

Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais

República Federativa do Brasil

Luis Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Luís Carlos Guedes Pinto

Presidente

Sílvio Crestana

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Cláudia Assunção dos Santos Viegas

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Sílvio Crestana

Diretor-Presidente

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Tatiana Deane de Abreu Sá

Diretores-Executivos

Embrapa Meio Ambiente

Paulo Choji Kitamura

Chefe Geral

Ladislau Araújo Skorupa

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Cristina Martins Cruz

Chefe-Adjunto de Administração

Ariovaldo Luchiani Junior

Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 1516-4691

Junho, 2006

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 51

Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais

Vera Lúcia de Castro

Jaguariúna, SP
2006

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3867-8750 Fax: (19) 3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*

Secretário-Executivo: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membros: *Heloisa Ferreira Filizola, Manoel Dornelas de Souza, Cláudio César de Almeida Buschinelli, Maria Conceição Peres Young Pessoa, Osvaldo Machado R. Cabral e Marta Camargo de Assis*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Sandro Freitas Nunes*

1ª edição eletrônica
(2006)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Castro, Vera Lúcia de

Biomarcadores e desenvolvimento neurocomportamental:
aspectos experimentais / Vera Lúcia de Castro. – Jaguariúna:
Embrapa Meio Ambiente, 2006.

25p. – (Embrapa Meio Ambiente. Documentos; 51).

1. Biomarcadores. 2. Toxicologia. I. Título. II. Série.

CDD 615.9

© Embrapa 2006

Autor

Vera Lúcia de Castro

Veterinária, PhD,

Pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente,

Rodovia SP 340 - Km 127,5

13.820-000, Jaguariúna, SP.

E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

Sumário

Introdução	05
Biomarcadores	07
Aspectos gerais dos biomarcadores	07
Características dos biomarcadores	08
Relação dos biomarcadores com a avaliação de neurotoxicidade	09
Aspectos do delineamento dos estudos de desenvolvimento neurocomportamental em roedores	10
Bateria de testes de neurotoxicidade	12
Avaliação crítica das respostas aos biomarcadores obtidas experimentalmente	13
Variabilidade da resposta obtida nos ensaios experimentais	14
Obtenção de efeito dose-resposta	16
Análise dos fatores intercorrentes	17
Perspectivas dos estudos do desenvolvimento neurocomportamental	18
Referências Bibliográficas	19

Biomarcadores e Desenvolvimento Neurocomportamental: Aspectos Experimentais

Vera Lúcia de Castro

Introdução

Os produtos utilizados como insumos no atual modelo de agricultura podem por vezes desestabilizar os agroecossistemas, provocando danos em sistemas biológicos. Esses produtos podem se distribuir no ambiente e provocar agravos à saúde da população quer em sua forma original quer como metabólitos, por inalação de gases ou partículas, ingestão de água ou comida, ou absorção pela pele através do contato com água de chuva, de uso doméstico e das coleções aquíferas.

À medida que o ambiente torna-se essencial no plano da saúde da coletividade, o desenvolvimento sustentável tornou-se parte integrante de decisão política de saúde ambiental. Assim é que a proposta de um desenvolvimento sustentável, incluindo a atividade agrícola, contempla a conservação dos recursos naturais, a utilização de tecnologias apropriadas e a viabilidade econômica e social (CASTRO, 2004).

Além da contaminação das pessoas envolvidas direta ou indiretamente nas atividades relacionadas à agricultura, pode ocorrer a contaminação de recém-nascidos que tem sido associada à exposição maternal ambiental e/ou ocupacional sendo que alguns produtos ainda podem ser excretados no leite (ARBUCKLE; SEVER, 1998; WHYATT et al., 2002; CERRILLO et al., 2005; RIBAS-FITÓ et al., 2005).

A exposição materna a agroquímicos durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento animal. Embora o organismo materno possa transformar um químico ou pelo menos reduzir sua concentração, muitas substâncias podem atravessar a placenta. O trabalho agrícola feminino nos países

em desenvolvimento produz ao redor de 60 e 80% dos alimentos, além de 70% do trabalho infantil estar relacionado ao setor agrícola (DINHAM; MALIK, 2003). Nesse contexto, há também a possibilidade de que o desempenho neurocomportamental de crianças em idade pré-escolar, filhos de trabalhadores rurais, possa ser afetado pela exposição a pequenas doses de inseticidas organofosforados a semelhança do que tem sido observado em decorrência da exposição em adultos (ROHLMAN et al., 2005).

Durante a prenhez podem ocorrer prejuízos no desenvolvimento embrionário como prejuízos no ganho de peso corporal e na maturação de sistemas fisiológicos como neurotransmissão, deficiências anatômicas, etc. O período neonatal tem seu início ao nascimento da prole, sendo finalizado com o término da lactação. Nesse período ocorrem a maturação funcional e ganho de peso corporal, os quais podem sofrer prejuízos com a exposição a substâncias químicas (CASTRO, 2004).

Em decorrência, a avaliação dos possíveis efeitos decorrentes da exposição aos agroquímicos é importante de ser realizada em diferentes períodos de desenvolvimento, especialmente naqueles considerados críticos devido a possível influência na morfologia e na fisiologia do sistema nervoso. Um importante período do desenvolvimento cerebral ocorre nas duas primeiras semanas pós-natais do rato enquanto que em seres humanos ocorre no terceiro trimestre da gestação e na primeira infância (COSTA et al., 2004).

A maior sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos dos agroquímicos em crianças seria resultante da diferença fisiológica nas diferentes fases da vida (recém-nascidos, crianças e adultos) em decorrência de alguns fatores como área corporal, relação da massa cerebral e corporal, período de desenvolvimento, ventilação, função renal e atividade enzimática (SELEVAN; KIMMEL; MENDOLA, 2000; SCHEUPLEIN; CHARNLEY; DOURSON, 2002; GENTRY; COVINGTON; CLEWELL III, 2003; COSTA et al., 2004). Nesse sentido, pode-se citar a enzima paroxonase (PON) que não é produzida nos mesmos níveis de um adulto até os 2 anos de idade, o que torna as crianças dessa faixa etária vulneráveis aos inseticidas organofosforados (CHEN et al., 2003).

