipine was assayed, in order to verify the influence on trichlorfon-induced grooming activity. Thus,

nifedipine (2.6 μ M) alone, induced a rundown of grooming activity to values below of control saline values (1 \pm 0.35s) (75 \pm 8s). When nifedipine (2.6 μ M) was applied 15min prior trichlorfon (0.5 μ M) there was a significant decrease in grooming activity (1.66 \pm 0.4s; n=10; p <0.05).

4. Discussion

This work shows the effectiveness of the organophosphate trichlorfon in changing insect biochemistry, physiology and behavior. The aspects related to the specific mechanisms by which trichlorfon is altering insect behavior and its consequences are discussed.

Trichlorfon is known to block AChE activity and, therefore, to increase cholinergic transmission along the nicotinic, as well the muscarinic pathways as described earlier (Cummings and Ringman 1999). Based on biochemistry results, the dose of trichlorfon chosen was enough to inhibit all kind of cockroach AChE. Even in sublethal concentrations, trichlorfon injected at hemocoel, was transported by hemolymph and was active at insect CNS. In addition, there is evidence that organophosphates lasts for more than 30 days on environment in concentrations bearing 30 μ g/g (Cheke et al. 2012). This later evidence suggests that persistent organophosphate would may improve not only the chance of inducing insect resistance to cholinesterase inhibitors (Hemingway et al. 2004; Li and Han 2004; Suzuki and Hama 1998) but make a convincing connection among environmental contamination, inhibition of AChE and the insect behavioral alterations (Guez et al. 2005).

It is therefore very likely that the observed changes in cockroach behavior induced by sublethal doses of trichlorfon can be associated to a direct influence of the organophosphate on insect cholinergic-dopaminergic transmission (Torres-Altora et al. 2011). One of these changes was observed in terms of increasing of spontaneous locomotion activity. Monoaminergic systems, and in particular, the dopaminergic systems, are known to profoundly affect motivation and locomotion in insects (Gal and Libersat 2008). Recently, it was shown that the monoamine pair dopamine plays an important role in cerebral circuits in the induction of hypokinesia and/or hyperkinesias depending on the concentrations (Gal and Libersat 2008). Such manipulation would have to affect specific pathways converging, directly or indirectly (for example, via thoracic dorsal unpaired median neurons-Rosenberg et al 2006), onto thoracic pattern-generating circuits to specifically increase the propensity of walking-related behaviors. Further investigation of these pathways, which represent the link

between decisions made in the cerebral ganglia and their execution in the thoracic ganglia, might lead to further understanding of the neuronal basis of motivation and goal-directed actions in insects.

The results presented here also reveal that trichlorfon affects grooming behavior in a complex way, producing quantitative changes. Grooming in insects serve the function of cleaning the outer body surface and may have other functions as well, such as courtship behavior, social signaling, displacement activity and de-arousal (Spruijt et al. 1992). In insects, a neural center involved in grooming behavior is not well identified but, it was demonstrated, that dopamine may act as the main neurotransmitter associated with this response (Weisler-Eicheler et al. 1999).

In our experimental conditions application of the selective D₁-inhibitor SCH23390 significantly counteract the trichlorfon-induced grooming increase, clearly demonstrating the DA-D₁ receptor class as the main actor in controlling this kind of behavior in insects (Libersat 2003; Mustard et al. 2010). However, the effectiveness of methoclopramide in significantly inhibit the trichlorfon-induced increase of grooming, must indicate the poor selectivity of this drug over insect DA-D₂ receptors and the concomitant blockage of insect D₁ receptors (Degen et al. 2000). In addition to the above described observations, it is worthwhile to notice, the efficiency of the nifedipine, in counteract the grooming-induced increase of trichlorfon as would be expected. This inhibition maybe explained by the recent discovery about the link between D₁-like receptors activation and the opening of calcium channels at presynaptic regions of dopaminergic neurons of immature rats (Momiya and Fukazawa 2007).

There is a reasonable assumption as the insect brain is the most likely site at which such complex behavior changes are probably being mediated (Libersat et al. 2009). To date, the insect nervous system consists of a central nervous system (CNS) formed by a cephalic supra, sub and circumoesophageal ganglion mass or brain and a peripheral nervous system (PNS), which includes the stomatogastric nervous system (Osbourn 1996). Klemm (1976) reported that the stomatogastric nervous system is made up of the frontal ganglion, which is connected to the brain via two frontal nerves and the nervus connectivus, and to the hypocerebral ganglion by the single recurrent nerve. The latter is linked to the corpora cardiaca and to the two ventricular ganglia that send nerves to the gut. The frontal and hypocerebral ganglia of the stomatogastric nervous system consist of approximately 200 neurons using a variety of different neurotransmitters (Klemm et al. 1986). Therefore, a number of projections of this neuronal system provide acetylcholine through axons of cholinergic neurons whose somata are located in other nuclei (Alcantara et al. 2003; Aosaki et

al. 2010). Thus, ACh is found in very high levels within insect nervous tissue (Le Corrionc and Hue, 1993), and it appears to be the major neurotransmitter used by insect sensory neurons (Pitman 1985). Therefore, ACh is known to be an effective target site for numerous insecticides (Corbett et al. 1984; Lummis and Sattelle 1985).

Two major types of ACh receptors have been characterized in insects: nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) (Le Corrionc and Hue, 1993). The distribution of nAChRs in insect nervous system is far complex and numerous studies have revealed the pharmacological properties of these receptors on synapse-free cell bodies of neurones as well as on the synapse–neuropile complex (Suter and Usherwood, 1985; Breer and Sattelle, 1987; Thany and Tricoire-Leignel, 2011). It is assumed that at synaptic level, nAChRs are associated with postsynaptic mediated excitation and membrane depolarization (MacDermott et al., 1999; Albuquerque et al., 2009), while at presynaptic sites nicotinic activation could produce either excitation or inhibition indirectly through the release of endogenous transmitters or modulators (Fu and Liu, 1996; Thany and Tricoire-Leignel, 2011). In insects it is found that the presynaptic muscarinic receptors act as autoreceptors regulating the release of ACh (Le Corrionc et al., 1991; Leitch and Pitman, 1995; Hue et al. 1989) while postsynaptic muscarinic receptors reduced the giant fiber spike threshold (Le Corrionc and Hue, 1991). In addition, release-enhancing presynaptic muscarinic and nicotinic receptors co-exist and interact on dopaminergic nerve endings of rat CNS (Grilli et al., 2008).

