

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS

JOSIANE BEATRIZ WRUCK

ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO E PARÂMETROS OXIDATIVOS
NA DEPRESSÃO EM UMA POPULAÇÃO RURAL

Pelotas

2015

JOSIANE BEATRIZ WRUCK

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO E PARÂMETROS OXIDATIVOS
NA DEPRESSÃO EM UMA POPULAÇÃO RURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Comportamento.

Orientador: Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Pelotas
2015

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA COLINÉRGICO E
PARÂMETROS OXIDATIVOS NA DEPRESSÃO EM UMA
POPULAÇÃO RURAL**

Conceito final: _____

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rachel Krolow Santos Silva Bast - UCPel

Prof^a. Dr^a. Giana de Paula Cognato- UFPel

Orientador – Prof^a. Dr^a. Gabriele Cordenonzi Ghisleni

Agradecimento

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Vilmar e Neda por todo amor, carinho, incentivo e paciência, aos meus irmãos, em especial ao José Inácio que sempre me apoiou para seguir em frente e acreditar em mim, aos meus sobrinhos pelo carinho, e ao meu marido Christopher que muitas vezes tirou minha paciência quando precisava estudar, mas que entendeu todas as vezes que precisei me ausentar devido aos estudos.

A farmácia PanVel filial 098 pelo incentivo em fazer a seleção e iniciar o Mestrado, a Extractus Manipulação e Cosméticos pelo incentivo no desenvolvimento e conclusão deste, em especial as meninas do Laboratório de Controle de Qualidade Márcia e Jennifer por acreditar em mim, pelo apoio e pela cobrança do andamento da escrita da dissertação.

A minha orientadora Dr^a Gabriele Ghisleni, por me aceitar em seu grupo de pesquisa, que esteve sempre com muita dedicação e paciência para me orientar tanto na parte acadêmica, como profissional e até pessoal.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurociências, em especial a Fernanda por várias noites estar comigo realizando a parte experimental e cálculos, a Clarissa que também me auxiliou nesta etapa, a Marta Gazal na padronização das técnicas, cálculos e pelo incentivo e motivação. Ao Marco e a Sílvia pelo auxílio nos trabalhos em aula, confiança e apoio.

A todos os alunos da turma de Mestrado 2013 e professores PPG em Saúde e Comportamento pelo carinho e ensinamentos e em especial as secretárias Ariadne e Flávia.

Muito obrigado!

Peçam e vocês receberam; procurem e vocês acharão;

batam e a porta será aberta para vocês.

Porque todos aqueles que pedem recebem;

aqueles que procuram acham;

e a porta será aberta para quem bate.”

Mateus 7. 7-8

RESUMO

Introdução: Os pesticidas são altamente neurotóxicos e podem produzir uma série de problemas de saúde. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é avaliar as correlações entre os sintomas da síndrome colinérgica e marcadores biológicos na depressão maior em uma população rural. **Métodos:** O estudo envolveu 100 trabalhadores envolvidos na agricultura familiar de tabaco do Sul do Brasil. As atividades da AChE e BChE e parâmetros de estresse oxidativo foram avaliados no sangue, e correlação entre a síndrome colinérgica e parâmetros biológicos foram investigados de acordo com o diagnóstico de depressão maior. **Resultados:** Da amostra total 18% apresentaram transtornos psiquiátricos, o tempo de exposição aos agrotóxicos foi de 23,4±25,5 anos. O tempo de exposição a pesticidas foi maior em indivíduos com depressão atual do que em não deprimidos. Os sintomas da síndrome colinérgica para efeitos muscarínicos, efeitos nicotínicos, e os efeitos centrais foram maiores nos indivíduos com depressão maior do que nos indivíduos não deprimidos, respectivamente. A análise de correlação mostra que os sintomas da síndrome colinérgica que afetam o sistema nervoso central foi positivamente correlacionada com a atividade BChE e com os níveis de óxido nítrico, apenas em indivíduos depressivos. **Conclusão:** Em conclusão, verificamos que o uso de agrotóxicos não aumentou o risco de depressão em nossa amostra, mas os indivíduos depressivos apresentaram aumento nos sintomas do sistema colinérgico provavelmente devido a um aumento do estresse oxidativo e alterações no sistema colinérgico decorrentes do tempo de exposição aos agrotóxicos.