Contudo, diferentes suscetibilidades não implicam necessariamente em maiores riscos em crianças. O efeito real vai depender dos mecanismos fisiometabólicos e das características do produto em estudo (SCHEUPLEIN; CHARNLEY; DOURSON, 2002). O biomonitoramento das possíveis conseqüências à exposição aos agroquímicos é, portanto, importante no que se refere a efeitos no desenvolvimento animal e potencial de neurotoxicidade (CHELONIS et al., 2004).

O monitoramento biológico da exposição constitui-se em uma avaliação que qualifica e/ou quantifica a exposição de um indivíduo ou de uma amostra da

população com o uso de amostras biológicas. Para a realização do monitoramento biológico é necessário o conhecimento de um biomarcador.

Os agroquímicos em uso atualmente muitas vezes ocasionam sinais e sintomas que podem estar associados à exposição a mais de um princípio ativo. Nesse sentido, é importante estabelecer indicadores biológicos ou biomarcadores relacionados à exposição a esses produtos, indicadores esses mais específicos e baseados em critérios científicos bem estabelecidos. A seguir são colocadas algumas considerações a respeito dos biomarcadores e os critérios para sua aceitação e validação.

Biomarcadores

Aspectos gerais dos biomarcadores

O biomarcador compreende toda substância ou seu produto de biotransformação (marcador de dose interna, que relaciona a exposição ambiental à dose interna) ou qualquer alteração bioquímica precoce (marcador de efeito, que avalia os efeitos biológicos que se traduzem em alterações funcionais) cuja determinação possa ser realizada nos fluidos biológicos, tecidos ou ar exalado. Esta determinação deve estabelecer a relação entre a exposição e o efeito tóxico refletida em alterações pré-clínicas e agravos à saúde ou ainda permitir entender os mecanismos relacionados à ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos (marcador de suscetibilidade ou genético).

A importância do uso destes biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem diretamente relacionados aos efeitos na saúde. Eles devem, ao exporem os problemas e suas causas, serem úteis para alcançar os objetivos das políticas referentes à saúde. Porém, a avaliação dos efeitos da exposição humana aos agroquímicos, conta atualmente com um número limitado de biomarcadores reconhecidos e validados. Em relação aos efeitos das substâncias neurotóxicas, o uso de biomarcadores experimentais permite a associação com a exposição a baixos níveis, fornecendo conhecimentos e evidências necessários para a aplicação de medidas de prevenção e controle de sua exposição no âmbito das políticas públicas de saúde.

Atualmente, têm-se procurado a identificação de marcadores que possibilitem antecipar o desenvolvimento de situações que possam conduzir a contaminações ambientais danosas à saúde; de preferência caracterizando a expressão precoce dos efeitos. O monitoramento de efeitos clínicos, na medida do possível, deve ser preterido enquanto indicador da avaliação do risco, uma vez que instalados;

representam a ocorrência da exposição e do dano subsequente.

Características dos biomarcadores

Os biomarcadores, sejam de exposição ou efeito, são ferramentas utilizadas nos estudos epidemiológicos ambientais, buscando-se estabelecer uma relação entre a exposição aos agentes químicos e os efeitos na saúde dos indivíduos expostos. A importância do uso destes biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato destes estarem mais diretamente relacionados aos efeitos na saúde do que os parâmetros ambientais.

Os biomarcadores, de forma geral, devem ser de fácil utilização e de baixo custo de obtenção para permitir seu amplo uso. Eles devem mostrar facilidade de levantamento, de compreensão e de comparação e o nível de detalhamento exigido da medida deve ser adequado de forma a não dificultar a sua utilização.

Eles devem ainda idealmente refletir tendências ao longo da escala de tempo do monitoramento, facilitando relacionar causa a efeito de forma rápida e objetiva. O biomarcador deve, tanto quanto possível, envolver a medida de respostas biológicas em uma escala temporal que evidencie alterações sutis, além de trazer informações quanto ao seu mecanismo de ação (CASTRO, 2004).

A validação do biomarcador pode ser afetada por suas características intrínsecas tais como: a) especificidade em relação ao contaminante; b) classificação (dose interna, efeito ou suscetibilidade), c) sensibilidade (capacidade de distinguir diferentes níveis de exposição, suscetibilidades e efeitos decorrentes da exposição); d) geração de curvas dose-resposta correlacionando os níveis de exposição e o marcador e e) evidenciar possíveis fatores de confusão e de variações inter e intra-individuais (DOR et al., 1999).

Contudo, nem sempre é possível expressar correlações diretas lineares entre os efeitos observados e a exposição (ALONSO et al., 2004; CONOLLY; LUTZ, 2004). Por exemplo, algumas observações sugerem que os organofosforados possam ter outras atividades biológicas além da inibição da enzima acetilcolinesterase e que em alguns casos, os sinais de toxicidade neurocomportamental não se correlacionam diretamente com o nível da inibição da enzima (FARAHAT et al., 2003; SMULDERS et al., 2004; PEEPLES et al., 2005).