We suggest that the inactivation of AChE by trichlorfon increases insect nervous system levels of ACh, over-stimulating both nicotinic (nAChR) and muscarinic (mAChR) receptors (Osbourne, 1996) increasing the number of action potentials towards the insect brain. In this scenario, the ACh released after stimulation of the sensory neuron would activate cholinergic muscarinic receptors (M_1 - M_1 , M_3 , M_5 - or M_2 - M_2 , M_4 - classes) (Aosaki et al., 2010; Li et al., 2009,) or nicotinic (N_1 - N_2) (Libersat, 2003) at somata of dopaminergic neurons, which would in turn modulate the release of dopamine onto the sensory afferent terminal (Torres-Altoro et al. 2011). Indeed, nicotine exhibits differential dose-dependent actions on both insect and mammalian presynaptic nAChRs, stimulating dopamine release and activating dopamine D_1 - and D_2 -dependent signaling pathways in central nervous system (Torres-Altoro et al. 2011). Activation of presynaptic muscarinic receptors at the cercal afferent-giant interneuron synapses in the cockroach, *Periplaneta americana* (Le Corrionc and Hue 1993), and at the planta hair afferent-proleg motoneuron synapses in the tobacco

hornworm, *Manduca sexta* (Trimmer and Weeks 1989, 1993) results in a reduction in the spike threshold and an increase in the excitability of the postsynaptic neuron.

Results from further experiments are consistent with the hypothesis that neurons whose release dopamine are in fact modulated by cholinergic autoreceptors (Alcantara et al. 2003; Grilli et al., 2009; Threlfell et al. 2010). Application of general muscarinic modulators such as atropine, pirenzepine, oxotremorine and tropicamide, prior to Triclorfon, showed that pirenzepine>atropine>oxotremorine>tropicamide were effective in reduce the groomings, suggesting that the M₁AChR receptors are prevalent for this signal modulation (Aosaki et al. 2011). Furthermore, methocramine failed to alter Triclorfon-induced grooming activity, excluding at least in our experimental conditions, the effectiveness of M₂-M₃AChR autoreceptors for the dopamine modulatory mechanisms (Osbourne 1996; Judge and Leitch 1999; Aosaki et al. 2011). The significative decrease in trichlorfon-induced grooming effect by *d*-tubocurarine also suggests that nicotinic cross-talk is also prevalent in the dopaminergic pathway at insect central nervous systems (Salvaterra and Folders 1979, Grilli et al. 2009).

Sublethal effects of organophosphate insecticides on insect behavior are important to be determined. Most of insecticides affect one of the five biological systems in insects. These include the nervous system, the production of energy, the recycling of cuticle, the endocrine system and the water balance. The nervous system is far the most important, since can lead to unpredictable changes in behavior such as feeding patterns (Nicolaus and Lee 1999), reproduction (Delpuech et al. 2005), foraging (Guez et al. 2005), migration and thermoregulation (Grue et al. 1997), among others. The results point that the environmental persistence of insecticides should not be an issue ignored, and that these sub doses are amenable to cause significant influences on the nervous system of animals (e.g. changing behavioral patterns). Further studies on trichlorfon related sublethal effects on *Phoetalia pallida* should be carry out, mostly those regarded to the influence of the acylpeptide hydrolase in the expression of behavioral changes (Richards et al. 2000). Molecular biology associated to electrophysiological approaches are also in mind, in order to improve the knowledge about cholinergic/dopaminergic cross-talking in insects.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Thais Posser and Magali Cristina Hartmann for technical assistance. G.D Stürmer was granted by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES and Programa de Bolsas de Desenvolvimento Acadêmico-PBDA (UNIPAMPA).

5. References

- Albuquerque E, Pereira E, Alkondon M, Rogers S (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89: 73–120
- Alcantara AA, Chen V, Herring BE, Mendenhall JM, Berlanga ML (2003) Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Research* 986: 22–29
- Aosaki T, Miura M, Suzuki T, Nishimura K, Masuda M (2010) Acetylcholine–dopamine balance hypothesis in the striatum: An update. *Geriatr Gerontol Int* 10: S148–S157
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Breer H, Sattelle, DB (1987) Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *The Journal of Insect Physiology* 33: 771-790
- Cheke RA, McWilliam AN, Mbereki C, van der Walt E, Mtobesya B, Magoma RN, Young S, Eberly JP (2012) Effects of the organophosphate fenthion for control of the red-billed quelea *Quelea quelea* on cholinesterase and haemoglobin concentrations in the blood of target and non-target birds. *Ecotoxicology* 21: 83-86
- Cocatre-Ziligien JH, Delcomyn F (1990) Fast axon activity and the motor pattern in cockroach legs during swimming. *Physiol Entomol* 15:385–392
- Corbett JR, Wright K, Baille AC (1984) *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. 2nd Edn, Academic Press, London, New York
- Cummings JL, Ringman J M (1999) Metrifonate (trichlorfon): a review of the pharmacology, pharmacokinetics and clinical experience with a new acetylcholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 8:463-471
- Degen J, Gewecke M, Roeder T (2000) The pharmacology of a dopamine receptor in the locust nervous tissue. *European Journal of Pharmacology* 396:59-65.
- Delpuech JM, Bardon C, Boulétreau M (2005) Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 49:186-191
- Ellman GL, Courtney KD, Andres, Jr V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95
- EPA. Environmental protection agency. Available at: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/trichlorfon_red.pdf. Accessed: 07/05/2012
- Fest C, Schmidt KJ (1982) *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*. Springer- Verlag Berlin 360p

Franco JL, Posser T, Mattos JJ, Trevisan R, Brocardo PS, Rodrigues AL, Leal RB, Farina M, Marques MR, Bainy AC, Dafre AL (2009) Zinc reverses malathion-induced impairment in antioxidant defenses. *Toxicology Letters* 187:137-143

Fu W-M and Liu J-J (1997) Regulation of acetylcholine release by presynaptic nicotinic receptors at developing neuromuscular synapses. *Mol Pharmacol* 51: 390–398

Gal R, Libersat F (2008) A parasitoid wasp manipulates the drive for walking of its cockroach prey. *Curr Biol* 18:877-882

Grue CE, Gibert PL, Seeley ME (1997) Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Amer Zool* 37: 369-388

Guez D, Zhang S, Srinivasan M (2005) Methyl parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 14:431-437

Grilli M, Patti L, Robino F, Zappettini S, Raiteri M, Marchi M (2008) Release-enhancing pre-synaptic muscarinic and nicotinic receptors co-exist and interact on dopaminergic nerve endings of rat nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry* 105, 2205-2213

Grilli M, Zappettini S, Zoli M, Marchi M (2009) Pre-synaptic nicotinic and D2 receptors functionally interact on dopaminergic nerve endings of rat and mouse nucleus accumbens. *Journal of Neurochemistry* 108: 1507-1514.

Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 653-665

Hue B, Lapied B, Malecot CO (1989) Do presynaptic muscarinic receptors regulate acetylcholine release in the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*? *The Journal of Experimental Biology* 142: 447-451

Judge S, Leitch B (1999) Modulation of Transmitter Release from the Locust Forewing Stretch Receptor Neuron by GABAergic Interneurons Activated via Muscarinic Receptors. *Journal of Neurobiology* 40:420-431

Kagabu S, Ishihara R, Hieda Y, Nishimura K, Naruse Y (2007) Insecticidal and neuroblocking potencies of variants of the imidazolidine moiety of imidacloprid- Related neonicotinoids and the relationship to partition coefficient and charge density on the pharmacophore. *J Agric Food Chem* 55:812-818

Klemm N (1976) Histochemistry of putative transmitter substances in the insect brain. *Prog Neurobiol* 7:99-169

Klemm NR, Hustert R, Cantera R, Nässel DR (1986) Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary canal of locust and crickets (Orthoptera, Insecta). *Neuroscience* 17: 247-261

- Le Corrond H, Hue B (1991) Pharmacological properties of presynaptic muscarinic receptors in the sixth abdominal ganglion of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Pesticide Science* 33: 205-211
- Le Corrond H, Hue B (1993) Pharmacological and electrophysiological characterization of a postsynaptic muscarinic receptor in the central nervous system of the cockroach. *J Exp Biol* 181:257–278
- Le Corrond H, Lapied B, Hue B (1991) M2-like presynaptic receptors modulate acetylcholine release in the cockroach (*Periplaneta americana*) central nervous system. *The Journal of Insect Physiology* 37: 647-652
- Leitch B, Pitman RM (1995) Modulation of transmitter release from the terminals of the locust wing stretch receptor neuron by muscarinic antagonists. *The Journal of Neurobiology* 28: 455-464
- Li F, Han ZJ (2004) Mutations in acetylcholinesterase associated with insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 397-405
- Li Z, Prus AJ, Dai J, Meltzer HY (2009) Differential Effects of M₁ and 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptors on Atypical Antipsychotic Drug-Induced Dopamine Efflux in the Medial Prefrontal Cortex. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutic* 330: 948–955
- Libersat F (2003) Wasp uses venom cocktail to manipulate the behavior of its cockroach prey. *J Comp Physiol A* 189: 497-508
- Libersat F, Delago A, Gal R (2009) Manipulation of Host Behavior by Parasitic Insects and Insect Parasites. *Annual Review of Entomology* 54: 189-207
- Lummis SCR, Sattelle DB (1985) Binding of ;V-[propionyl-3H]propionylated abungarotoxin and L-[benzyl-4,4'-3H]quinuclidinyl benzilate to CNS extracts of the cockroach *Periplaneta americana*. *Comp Biochem Physiol* 80:75-83
- Mac Dermott AB, Role LW, Siegelbaum S (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annual Reviews Neuroscience* 22: 443-85
- Medegela RH, Mosha RD, Sandvik M, Skaare JU (2010) Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology* 19: 855-63
- Momiyama T, Fukazawa Y (2007) D1-like dopamine receptors selectively block P/Q-type calcium channels to reduce glutamate release onto cholinergic basal forebrain neurones of immature rats. *Journal of Physiology* 580.1:103–117
- Mustard JA, Pham PM, Smith BH (2010) Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J Insect Physiol* 56:422–430.

- Nicolaus LK, Lee H (1999) Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behaviour. *Ecol Appl* 9: 1039-1049
- Nishizawa Y (1960) New low toxic organophosphorus insecticides. *Bull agric chem Soc Japan* 24:744-745
- Osbourne RH (1996) Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors. *Pharmacol Ther* 69:117-142
- Pitman RM, Fleming JR (1985) The action of dopamine on an identified insect neurone. *Pestic Sci* 16:447-448
- Richards PG, Johnson MK, Ray DE (2000) Identification of Acylpeptide Hydrolase as a Sensitive Site for Reaction with Organophosphorus Compounds and a Potential Target for Cognitive Enhancing Drugs. *Mol Pharmacol* 58:577-583
- Rosenberg LA, Pflüger HJ, Wegener G, Libersat F (2006) Wasp venom injected into the prey's brain modulates thoracic identified bioaminergic neurons. *Journal of Neurobiology*. 66:155-168
- Rozov A, Burnashev N, Sakmann B, Neher E (2001) Transmitter release modulation by intracellular Ca²⁺ buffers in facilitating and depressing nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the rat neocortex indicates a target cell-specific difference in presynaptic calcium dynamics. *Journal of Physiology* 531:807-826
- Salvaterra PM, Foders RM (1979) [¹²⁵I]2a-Bungarotoxin and [³H]quinuclidinyl-benzilate binding in central nervous systems of different species. *J. Neurochem.* 32: 1509- 1517
- Spruijt BM, Hol T, Rousseau J (1992) Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. *Physiology & Behavior* 51:747-752
- Stankiewicz M, Dabrowski M, Lima ME (2012) Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of Toxicology* 2012: 1-11
- Suter C, Usherwood PN (1985) Action of acetylcholine and antagonists on somata isolated from locust central neurons. *The Journal of Comparative Biochemistry and Physiology C* 80: 221-229
- Suzuki K, Hama H (1998) Carboxylesterase of the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover. Isoelectric point variants in an organophosphorus insecticide resistant clone. *Appl Entomol Zool* 33:11-20
- Thany SH, Tricoire-Leignel H (2011) Emerging pharmacological properties of cholinergic synaptic transmission: comparison between mammalian and insect synaptic and extrasynaptic nicotinic receptors. *Current neuropharmacology* 9: 706-7014.
- Threlfell S, Clements MA, Khodai T, Pienaar IS, Exley R, Wess J, Cragg S J (2010) Striatal muscarinic receptors promote activity dependence of dopamine transmission via distinct

receptor subtypes on cholinergic interneurons in ventral versus dorsal striatum. *Journal of Neuroscience* 30: 3398–3408

Torres-Altoro M, Mathur BN, Drerup JM, Rachel T, Lovinger DM, Callaghan JP, Bibb JA (2011) Organophosphate dysregulate dopamine signaling, glutamatergic neurotransmission, and induce neuronal injury markers in striatum. *Journal of Neurochemistry* 119: 303–313

Trimmer BA, Weeks JC (1989) Effect of nicotinic and muscarinic agents on a identified motoneurone and its direct afferent inputs in larval *Manduca sexta*. *J Exp Biol* 144:303-337

Trimmer BA, Weeks JC (1993) Muscarinic acetylcholine receptors modulate the excitability of an identified insect motoneuron. *J Neurophysiol* 69:1821-1836

Trudeau LE, Gutierrez R (2007) On cotransmission and neurotransmitter phenotype plasticity. *Molecular Interventions* 7: 138-146

Wafford KA, Sattelle DB (1986) Effects of amino acid neurotransmitter candidates on an identified insect motoneurone. *Neurosci Lett* 63:135-140

Weisel-Eichler A, Haspel G, Libersat F (1999) Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology* 202:957–964