Palavras-chave: depressão maior, pesticidas, síndrome colinérgica, colinesterases, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Pesticides are highly neurotoxic and may produce a series of health problems. The aim of this study was to look at correlations between the cholinergic syndrome symptoms and biological markers with depressive episode in a rural population. The study involved 100 workers involved in family agriculture of tobacco from southern Brazil. AChE and BChE activities and serum oxidative stress parameters were evaluated and no association was found between cholinergic syndrome, major depression and biological parameters. Of total sample 18% have psychiatric disorders, time of exposure was 23.4 ± 25.5 years. The time of pesticides exposure was higher in depressive subjects than non-depressed one. Symptoms of cholinergic syndrome for muscarinic effects, nicotinic effects, and central effects were higher in depressive than non-depressed subjects, respectively. Correlation analysis shows that symptoms of cholinergic syndrome affecting central nervous system was positively correlated with BChE activity, and nitric oxide levels only in depressive subjects. In conclusion, although the use of pesticides did not increase the risk for major depressive episode in our sample, depressive subjects had increased disturbances in cholinergic system probably due an increase in the oxidative stress and alterations in cholinergic system arising from the chronic exposure to pesticides.

Keywords: Major depression, pesticides, cholinergic syndrome, cholinesterase activity, oxidative stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Busca bibliográfica realizada nas bases de dados	21
Tabela 2 – Orçamento.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AChE	Enzima Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BChE	Enzima Butirilcolinesterase
BDI	Entrevista diagnóstica Inventário de Depressão de Beck
CAPS	Centro de Atenção Psicossocial
CEREST	Centro de Referência em Saúde do Trabalhador
DM	Depressão Maior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTNB	5,5'-dithio-bis(2-ácido nitrobenzóico)
EPI	Equipamento de Proteção Individual
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAO	Monoaminoxidase
Mg	Miligrama
MINI	Mini Neuropsychiatric International Interview
μmol	Micromol
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
O_2	Oxigênio Molecular
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion Radical Superóxido
$\text{OH}\cdot$	Radical Hidroxil
ON	Óxido Nítrico
ON-	Radical Óxido Nítrico
ONOO-	Peroxinitrito

RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SCID	Entrevista Diagnóstica Semi-Estruturada para o DSM-IV
SNC	Sistema Nervoso Central
SH	Grupamentos Sulfidrílicos
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNB	2-nitro-5-tiobenzoato
UCPel	Universidade Católica de Pelotas

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	14
PROJETO.....	15
1 IDENTIFICAÇÃO.....	16
1.1 Título	16
1.2 Titulação em andamento que designa o autor do trabalho	16
1.3 Orientador	16
1.4 Instituição	16
1.5 Curso	16
1.6 Linha de pesquisa	16
1.7 Data	16
2 INTRODUÇÃO	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 HIPÓTESES	20
5 REVISÃO DE LITERATURA	21
5.1 Estratégias de Busca.....	21
5.2 Fundamentação Teórica.....	21

5.2.1 Agrotóxicos.....	21
5.2.2 Sistema Colinérgico.....	23
5.2.3 Estresse Oxidativo.....	27
6.METODOLOGIA.....	29
6.1 Delineamento	29
6.2 Participantes	29
6.2.1. Critérios de Inclusão.....	29
6.2.2. Critérios de Exclusão.....	30
6.3 Procedimentos e Instrumentos.....	30
6.3.1. Desfecho Primário.....	30
6.3.2. Desfecho Secundário.....	30
6.3.3. Diagnóstico.....	30
6.3.3.1. Entrevista diagnóstico MINI.....	30
6.3.3.2. Entrevista BDI.....	30
6.3.4. Coleta de Dados.....	30
6.3.5. Coleta de Material Biológico.....	31
6.3.6. Análise Bioquímica.....	31
6.3.6.1. Determinação Proteica.....	31
6.3.6.2. Formação de Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	32
6.3.6.3. Teste do Óxido Nítrico.....	32
6.3.6.4. Medida do Conteúdo Total de Tióis (SH).....	32
6.3.6.5. Atividade Enzimática de AChE e BChE.....	32
6.4 Análise dos dados.....	33
6.5 Aspectos éticos	33