Relação dos biomarcadores com a avaliação de neurotoxicidade

Há alguns possíveis indicadores, abordando diferentes enfoques, para a avaliação do risco e da exposição a uma substância neurotóxica em indivíduos expostos (AMORIM, 2003), quais sejam:

a) Neurofisiológico: a avaliação neurofisiológica como o eletroencefalograma, que é um exemplo desse caso, apresenta baixo valor preditivo na identificação dos efeitos neurológicos iniciais;

b) Avaliação clínica e neurocomportamental: devem ser realizadas com base em um protocolo muito bem detalhado para ser conclusiva. A avaliação neurocomportamental é realizada através de métodos para avaliar as funções cognitivas como a aprendizagem e a memória. Estes testes, apesar de serem muito utilizados em indivíduos expostos a solventes e metais pesados, podem ter seus resultados alterados por outros motivos que não pela ação do produto avaliado e

c) Neuroquímico: Há várias evidências experimentais mostrando que, na progressão de doenças neurotóxicas, os eventos bioquímicos precedem as alterações estruturais e danos permanentes ao sistema nervoso central. Contudo, as principais limitações destes parâmetros neuroquímicos são a acessibilidade ao tecido alvo e a correlação e estabelecimento do valor preditivo de marcadores substitutos periféricos (concentração de cálcio intracelular, atividade da enzima acetilcolinesterase eritrocitária, etc) com os danos centrais.

A integração dos elementos pertinentes à avaliação de biomarcadores de neurotoxicidade – neurofisiologia, neuroquímica e comportamento, provavelmente será capaz de fornecer as informações necessárias para a avaliação de riscos à saúde. A complexidade das funções do sistema nervoso aliada a variabilidade dos sítios neurológicos contribuem para esse panorama por serem fatores limitantes para o estudo e estabelecimento de indicadores da ação neurotóxica dos agroquímicos em seres humanos (AMORIM, 2003).

Embora existam importantes diferenças entre o cérebro humano e o de roedores, podem ser identificadas estruturas análogas. Assim, a ontogenia de determinados comportamentos pode ser usada para construir inferências em relação à maturação de estruturas cerebrais específicas ou circuitos neuronais em roedores e primatas, incluindo o ser humano. A obtenção de informações mais específicas a respeito de períodos críticos do desenvolvimento do sistema nervoso pode melhorar a análise de risco identificando períodos para avaliação da exposição e efeito dose-resposta aos toxicantes, a avaliação da plausibilidade biológica dos achados para os seres humanos e a comparação dos dados entre as

espécies (SELEVAN; KIMMEL; MENDOLA, 2000).

Por outro lado, mesmo quando existe o conhecimento do biomarcador envolvendo alterações fisiológicas e/ou toxicocinéticas, é necessária a aplicação de técnicas para o monitoramento ambiental e biológico que normalmente não fazem parte da rotina das equipes técnicas envolvidas neste processo. Essa situação leva a priorização de novas abordagens tanto na avaliação quanto na comunicação das situações de risco originadas pelo ambiente. A seguir, são colocados alguns aspectos dos testes geralmente realizados para o estudo da neurotoxicidade.

Aspectos do delineamento dos estudos de desenvolvimento neurocomportamental em roedores

As avaliações sobre o desenvolvimento animal frequentemente incluem, além das observações quanto ao aparecimento de sinais físicos, os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental. Assim, é recomendada uma abordagem em três vertentes: a) identificação e formulação do problema a ser pesquisado, b) análise dos resultados obtidos na avaliação através de métodos experimentais em laboratório, modelos toxicocinéticos e dados epidemiológicos e, c) caracterização do risco (POHL et al., 2005).

É importante também que os efeitos observados ocorram devido a exposição à substância teste e não devido ao estado de toxidez materna em doses muito elevadas; uma vez que em mamíferos é indispensável o desempenho normal das funções maternas para a saúde dos filhotes. Os sinais tradicionalmente observados de toxicidade materna em estudos experimentais são decréscimo no ganho de peso (o peso das fêmeas geralmente é observado durante todo o período do teste), duração da prenhez, diminuição do consumo de água e alimento, sinais clínicos e mortalidade.

Conforme os objetivos de cada estudo, podem-se utilizar diferentes delineamentos experimentais. Por exemplo, em relação à exposição das fêmeas podem-se realizar estudos aonde a ninhada é mantida com sua mãe biológica ou através de *cross-fostering*, quando ocorre a troca de mãe da ninhada.

O comportamento maternal também pode ser estudado. Há alguns métodos descritos para avaliar o comportamento maternal uma vez que a avaliação da possível influência materna no desenvolvimento dos filhotes é alvo de preocupação na literatura há algum tempo (CHAMPAGNE et al., 2003).

Em relação aos filhotes, considera-se a ninhada como unidade experimental. O uso de alguns filhotes por ninhada pode afetar o poder do teste estatístico alterando a taxa de falso positivo ou negativo. Em caso de limitação de tempo e/ou

recursos pode-se realizar testes com um animal por sexo por ninhada escolhido ao acaso (nos casos de avaliação de risco a uma substância) ou considerar a média da resposta de dois ou três filhotes como a unidade da resposta experimental (BUELKE-SAM et al., 1985; HOLSON; PEARCE, 1992; HASEMAN et al., 2001); em decorrência da variabilidade da resposta entre os filhotes da mesma ninhada (ULBRICH, 2001).

A observação da presença ou ausência dos parâmetros de desenvolvimento físico e neurocomportamental é realizada de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento do parâmetro estudado em todos os filhotes avaliados; o que ocorre geralmente entre o 1º. e o 26º. dias de vida pós-natal – pnd (ALDER, 1983). São anotados, por filhote, os dias respectivos em que ocorrerem por exemplo, abertura do ouvido externo, aparecimento de pelo, erupção dos dentes incisivos, abertura de vagina, descolamento de orelha, abertura dos olhos e descida dos testículos.

Normalmente os filhotes são avaliados quanto à viabilidade ao nascimento e ao desmame respectivamente (número de filhotes natimortos/nascidos vivos) e (número de filhotes desmamados/nascidos vivos). Este último resulta na curva de sobrevivência. O peso é também acompanhado do nascimento até o desmame, construindo a curva de crescimento.