6. Figures

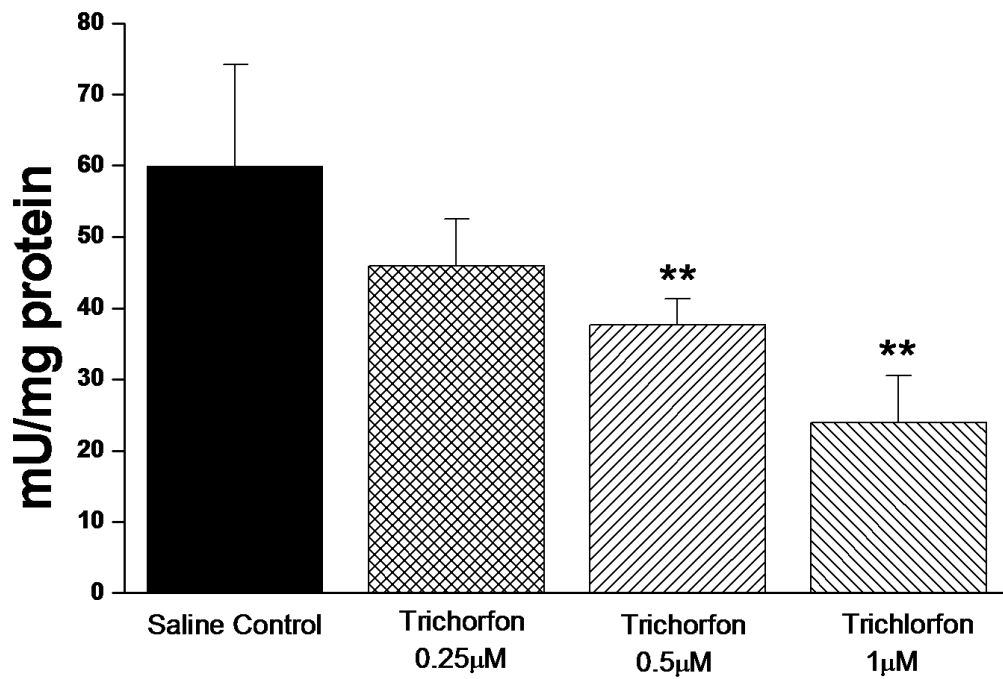


Fig 1. Graph of acetylcholinesterase inhibition in total brain homogenate (n=3 for each dose) after 6 hours exposure to trichlorfon (0.25; 0.5; 1µM). Data were expressed as mU/mg protein. ** $p < 0.01$ in comparison to saline control with non parametric test *t*.

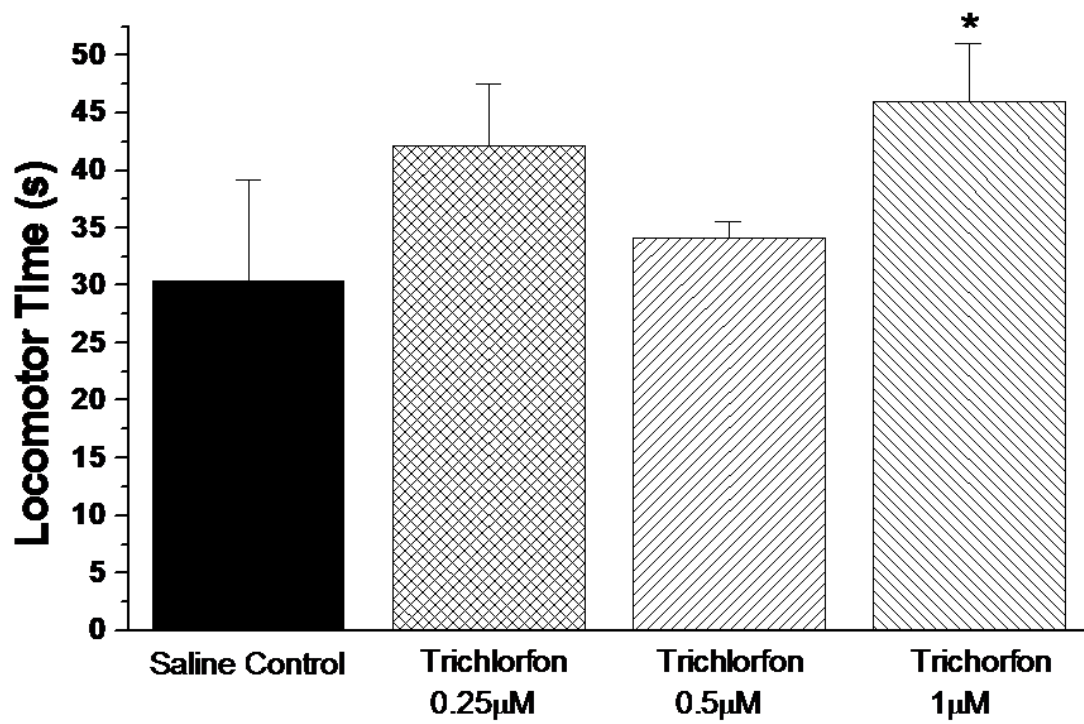


Fig 2. Influence of different concentrations of Trichlorfon (0.25; 0.5; 1µM) on cockroach locomotor activity. The bars show the amount of time (in seconds) of constant swimming during 1min recordings. * $p < 0.05$ in comparison to saline control with non parametric test t .

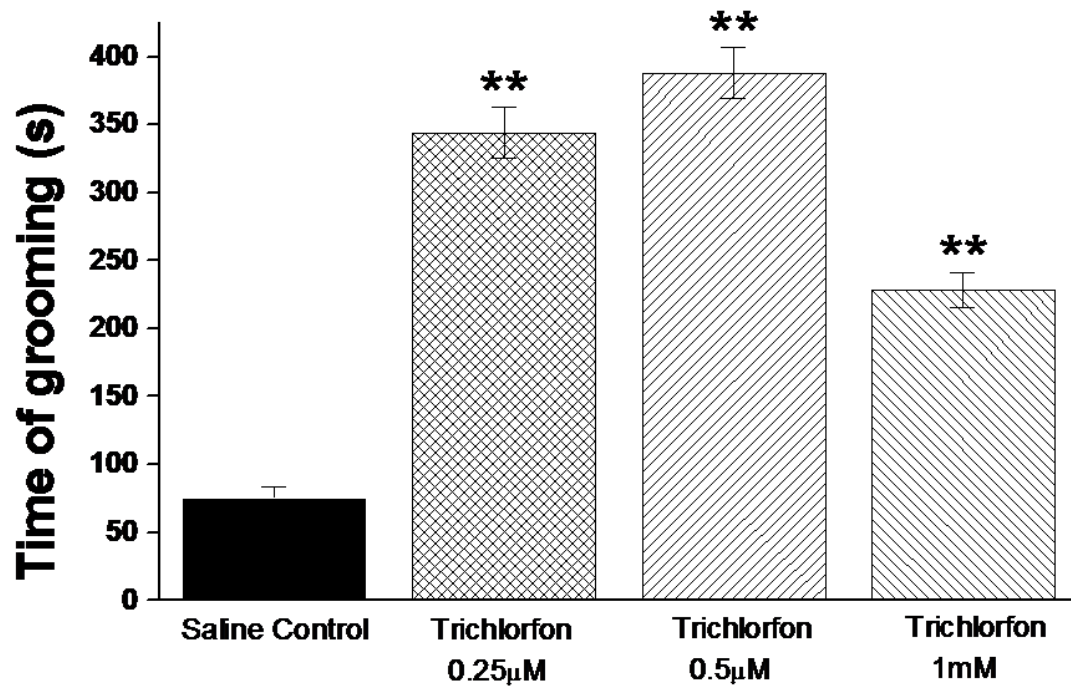


Fig 3. Increase of grooming behavior by different sublethal doses of trichlorfon (0.25; 0.5; 1µM). The grooming activity was recorded during 30 min and the results expressed as the total time of grooms in seconds. ** $p < 0.01$ in comparison to saline control with non parametric test t .