6.5.1.Riscos.....	34
6.5.2.Benefícios.....	34
6.6 Cronograma	35
6.7 Orçamento	35
7 REFERÊNCIAS	36
8 ARTIGO	43
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO.....	58
ANEXOS	60
Anexo A: Artigos selecionados para o projeto.....	60
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido	63
Anexo C: Carta de aprovação do comitê de ética.....	66
Anexo D: Questionário aplicado aos sujeitos (Sócio demográfico, Síndrome colinérgica, Escala de Estresse, BDI e MINI.....	68

APRESENTAÇÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura do Brasil é intenso e segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nos últimos dez anos o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190%, enquanto o mercado mundial cresceu 93%. Alterações na atividade colinérgica ocorrem em decorrência do uso de agrotóxicos e têm sido associadas na fisiopatologia de diversas doenças clínicas, como na doença de Alzheimer, Parkinson e Depressão Maior. A hipótese do envolvimento do sistema colinérgico nos transtornos psiquiátricos consiste das observações de que a intoxicação por organofosforados, a qual leva a uma profunda inibição da AChE, elevando os níveis de ACh, desencadeia um quadro de depressão e ansiedade. Além disso, a intoxicação por agrotóxicos gera ainda um aumento do estresse oxidativo gerado pelo desbalanço entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes. Danos funcionais consideráveis em proteínas, enzimas e DNA gerados pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e redução das defesas antioxidantes foram demonstrados pelo seu envolvimento nos transtornos psiquiátricos e indivíduos expostos a agrotóxicos, devido principalmente à vulnerabilidade do SNC.

O presente trabalho avaliou alterações periféricas no sistema colinérgico e parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos cronicamente expostos aos agrotóxicos, e investigou o envolvimento destes parâmetros biológicos na depressão, síndrome colinérgica e efeitos centrais. Desta forma esta dissertação apresenta uma breve introdução sobre o assunto, fundamentação teórica e revisão bibliográfica, objetivos, hipóteses e metodologia utilizada para o desenvolvimento deste trabalho e ao final da dissertação se encontra o artigo referente a este trabalho e as considerações finais desta dissertação.

PROJETO

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Envolvimento do sistema colinérgico e parâmetros oxidativos na depressão em uma população rural.

1.2 Designação da titulação pretendida pelo autor: Título de Mestre

1.3 Orientador: Gabriele Cordenonzi Ghisleni

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Neuroquímica e Toxicologia

1.7 Data: 26 de Março de 2015

2. INTRODUÇÃO

O uso e comercialização de agrotóxicos vêm aumentando exaustivamente com o passar dos anos¹. Os organofosforados, cuja exposição ocupacional ocorre geralmente pelas vias dérmica e pulmonar, são responsáveis por até 80% das intoxicações relacionadas à intoxicação por agrotóxicos². Nos organismos vivos, uma das ações toxicológicas destes pesticidas ocorre pela inibição das enzimas colinesterásicas^{3,4,5,6}. A redução da atividade destas enzimas acarreta um acúmulo de acetilcolina (ACh) extracelular e aumento da ativação dos seus receptores nas sinapses colinérgicas^{2,4,6}. A hiperativação do sistema colinérgico foi descrita como uma das hipóteses para a neurobiologia da depressão⁷. A consistência destes dados é demonstrada pela maior prevalência dos transtornos de ansiedade e de humor em trabalhadores rurais expostos à organofosforados⁸.