Alguns dos testes de desenvolvimento neurocomportamental (CASTRO; CHIORATO; PINTO, 2000; CASTRO; GÓES; CHIORATO, 2004; CHAPILLON et al., 1998; LI, 2005) que podem ser utilizados a fim de avaliar atividade, coordenação, reflexos, etc. são exemplificados a seguir:

1 - reflexo de endireitamento: o animal é colocado sobre a mesa (pnd 2 a 4), em decúbito dorsal; mede-se o tempo gasto para que volte à posição anterior, ou seja, apoiado sobre as quatro patas.

2 - atividade motora: observa-se a locomoção do animal (pnd 14, 21 e 28) em um campo aberto por 6 (seis) minutos ou em uma caixa de atividade com células fotoelétricas. Ela pode ser estudada em diversas situações de diversos delineamentos experimentais, porém, atentando-se para as diversas fases do desenvolvimento animal.

3 - geotaxia negativa: o animal é colocado com a cabeça para baixo (pnd 10 e 15) em uma plataforma a 25º e mede-se o tempo gasto em segundos para que se reoriente, ou seja; vire o corpo em 180º.

4 - rotarod: é utilizado um bastão de madeira de 3 cm de diâmetro por 40 cm de largura, forrado de plástico, em uma altura de 18 cm e com um motor que proporciona sua rotação entre 5 a 15 rpm. O animal é colocado no bastão para verificar sua coordenação por 5 min (pnd 10, 14 e 21).

5 - natação: cada filhote é solto no centro de um aquário e observado por 10 segundos, por 3 vezes consecutivas (pnd 7, 14 e 21), sendo secos logo em seguida e colocados de volta em suas respectivas gaiolas. O desempenho dos filhotes é avaliado segundo uma escala de escores.

6 - resposta de agarrar: o animal é colocado somente com as patas dianteiras em um cilindro de superfície lisa, de 5 (cinco) centímetros de diâmetro e de altura superior a do seu corpo (pnd 3 a 7); verifica-se se o mesmo agarra-se ao cilindro ou se cai na mesa.

7 - resposta de subir: o animal é colocado com as quatro patas sobre uma rampa de tela de arame de 30°, com a cabeça virada para o lado mais alto desta; verifica-se se o animal sobe, desce ou permanece onde foi colocado inicialmente (pnd 6 a 11).

Baterias de testes de neurotoxicidade

Tem-se procurado melhorar os protocolos experimentais disponíveis e adicionar alvos de estudo que possam fornecer uma melhor caracterização dos efeitos da exposição a agentes químicos (LIMA, 2003). A evolução dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal tem estimulado a melhora dos protocolos de avaliação de neurotoxicidade; o que será capaz de otimizar a detecção de possíveis efeitos relacionados à exposição aos agroquímicos (LUFT; BODE, 2002; MEYER, 2003; REUTER et al., 2003).

Não obstante existam inúmeros estudos sobre os efeitos neurocomportamentais obtidos através de testes experimentais, são relativamente poucas as análises que enfatizam a perspectiva da incorporação e do impacto desta informação nos processos pertinentes às decisões políticas sobre programas e ações de saúde. Contudo, tais baterias variam de acordo com as recomendações e/ou legislação de cada país ou de acordo com critérios estabelecidos pelos pesquisadores envolvidos no trabalho.

Essas baterias de testes podem ser realizadas através de dois tipos de avaliações:

(a) Avaliação comportamental e clínica – Em seres humanos, as avaliações podem ser feitas mediante aplicação de questionários, exames clínicos, (ex, dano de condutividade nervosa periférica), avaliações comportamentais e de alterações de funções cognitivas, como, por exemplo, aprendizagem e memória, as quais têm sido utilizadas em indivíduos expostos a solventes e metais pesados no caso de seres humanos. As dimensões comportamentais mais documentadas são

sociabilidade, cooperação, estado emocional, nível de atividade, atenção, impulsividade, ansiedade e irritabilidade. Outras funções motoras também podem ser avaliadas como postura e reflexos entre outros. Contudo, na interpretação dos resultados obtidos com crianças, há variáveis que devem ser examinadas como outros fatores de desenvolvimento como a linguagem, situação socioeconômica familiar, atividade física regular, etc., que podem influenciar o desempenho motor das crianças avaliadas (DESPRÉS et al., 2005), ou

(b) Avaliação experimental em animais – A realização de protocolos experimentais em animais de laboratório, como por exemplo a FOB (*Functional Observational Battery*) (MOSER et al., 2004) têm se mostrado úteis na avaliação da neurotoxicidade (LUFT; BODE, 2002). Os estudos com animais podem, assim, auxiliar no entendimento dos efeitos neurocomportamentais decorrentes da exposição aos agroquímicos. Os estudos neurotoxicológicos destas baterias experimentais em animais incluem avaliações preliminares (*screening*), que se constituem por bateria de observação funcional, quando são avaliados reflexos e algumas reações como salivação, piloereção, etc além da medida automatizada da atividade motora. A atividade motora é medida como o número de interrupções das fotocélulas distribuídas em um aparelho denominado caixa de atividade. Além dos testes descritos podem ser conduzidas avaliações do desenvolvimento cognitivo (aprendizado e memória) (SARTER, 2004).

Avaliação crítica das respostas aos biomarcadores obtidas experimentalmente

A contribuição de um biomarcador à avaliação da saúde ambiental é ditada em última análise por sua validade como marcador. A validade é uma característica complexa e descreve a extensão com a qual o biomarcador reflete um determinado evento de um sistema biológico (SCHULTE; TALASKA, 1995). Geralmente, esses eventos são características e efeitos da exposição e suscetibilidade do organismo exposto.

Alguns dos critérios para a validação dos biomarcadores incluem então a compreensão de sua relevância temporal e biológica, cinética, variabilidade e efeito dose-resposta no organismo exposto não-alvo, além de fatores interferentes que possam afetar os resultados obtidos e conseqüentemente gerar resultados falso positivo ou negativo. Outros fatores a serem considerados na validação de um biomarcador são os de caráter ético, social e legal.