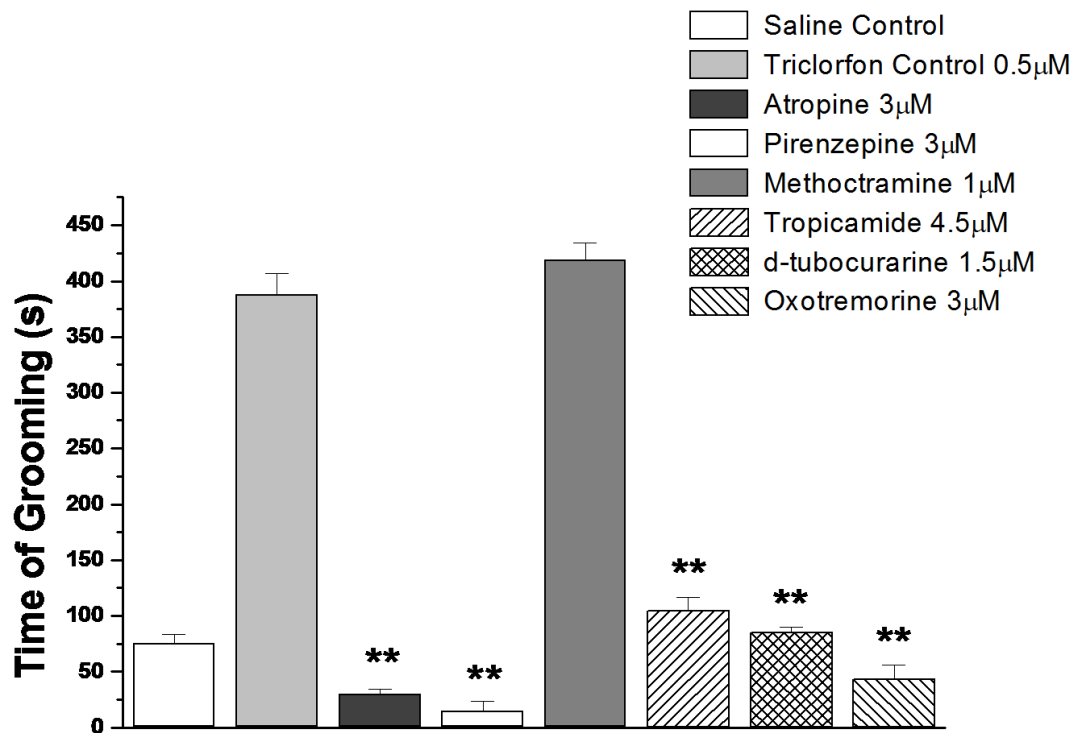


Fig 4. Effect of different cholinergic modulators on Trichlorfon-induced grooming increase in cockroaches. Drugs were injected in the third abdominal segment 10-15 min before trichlorfon (0.5µM). The grooming activity was recorded during 30 min and the results expressed as the total time of grooms in seconds. ** $p < 0.01$ in comparison to trichlorfon control with non parametric test t .

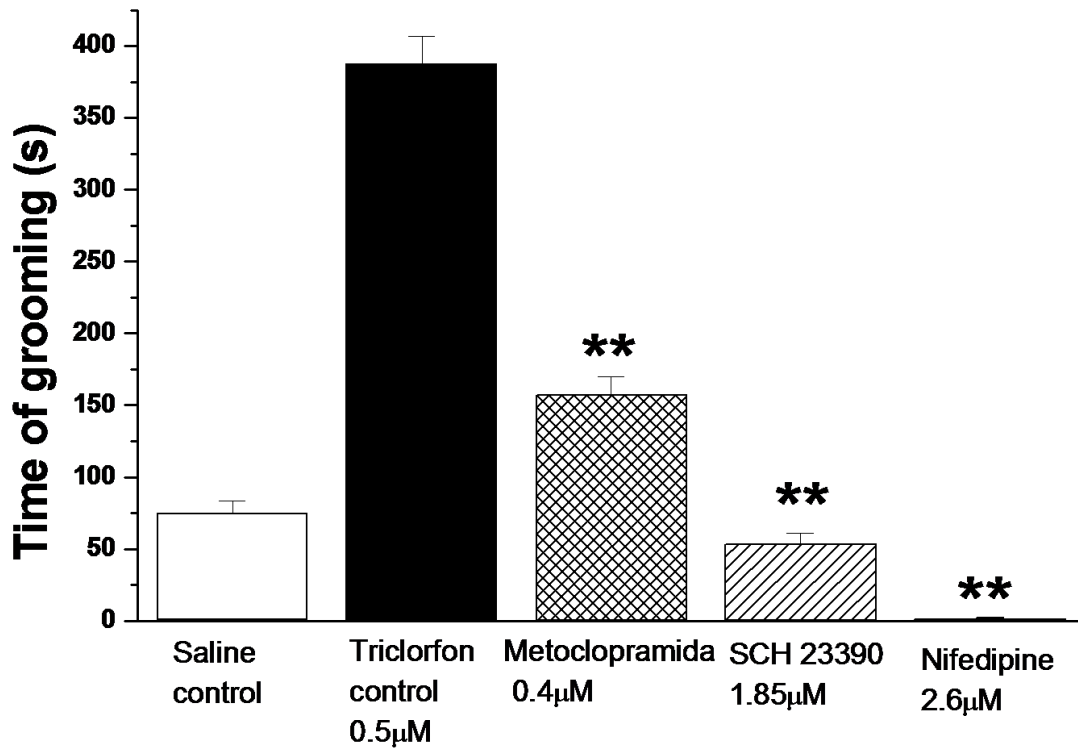


Fig 5. Inhibition of Trichlorfon-induced groomings in cockroaches by dopamine modulators. Drugs were injected in the third abdominal segment 10-15 min before trichorfon (0.5µM). The grooming activity was recorded during 30 min and the results expressed as the total time of grooms in seconds. ** $p < 0.01$ in comparison to trichorfon control with non parametric test *t*.