Com base nos conceitos apresentados, pode-se concluir que a utilização dos

indicadores pressupõe determinar o que medir e seu referencial numérico, para sua comparação, enquanto medidas qualitativas e quantitativas. As medidas quantitativas são mais precisas e mais versáteis para transformações que as qualitativas. Em consequência, o tipo de variável utilizado condiciona as oportunidades de análise (PEREIRA, 1999). Outro aspecto importante é definir fatores de comparabilidade, ou seja, verificar se os perfis utilizados no estudo são os mesmos; antes de iniciar a avaliação. Desta forma, podem ser comparados os resultados obtidos com o mesmo delineamento experimental.

No caso de indicadores de mesma natureza, mas não diretamente comparáveis por terem sido avaliados através de escalas diferentes; pode-se empreender uma normalização dos dados obtidos, criando novas formas de avaliação dos dados. Assim, por exemplo, pode ser diminuído o intervalo entre as observações, aumentado o tempo de observação entre outros. Essa normalização deve contudo ser realizada de forma cuidadosa e criteriosa para não incorrer em erros de interpretação.

Devido ao fato dos testes para avaliação de neurotoxicidade por vezes não serem específicos e relacionados a um determinado toxicante, alguns dos critérios geralmente selecionados para sua avaliação e controle de qualidade dos dados obtidos experimentalmente em um laboratório são obtenção de efeito dose-resposta e variabilidade da resposta. O planejamento dos testes e a interpretação dos dados obtidos nas avaliações comportamentais realizadas devem ser feitos cuidadosamente, considerando aspectos relacionados ao desenho experimental e ao método utilizado, a validação dos testes, ao controle de fatores intercorrentes, a variabilidade e a análise dos dados, entre outros (SLIKKER JUNIOR et al., 2005). A seguir, são colocadas algumas considerações a respeito do tema.

Variabilidade da resposta obtida nos ensaios experimentais

Quanto à sensibilidade do teste

A sensibilidade de um teste refere-se à habilidade desse teste em detectar alterações na resposta que está sendo avaliada, de preferência em doses abaixo daquela que produza sinais evidentes de toxicidade do agente em estudo.

As respostas biológicas comportamentais podem apresentar grande variabilidade de resposta. De fato, algumas medições apresentam grande variação entre os indivíduos.

A avaliação de um teste comportamental, quanto a sua capacidade em detectar um dano tóxico que exceda os limites da flutuação dos valores normalmente encontrada no desempenho dos organismos testes, pode ser realizada através do

coeficiente de variação (CV) definido como, $CV = (\text{Desvio Padrão}/\text{média}) \times 100$. Um CV de valor moderado (18-40%) pode ser um indicador que a resposta à medida do teste comportamental é relativamente sensível ao efeito tóxico. O CV permite comparações quanto à sensibilidade de testes que avaliem respostas ou funções similares entre si (BUELKE-SAM et al., 1985).

No caso de dados experimentais com variabilidade alta, pode não ser detectada a diferença entre os tratamentos, quando, na verdade, estas diferenças existem em virtude da heterogeneidade do material experimental ou do método empregado. A fim de lidar com uma variabilidade considerada alta deve-se considerar uma forma de delineamento em que a variação entre indivíduos é minimizada de modo a evidenciar o significado estatístico dos efeitos de interesse para o estudo (ALTMAN, 1991; HASEMAN et al., 2001).

Quanto ao controle de qualidade dos dados obtidos

Um processo pode ser considerado confiável se os dados registrados encontram-se dentro dos limites de controle e a variabilidade dos resultados individuais se encontra estável. A fim de realizar a avaliação da conformidade dos ensaios deve conhecer o processo de análise; obter a fidelidade dos dados coletados representados pelos controles; e, estabelecer critérios para verificar se as alterações observadas são causadas por variações inerentes ao sistema e se serão estáveis através do tempo ou se ocorrem ocasionalmente.

Alguns problemas podem afetar o resultado de uma análise. O erro sistemático refere-se à exatidão (acurácia) que uma determinação é feita. Ela será tanto maior quanto mais próxima se encontrar do valor de referência. A falta de exatidão promove os chamados viéses (*bias*) ou tendências. Pode-se citar como exemplo problemas com a calibração, mudanças de lotes de reagentes ou equipamentos, etc. Por sua vez, o erro ao acaso refere-se à precisão de um método, avaliada pelo desempenho da análise repetida de uma amostra contendo quantidades estáveis de um constituinte. Ele provoca mudanças inconsistentes no sistema, ocasionando dispersão em torno do respectivo valor médio. São exemplos, erro de amostragem, erro de pipetagem, anotações mal feitas, etc.

Objetivando estabelecer os controles de medição de características importantes do ensaio deve ser desenvolvido um plano de controle de inspeção destas que assegure que a variabilidade se mantenha dentro de limites permitidos para cada metodologia.

Para o cálculo da variabilidade aleatória dos resultados é necessária a utilização de uma aproximação estatística que forneça o desvio máximo que um resultado apresenta relativamente ao seu valor médio. Ao contrário das médias, onde os

valores tentam representar um valor central, as medidas de variabilidade devem ser interpretadas como distâncias numa escala de valores. As análises das medidas de variabilidade são então fundamentais para a correta interpretação dos dados e não devem ser negligenciadas. É importante, em consequente, assegurar que a variabilidade se mantenha dentro de limites permitidos para cada metodologia. Para a medida da variabilidade, podem ser utilizadas várias formas de análise dos dados como o desvio padrão, diferença entre percentis (valor máximo menos o valor mínimo) e intervalo de confiança. Entre os vários parâmetros usados para medir a variabilidade, o desvio padrão é o dado mais aplicado que pode fornecer, quando os resultados exibem uma distribuição normal uma probabilidade bem definida para a dispersão dos resultados (ALTMAN, 1991).

A manutenção dos controles da rastreabilidade do organismo teste e das condições experimentais através de formulários padronizados facilita a comparação retrospectiva de um mesmo ensaio através de dados de diferentes épocas para analisar a variabilidade da resposta observada nos grupos controle em experimentos semelhantes, padronizados e realizados no mesmo laboratório (FESTING; ALTMAN, 2002). A distribuição dos resultados gerados ao longo do tempo pode ser então usada para aprimorar o estudo dos indicadores biológicos. O valor do controle dos dados obtidos com os dados históricos depende da qualidade destes últimos.

Devido a várias possibilidades de interpretações, é importante fornecer instruções específicas para a análise dos controles, de como interpretar os resultados e o que fazer baseado nestes resultados. Para tanto, é necessário definir regras de aceitação e rejeição dos dados com o estabelecimento de uma regra estabelecendo claramente estes limites. Em um laboratório podem-se assim construir gráficos de controle para medir e analisar a variação nos procedimentos e métodos utilizados. Esses gráficos apresentam uma linha central esboçada como a média geral, e os limites de confiança superior e inferior, em geral estabelecidos como 3 desvios-padrão em torno da média, com 99,73 % de chances de todas as medidas estarem dentro desta faixa de acordo com a distribuição normal. Resultados com valores fora dos limites estabelecidos poderão ser considerados como fora do padrão após avaliação cuidadosa da natureza dos dados.

Obtenção de efeito dose-resposta

Os indicadores devem preferencialmente refletir um aumento da resposta conforme o aumento da dose de exposição, considerando a distribuição normal de frequência da sensibilidade em uma população, baseados na curva de distribuição

de frequência normal básica (Gaussiana). No caso da distribuição normal a sensibilidade dos animais que respondem é distribuída normalmente, ou seja, em pequenas doses a sensibilidade é pequena, chegando a um máximo e declinando novamente. Uma inclinação superficial pouco pronunciada representa um grupo de animais menos homogêneo (ausência de resposta e sensibilidade com mudança na dose) que uma inclinação mais pronunciada. A comparação das curvas obtidas com diferentes substâncias ou as diferentes respostas a uma substância é feita através do cálculo de algumas variáveis após a transformação logarítmica das curvas dose-resposta.

Geralmente, as curvas de interação primária de um químico com a molécula alvo são monotônicas, ou seja, há um aumento ou uma diminuição de acordo com a variação da dose. Contudo, nem sempre é possível estabelecer uma correlação dose-resposta evidente. Em particular, para as substâncias mutagênicas, um fenômeno da relação dose-resposta caracterizado pela estimulação em baixas doses e inibição nas mais altas é denominado “hormesis” e pode ser observado independentemente do agente em estudo, do modelo biológico ou da resposta mensurada (GOLDSTEIN, 2005).

Em sistemas biológicos complexos, podem ocorrer relações não monotônicas (com o mesmo comportamento) ou bifásicas em resposta a um toxicante como as curvas obtidas de um fenômeno estudado que mostram um decréscimo da resposta em baixas doses seguido por um aumento em altas doses ou *vice versa* (CONOLLY; LUTZ, 2004). Assim, podem ocorrer alguns fatores intercorrentes como a superposição de curvas dose-resposta monotônicas de reações de componentes biológicos tais como dos diversos sistemas de neurotransmissão envolvidos em períodos críticos do desenvolvimento (CONOLLY; LUTZ, 2004; COSTA et al., 2004).

Análise dos fatores intercorrentes

Conforme descrito acima e na literatura (ALDRIDGE et al., 2003), vários fatores podem afetar o resultado experimental. Durante a realização dos testes, é importante que seja feito o preenchimento de formulários padronizados de controle quanto aos procedimentos de manipulação e lote dos animais (número e data) que permitem assim a identificação e rastreabilidade dos animais. Devem ser também realizados os controles ambiental (monitoramento da temperatura das salas do biotério) e dos insumos utilizados nos testes (qualidade de ração, maravalha e material descartável).

Cada bateria de experimentos deverá ser controlada através de um relatório de

teste e, caso, for evidenciado qualquer problema durante a sua execução e análise; poderá ser realizada uma investigação para a identificação das prováveis causas através do rastreamento dos documentos relacionados ao teste buscando erros quanto à amostragem, erros de metodologia, falhas de execução, etc.

De forma geral, a fim de realizar um bom planejamento experimental para a obtenção dos dados experimentais, antes do início do estudo devem ser observados alguns pontos, tais como:

- a) o problema deve ser definido cuidadosamente baseado em evidências anteriores (associação e consistência causa-efeito);
- b) o objetivo do estudo deve ser claro;
- c) a coleta de dados deve ser rigorosamente planejada com ênfase na escolha criteriosa dos métodos experimentais e estatísticos visando a reprodutibilidade dos dados obtidos;
- d) a possibilidade de infra-estrutura adequada humana e física e
- e) a adequação da análise e da interpretação dos dados ao delineamento experimental.

Algumas outras variáveis como peso, idade, consumo de água e alimento, bioquímica clínica, etc., podem influenciar a resposta da variável inicialmente estabelecida para observação durante a experimentação com animais e na medida do possível, devem ser incorporadas ao planejamento experimental de forma a aumentar a precisão dos dados obtidos (DAS, 2002). Em relação aos testes com animais deve-se, desta forma, atentar especialmente para os seguintes parâmetros:

- 1) o número de animais a ser utilizado devido à variabilidade da população quanto a resposta observada e o significado biológico das alterações observadas,
- 2) as doses a serem testadas que geralmente são estabelecidas entre aquelas que não ocasionam efeitos e aquelas que produzem o efeito tóxico estudado (dose-resposta); levando em consideração a real probabilidade de exposição no ambiente,
- 3) a idade que afeta o planejamento quanto ao estágio do desenvolvimento animal.