4. Material e Métodos Complementares

4. 1. Animais

4. 1. 1. Moscas

Foram utilizadas moscas-da-fruta, *Drosophila melanogaster*, de ambos os sexos. Conservadas em estufa a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade, cerca de 300 moscas *Drosophila melanogaster* foram mantidas em frascos de vidro (250 mL) contendo meio nutritivo preparado.

4. 2. Determinação da Dose letal mínima do Triclorfon em ensaios com *Drosophila melanogaster*

Realizado conforme descrito por HIRATA et al 2003. Na determinação da Dose letal mínima para matar 50% dos animais (DL_{50}) foram preparadas soluções com diferentes concentrações do inseticida. Para cada concentração, alíquotas de 500 μL destas soluções foram distribuídas em papel-filtro colocado sobre a superfície interna de frascos de vidro de 12cm de altura por 5cm de diâmetro interno. A cada teste realizado, foi preparado um frasco controle contendo 500 μL de sacarose. As moscas, anestesiadas com baixas temperaturas, foram distribuídas nos frascos em número de 50 (sexo1:1) e, em seguida mantidas em estufa a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $90 \pm 3\%$ de umidade. As percentagens de mortalidade foram determinadas após 24 e 48 horas de exposição para estabelecer os valores da DL_{50} a partir da mortalidade dos animais.

5. Resultados Complementares

5. 1. Determinação da DL50 do Triclorfon em ensaios com *Drosophila melanogaster*

A dose de triclorfon que matasse 50% dos indivíduos seria considerada a dose letal mínima para *Drosophila melanogaster* (Figura 5). Na concentração de 5 μ M houve mortalidade de 1 animal em 24 horas e de 3 animais em 48 horas. Na dose de 10 μ M houve uma mortalidade de 5 animais após 24 horas e de 6 animais após 48 horas. Na dose de 25 μ M em 24e 48 morreram somente 5 animais. Já na dose de 50 μ M após 24 horas 25 animais morreram, considerando essa dose a DL₅₀ para 24 horas. Em 48 horas a dose de 50 μ M causou a mortalidade de 42 animais. A dose de 100 μ M apresentou uma mortalidade elevada já em 24 horas com a morte de 48 animais e em 48 horas causou a mortalidade de todos os animais, considerando a dose de 100 μ M a DL₁₀₀.

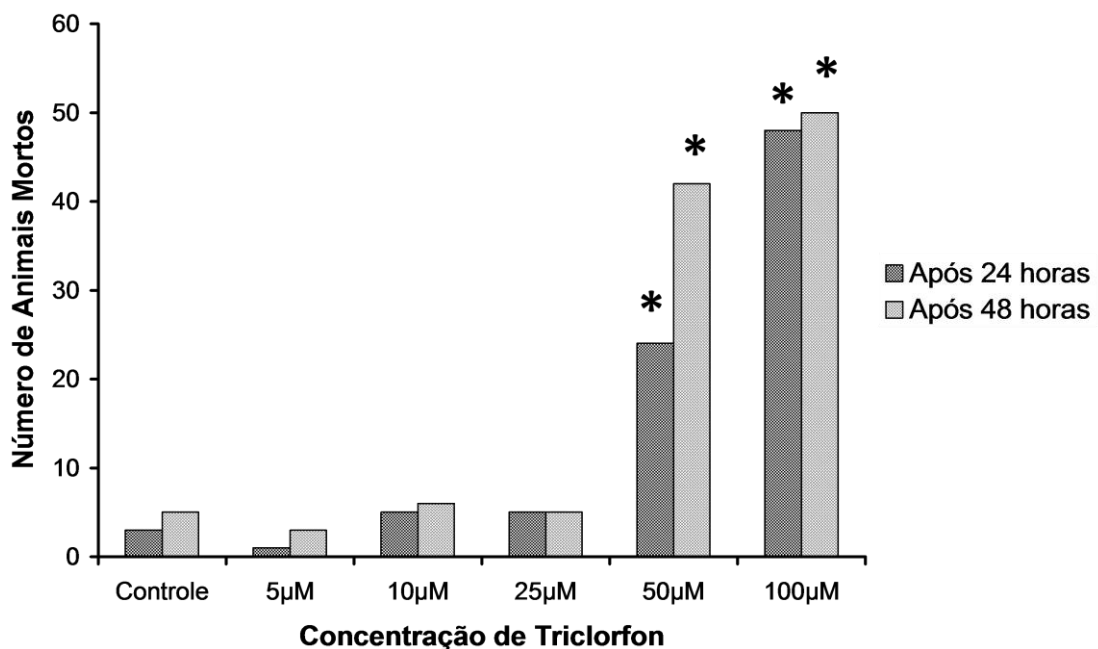


Figura 5 - Determinação da DL50 em moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*) administradas com diferentes concentrações de Triclorfon após 24 e 48 horas. Observe que a dose de 50 μ M induziu a morte de 50% dos indivíduos em 24 horas, sendo essa considerada a DL50. A dose de 100 μ M induziu a morte de 100% dos indivíduos em 48 horas, sendo considerada a DL100. * significativo para $p < 0,05$ com teste "t" não paramétrico.

6. PROPOSTA DE MECANISMO NEUROFARMACOLÓGICO DO TRICLORFON

No mecanismo proposto para o triclorfon (Figura 6), a inibição da AChE induziria um aumento na concentração da ACh em interneurônios colinérgicos. Essa ACh em excesso, modularia a liberação do neurotransmissor dopamina ativando inicialmente autoreceptores muscarínicos provavelmente do subtipo M_1/M_2 presentes na membrana pré-sináptica dos neurônios dopaminérgicos. A ativação desses receptores pela ACh ativaria as vias de sinalização da adenosina ciclase-monofosfato cíclico de adenosina-proteína quinase A e/ou a via da fosfatidil C-Inositol trifosfato-diacilglicerol, reforçando a liberação de dopamina pela modulação do influxo de Ca^{2+} . Além desse efeito pré-sináptico, a ACh ativaria em paralelo os receptores muscarínicos pós-sinápticos do subtipo M_2 presentes na membrana de neurônios pós-sinápticos dopaminérgicos. A ativação desses receptores pela ACh ativariam a via de sinalização a via da fosfatidil C-Inositol trifosfato-diacilglicerol, aumentando a liberação do Ca^{2+} , facilitando a liberação do neurotransmissor dopamina. Nesse modelo, os receptores D_1 pós-sinápticos de dopamina seriam ativados pela dopamina aumentando a sua atividade. Os receptores D_2 de dopamina pré-sinápticos diminuiriam a liberação da dopamina pela diminuição a produção do monofosfato cíclico de adenosina. O papel dos receptores $5HT_{2A}$ e $5HTT_3$ é ainda desconhecido para esse modelo e em nossas condições experimentais.

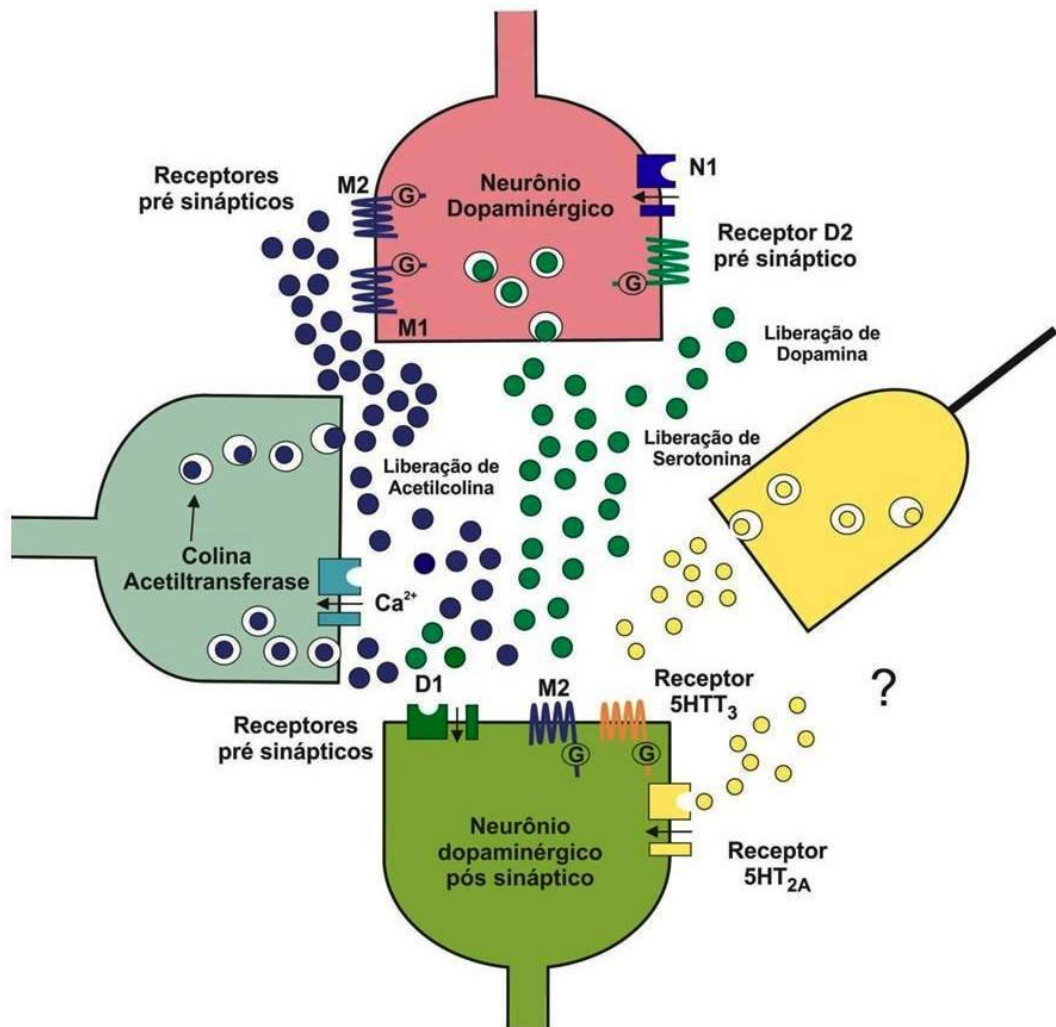


Figura 6. Diagrama esquemático da neurotransmissão central em baratas. Figura modificada de DATY 2012.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados observados foi possível delinear as seguintes considerações:

- Os resultados apontam que a persistência ambiental dos inseticidas organofosforados é um importante problema a ser considerado; verificamos que essas subdoses são passíveis de causar influências significativas sobre o sistema nervoso dos animais (por exemplo, mudança nos padrões comportamentais).
- As alterações comportamentais observadas traduziram-se principalmente em mudanças no perfil de marcha e aumento da atividade de limpeza das antenas e patas (*grooming*). Essas alterações podem estar relacionadas a uma desregulação da via dopaminérgica, que inclui em última análise a ativação do receptor DA-D1 da dopamina, induzindo aumento na atividade de *grooming*.
- Comprovou-se a existência de uma co-transmissão em neurônios dopaminérgicos e que a atividade colinomimética indireta do triclorfon é capaz de ativar autoreceptores muscarínicos do subtipo-M1 (que são de feedback positivo) em insetos.
- Receptores nicotínicos neuronais também parecem contribuir para promover uma modulação positiva da liberação da dopamina.

Perspectivas

- Outros estudos sobre os efeitos subletais relacionados ao triclorfon em baratas devem ser realizados, principalmente aqueles relacionados à influência da Acylpeptídeo Hidrolase na expressão das mudanças de comportamento e como alvo para a ação de organofosforados.
- Investigar o papel do triclorfon na inibição da Fosfatidil inositol (PI) 3-Quinase
- Abordagens em biologia molecular e eletrofisiologia também serão úteis, a fim de melhorar o conhecimento sobre o mecanismo de co-transmissão colinérgica/dopaminérgica em insetos.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G.; Reyes, F.; Rath, S. (2001). *Drosophila melanogaster meigen*: 3. Sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. *Quim. Nova*, Vol. 24, 768-772.
- ANVISA. (2010). Disponível em :
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9d00bc80474575688351d73fbc4c6735/Artesanta%C3%A7%C3%A3o.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 27/11/2012.
- ANVISA & UFPr. (2012). Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- BARTH, V. & BIAZON, A. (2010). Complicações decorrentes da intoxicação com organofosforados. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.5, n.2, p.27-3.
- BOBULA, S.; B. J. and Valentine, B. D. (1985). Phylogenetic implications of grooming behavior in cockroaches (Insecta: Blattaria). *Psyche* 92, 369–385.
- BRASIL, Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, Diário Oficial da União de 08/01/2002.
- BRASIL, Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. “Lei Federal dos Agrotóxicos”. Brasília, Diário Oficial da União de 12/07/1989.
- BREER, H. & SATTELLE, D.B. (1987). Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *The Journal of Insect Physiology* 33: 771-790.
- BULLANGPOTI, V.; Visetson, S.; Milne, M.; Milne, J.; Pornbanlualap, S.; Sudthongkongs, C.; Yayapat, S. (2006). The novel botanical insecticide for the control brown plant hopper (*Nilaparvata lugens* Stal.). *Commun Agric Appl Biol Sci*;71:475–481.
- CARNEIRO, F.; Pignati, W.; Rigotto, R.; Augusto, L.; Rizollo, A; Muller, N.; Alexandre, V.; Friedrich, K.; Mello, M. (2012). Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.
- CASARETT & DOULL’S Toxicology: the basic science of poisons/editor, Curtis D. Klaasen – 7th edition. McGraw-Hill. New York. 1309 p. 2008.
- CRAIG, C. & STITZEL, R. (2004). *Modern pharmacology with clinical applications*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 832p.
- DATY, R. (2012). Olfaction in Parkinson’s disease and related disorders. *Neurobiology of disease* 46:527-552.
- DELPUECH, J.; Bardon, C.; Boulétreau, M. (2005). Increase of the behavioral response to kairomones by the parasitoid wasp *Leptopilina heterotoma* surviving insecticides. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 49:186-191.