Perspectivas dos estudos do desenvolvimento neurocomportamental

Frente ao exposto, pode-se concluir que a utilização de um protocolo experimental contendo índices relacionados à reprodução e desenvolvimento animal possa identificar prejuízos iniciais em decorrência da exposição a poluentes ambientais. A proteção quanto aos possíveis danos devido aos agroquímicos no

desenvolvimento dos organismos jovens, como os recém-nascidos e crianças, requer uma estratégia integrada capaz de monitorar os padrões de uso desses produtos e a integração de melhorias nas avaliações de seus efeitos potenciais (GOLDMAN; KODURU, 2000; SUK; MURRAY; AVAKIAN, 2003).

Nesse sentido, o aprimoramento do estudo de efeitos sutis através de novas baterias de testes experimentais promovendo o estudo de biomarcadores mais específicos deve ser complementar a abordagem tradicional da avaliação da exposição a agroquímicos em animais jovens. O compartilhamento dessas informações é importante para o aprimoramento da avaliação perinatal, para a viabilização da implementação de políticas que minimizem os possíveis riscos a que os organismos jovens estão expostos e a consequente implementação de políticas que visem a sustentabilidade ambiental.

A fim de reduzir a incerteza das estimativas realizadas quanto à exposição a esses produtos e com isso proteger adequadamente as crianças, podem-se sugerir as seguintes frentes de pesquisa: a) conhecer as diferenças cinéticas de um agroquímico em jovens e adultos a fim de subsidiar informações quanto à exposição desses produtos em crianças; b) realizar investigação apropriada para sustentar o uso seguro dos compostos em relação aos hábitos da população infantil, por exemplo, em relação à dieta (PENNYCOOK et al., 2004); c) aprimorar a avaliação de parâmetros de desenvolvimento pré e pós-natal; d) promover o estudo de biomarcadores mais específicos; e) promover avanços na ecogenética através do estudo da interação gene-ambiente-saúde (HUBAL et al., 2000) e f) promover a utilização de biomarcadores em estudos de exposição simultânea a dois ou mais agroquímicos e em estudos da influência de fatores bióticos e abióticos. A contínua criação e descoberta de novos procedimentos laboratoriais e delineamentos experimentais é consequentemente essencial para embasar os avanços científicos na área.

Referências Bibliográficas

ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V. E.; WEISS, B. **Application of behavioral pharmacology in toxicology**. New York: Raven Press, 1983. p. 57-66.

ALDRIDGE, J.; GIBBONS, J.; FLAHERTY, M.; KREIDER, M.; ROMANO, J.; LEVIN, E. Heterogeneity of toxicant response, sources of human variability. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 76, p. 3-20, 2003.

ALONSO, A.; GEYS, H.; MOLENBERGHS, G.; KENWARD, M.; VANGENEUGDEN, T. Validation on surrogate markers in multiple randomized clinical trials with repeated measurements, canonical correlation approach. **Biometrics**, Washington, DC, v. 60, p. 845-853, 2004.

ALTMAN, D. G. **Practical statistics for medical research**. London: Chapman & Hall, 1991. 611p. il.

AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 6, p. 1-13, 2003. Suplemento 1.

ARBUCKLE, T.; SEVER, L. Pesticide exposures and fetal death, a review of the epidemiologic literature. **Critical Reviews in Toxicology**, Florida, v. 28, p. 229-270, 1998.

BUELKE-SAM, J.; KIMMEL, C.; ADAMS, J.; NELSON, C.; VORHEES, C.; WRIGHT, D.; ST OMER, V.; KOROL, B.; BUTCHER, R.; GEYER, M.; HOLSON, J.; KUTSCHER, C.; WAYNER, M. Collaborative behavioral teratology study, results. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology**, Fayetteville, v. 7, p. 691-624, 1985.

CASTRO, V. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos e a avaliação de seus efeitos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 21, n. 3, p. 469-497, 2004.

CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 118, p. 93-102, 2000.

CASTRO, V.; GÓES, K.; CHIORATO, S. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. **International Journal of Environmental Health Research**, Abingdon, v. 14, p. 371-380, 2004.

CERRILLO, I.; GRANADA, A.; LÓPEZ-ESPINOSA, M.; OLMOS, B.; JIMÉNEZ, M.; AFRICA CAÑO, A.; OLEA, N.; OLEA-SERRANO, M. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. **Environmental Research**, San Diego, v. 98, p. 233-239, 2005.

CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**, Elmsford, v. 79, p. 359-371, 2003.

CHAPILLON, P.; LALONDE, R.; JONES, N.; CASTON, J. Early development of synchronized walking on the rotorod in rats effects of training and handling. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 93, p. 77-81, 1998.

CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M. Developmental aspects of timing behavior in children. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 26, p. 461-476, 2004

CHEN, J.; KUMAR, M.; CHAN, W.; BERKOWITZ, G.; WETMUR, J. G. Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 111, p. 1403-1409, 2003.

CONOLLY, R.; LUTZ, W. Nonmonotonic dose-response relationships, mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 77, p. 151-157, 2004.

COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 44, p. 87-110, 2004.

DAS, R. Role of ancillary variables in the design, analysis, and interpretation of animal experiments. **ILAR Journal**, Washington, DC, v. 43, p. 214-222, 2002.

DESPRÉS, C.; RICHER, F.; ROBERGE, M. C.; LAMOUREUX, D.; BEUTER, A. Standardization of quantitative tests for preclinical detection of neuromotor dysfunctions in pediatric neurotoxicology. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 26, p. 385-395, 2005.

DINHAM, B.; MALIK, L. S. Pesticides and human rights. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, Philadelphia, v. 9, p. 40-52, 2003.

DOR, F.; DAB, W.; EMPEREUR-BISSONNET, P.; ZMIROU, D. Validity of biomarkers in environmental health studies, the case of PAHs and benzene. **Critical Reviews in Toxicology**, Florida, v. 29, p. 129-168, 1999.