- EYE, P & BUCKLEY, N. (2006). Pralidoxime for organophosphate poisoning. *Lancet*. 368(9553): 2110–2111.
- GALLO, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.; De Baptista, G.; Berti Filho, E.; Parra, J.; Zucchi, R.; Alves, S.; Vendramim, J.; Marchini, L.; Lopes, J.; Omoto, C. (2002). *Entomologia agrícola*. Volume 10. *FEALQ*. Piracicaba- SP. p 920.
- GUEDES, R. N. C. Resistência de insetos a inseticidas. In: ZAMBOLIN, L. (1999) *Manejo integrado de doenças e pragas*. Viçosa: UFV p. 101-107.
- GRUE, C.; Gibert, P.; Seeley, M. (1997). Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: Thermoregulation, food consumption and reproduction. *Amer Zool* 37: 369-388.
- GUEZ, D.; Zhang, S.; Srinivasan, M. (2005). Methyl parathion modifies foraging behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology* 14:431-437.
- HAUBRUGE, E.; Amichot, M.; Cuany, A.; Berge, J.; Arnaud, L. (2002). Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1181–1190.
- HIRATA, R.; Skortzaru, B.; Narciso, E. (2003). Avaliação de degradação de inseticidas, em função do pH, utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.70, n.3, p.359-365.
- HUBER, I.; Masler, E.; Rao, B. (1990). *Cockroaches As Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research*. CRC Press. 280 p.
- JAMES, R. & XU, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrates Pathology*. 109: 175-182.
- KERKUT, G.; Pitman, R.; Walker, R. (1969). Sensitivity of neurones of the insect central nervous system to iontophoretically applied acetylcholine or GABA. *Nature* 222:1075–1076.
- LIBERSAT, F & PFLUEGER, H. (2004). Monoamines and the orchestration of behavior. *BioScience* 54:17–25.
- LINDERS, J.; Jansma, J.; Mensink, B.; Otermann, K. (1994). *Pesticides: Benefaction or Pandora's Box? A synopsis of the environmental aspects of 243 pesticides*. Report N° 679101014. National Institute of public health and environmental protection bilthoven, The Netherlands. Disponível em: <http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/10254/1/679101014.pdf>. Acesso em: 24 de setembro de 2012.
- LOPES, R.; Paraiba, L.; Caccarelli, P.; Tornisielo, V. (2006). Bioconcentration of trichlorfon insecticide in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Chemosphere* 64: 56–62.

- MEDGELA, R.; Mosha, R.; Sandvik, M.; Skaare, J. (2010). Assessment of acetylcholinesterase activity in *Clarias gariepinus* as a biomarker of organophosphate and carbamate exposure. *Ecotoxicology* 19: 855-63.
- MOHARIL, M.; Wadegaonkar, P.; Rao, N.; Tikar, S.; Raj, M.; Nimbalkar, S. (2008). Detection of a Carboxylesterase-Mediated Resistance Mechanism in *Plutella xyloestella* (L.) by Diagnostic Microplate Assay. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4:623-629.
- MUSTARD, J.; Pham, P.; Smith, B. (2010). Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J Insect Physiol* 56:422–430.
- NICOLAUS, L. & LEE, H. (1999). Low acute exposure to organophosphate produces long-term changes in bird feeding behavior. *Ecol Appl* 9: 1039-1049.
- OSBOURE, R. (1996). *Insect Neurotransmission: Neurotransmitters and Their Receptors*. *Pharmacol Ther* 69:117-142.
- OWEN, M. (1971). Insect venoms: identification of dopamine and noradrenaline in wasp and bee stings. *Experientia* 27:544–545.
- RAND, M. (2010). Drosophotoxicology: the growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratology* 32: 74-83
- RANDALL, D.; Burggren, W.; French, K. (2000). *Fisiologia Animal*. 4 ed. *Guanabara Koogan*: Rio de Janeiro, 729 p.
- RAYMOND-DELPECH, V.; Matsuda, K.; Sattelle, B.; Raju, J.; Sattelle D. (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience* 5:119-33
- SANTOS, C.; Silva, E.; Paiva, R.; Oliveira, V.; Burla, R.; Bastos, J.; Oliveira, M. (2011). Efeito do Triclorfon (Masoten[®]) sobre as esterasas de *Oreochromis niloticus*. Resumo apresentado no II Seminário de Ecotoxicologia aquática. Campos de Goytacazes –Rio de Janeiro- Brasil. Disponível em:
<http://www.essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/SEAquatica/article/viewFile/1497/697>.
 Acesso em: 01/10/2012.
- SANTOS, V.; Donnici, C.; Costa, J.; Caixeiro, J. (2007). Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova* 30: 159-170.
- SHONO, T.; Ohsawa, K.; Casida, J. (1979). Metabolism of trans and cis permethrin trans and cis cypermethrin and decamethrin by microsomal enzymes. *J Agric Food Chem.*, 27: 316-325.
- SHONO, T. (1985). Pyrethroid resistance, importance of the kdr type mechanism. *J. Pest. Sci.*, 10:141-146.

SINDAG. Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Vendas de defensivos agrícolas são recordes e vão a US\$ 8,5 bi em 2011. Disponível em: http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256, acessado em 24 de setembro de 2012.

SPRUIJT, B.; Hol, T.; Rousseau, J. (1992). Approach, avoidance, and contact behavior of individually recognized animals automatically quantified with an imaging technique. *Physiology & Behavior* 51:747-752.

STANKIEWICZ, M.; Dabrowski, M.; Lima, M. (2012). Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of Toxicology* 2012: 1-11.

TAYLOR, D. & NEWBURGH, R. (1979). The synthesis and content of neurotransmitters and their effect on cyclic nucleotide accumulation in the central nervous system of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry* 9:265-272.

VALLES, S. & KOEHLER, P. (2011). Insecticides Used in the Urban Environment: Mode of Action. University of Florida. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN07700.pdf>. Acesso em: 01/10/2012.

VIEGAS JUNIOR, C. (2003). Torpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova* 26:390-400.

WEISEL-EICHLER, A.; Haspel, G.; Libersat, F. (1999). Venom of a parasitoid wasp induces prolonged grooming in the cockroach. *The Journal of Experimental Biology* 202:957-964.