FARAHAT, T.; ABDELRASOUL, G.; AMR, M.; SHEBL, M.; FARAHAT, F.; ANGER, W. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupational and Environmental Medicine**, London, v. 60, p. 279-286, 2003.

FESTING, M.; ALTMAN, D. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. **ILAR Journal**, Washington DC, v. 43, p. 244-258, 2002.

GENTRY, P.; COVINGTON, T.; CLEWELL III, H. Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 38, p. 1-16, 2003.

GOLDMAN, L.; KODURU, S. Chemicals in the environment and developmental toxicity to children, a public health and policy perspective. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 108, p. 443-448, 2000. Supplement 3.

GOLDSTEIN, B. Advances in risk assessment and communication. **Annual Review of Public Health**, Palo Alto, v. 26, p. 141-163, 2005.

HASEMAN, J.; BAILER, A.; KODELL, R.; MORRIS, R.; PORTIER, K. Statistical issues in the analysis of low-dose endocrine disruptor data. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 61, p. 201-210, 2001.

HUBAL, E.; SHELDON, L.; BURKE, J.; MC CURDY, T.; BERRY, M.; RIGAS, M.; ZARTARIAN, V.; FREEMAN, N. Children's exposure assessment, a review of factors influencing children's exposure, and the data available to characterize and assess that exposure. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 108, p. 475-486, 2000.

HOLSON, R.; PEARCE, B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 14, p. 221-228, 1992.

LI, A. Regulatory developmental neurotoxicology testing, data evaluation for risk assessment purposes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 19, p. 727-733, 2005.

LIMA, B. **Juvenile animals in safety testing, the european regulatory perspective.** *Reproductive Toxicology*, Oxford, v. 17, p. 476-477, 2003.

LUFT, J.; BODE, G. Integration of safety pharmacology endpoints into toxicology studies. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, Paris, v. 16, p. 91-103, 2002.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MOSER, V.; PHILLIPS, P.; LEVINE, A.; McDANIEL, K.; SILLS, R.; JORTNER, B.; BUTT, M. Neurotoxicity produced by dibromoacetic acid in drinking water of rats. *Toxicological Sciences*, Orlando, v. 79, p. 112-122, 2004.

PEEPLES, E.; SCHOPFER, L.; DUYSEN, E.; SPAULDING, R.; VOELKER, T.; THOMPSON, C.; LOCKRIDGE, O. Albumin, a new biomarker of organophosphorus toxicant exposure, identified by mass spectrometry. *Toxicological Sciences*, Orlando, v. 83, p. 303-312, 2005.

PENNYCOOK, F.; DIAMAND, E.; WATERSON, A.; HOWARD, C. V. Modeling the dietary pesticide exposures of young children. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, Philadelphia, v. 10, p. 304-309, 2004.

PEREIRA, J. **Análise de dados qualitativos:** estratégias metodológicas para as ciências da saúde, humanas e sociais. São Paulo: Edusp, 1999. 156 p.

POHL, H. R.; VAN ENGELEN, J. G. M.; WILSON, J.; SIPS, A. J. A. M. Risk assessment of chemicals and pharmaceuticals in the pediatric population: a workshop report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Duluth, v. 42, p. 83-95, 2005.

REUTER, U.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; HOLZUM, B.; WELSCH, F. Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Duluth, v. 38, p. 17-26, 2003.

RIBAS-FITÓ, N.; GRIMALT, J.; MARCO, E.; SALA, M.; MAZÓN, C.; SUNYER, J. Breastfeeding and concentrations of HCB and p,p'-DDE at the age of 1 year

Environmental Research, San Diego, v. 98, p. 8–13, 2005.

ROHLMAN, D.; ARCURY, T.; QUANDT, S.; LASAREV, M.; ROTHLEIN, J.; TRAVERS, R.; TAMULINAS, A.; SCHERER, J.; EARLY, J.; MARÍN, A.; PHILLIPS, J.; MCCAULEY, L. Neurobehavioral performance in preschool children from agricultural and non-agricultural communities in Oregon and North Carolina. **Neurotoxicology**, Little Rock, v. 26, p. 589-598, 2005.

SARTER, M. Animal cognition, defining the issues. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 28, p. 645-650, 2004.

SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity I. Biological Basis. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 35, p. 429-447, 2002.

SCHULTE, P.; TALASKA, G. Validity criteria for use of biological markers of exposure to chemical agents in environmental epidemiology. **Toxicology**, Limerick, v. 101, p. 73-88, 1995.

SELEVAN, S.; KIMMEL, C.; MENDOLA P. Identifying critical windows of exposure for children's health. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 108, p. 451-455, 2000. Supplement 3.

SLIKKER JUNIOR, W.; ACUFF, K.; BOYES, W.; CHELONIS, J.; CROFTON, K.; DEARLOVE, G.; LI, A.; MOSER, V.; NEWLAND, C.; ROSSI, J.; SCHANTZ, S.; SETTE, W.; SHEETS, L.; STANTON, M.; TYL, S.; SOBOTKA, T. Behavioral test methods workshop. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 27, p. 417-427, 2005.

SMULDERS, C.; BUETERS, T.; VAILATI, S.; VAN KLEEF, R.; VIJVERBERG, H. Block of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by organophosphate insecticides. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 82, p. 545-554, 2004.

SUK, W.; MURRAY, K.; AVAKIAN, M. Environmental hazards to children's health in the modern world. **Mutation Research: Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, p. 235-242, 2003.

ULBRICH, B. Litter variability in behavioural testing, is testing of one animal per litter enough? **Frontiers in Fetal Health**, Local de publicação, v. 3, p. 273-274, 2001.

WHYATT, R.; CAMANN, D.; KINNEY, P.; REYES, A.; RAMIREZ, J.; DIETRICH, J.; DIAZ, D.; HOLMES, D.; PERERA, F. P. Residential pesticide use during pregnancy among a cohort of urban minority women. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, p. 507-514, 2002.

Embrapa

Meio Ambiente

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