O estresse oxidativo, o qual decorre do desequilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e antioxidantes, resultando no dano aos lipídios de membrana, ácidos nucleicos e proteínas^{9,10,11}, foi associado ao uso agudo e crônico de agrotóxicos^{12,13,14}. Além disso, estudos clínicos recentes têm demonstrado uma associação entre o aumento de estresse oxidativo em pacientes com transtornos de humor, em especial a depressão maior (DM)¹⁵.

Na região sul do Rio Grande do Sul, o município de Canguçu é caracterizado pelo grande número de minifúndio e pela agricultura familiar. A cidade possui, cerca de 60 mil de habitantes sendo sua maior parte moradora da zona rural¹⁶. Assim, estudos epidemiológicos nesta região são necessários para avaliar o impacto do uso de pesticidas na saúde e qualidade de vida do trabalhador rural. É sabido que o uso de agrotóxicos pode causar sérios danos à saúde dos trabalhadores rurais, podendo ser responsável por elevadas taxas de doenças clínicas e casos de depressão. Portanto, a busca por marcadores bioquímicos que marcam o processo de intoxicação por agrotóxicos bem como da sua correlação com os transtornos

psiquiátricos é de grande relevância para a utilização de políticas públicas de prevenção e melhores tratamentos para esta população.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar em uma amostra populacional da zona rural de Canguçu/ RS cronicamente exposta aos agrotóxicos, alterações biológicas através da atividade das colinesterases e parâmetros oxidativos, bem como sintomas da síndrome colinérgica e centrais em relação a DM.

3.2 Específicos

- Determinamos a prevalência de depressão na população da zona rural exposta aos agrotóxicos.

- Avaliamos a atividade das enzimas AChE e BChE no sangue de indivíduos cronicamente expostos aos agrotóxicos.

- Avaliamos os parâmetros oxidativos, como TBARS, ON E SH no sangue de indivíduos cronicamente expostos aos agrotóxicos.

- Investigamos possíveis alterações biológicas avaliadas pela atividade das colinesterases e parâmetros oxidativos com a depressão maior e sintomas da síndrome colinérgica e efeitos centrais em indivíduos cronicamente expostos.

- Investigamos a correlação entre a atividade das enzimas colinesterases e os parâmetros oxidativos com a Síndrome Colinérgica e efeitos centrais em indivíduos com DM cronicamente expostos aos agrotóxicos.

4. HIPÓTESES

- A prevalência de depressão estará aumentada na população rural exposta a agrotóxicos.
- Ocorrerá uma diminuição na atividade enzimática da AChE e BChE nos indivíduos com diagnóstico de DM em relação ao grupo controle.
- Níveis de ON, e a medida da peroxidação lipídica estarão elevados, e o conteúdo total de grupamentos SH estará diminuído nos indivíduos com diagnóstico de DM em relação ao grupo controle.
- Haverá alguma correlação nos deprimidos em relação aos valores da atividade das enzimas AChE e BChE e parâmetros oxidativos em relação a Síndrome Colinérgica e/ou efeitos centrais.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Estratégias de busca

As bases de dados consultadas foram PUBMED e SCIELO. A tabela abaixo apresenta os descritores utilizados, número de resumos encontrados e selecionados, bem como o número de artigos incluídos até o momento.

Os critérios de inclusão foram: idioma inglês, português e espanhol, modelo clínico e pré-clínico, relacionado à exposição a agrotóxicos.

Descritores	Base de Dados		Artigos selecionados
	PUBMED	SCIELO	
Organophosphate	2969	151	3
Cholinesterase activity AND organophosphate AND human	787	1	8
Major depression AND organophosphate	34	-	2
Organophosphate AND major depression AND cholinesterase activity	6	-	1
Major depression AND Cholinesterase system	124	-	5
Stress Oxidative AND Cholinergic syndrome/system	20	-	2
Stress Oxidative AND major depression	149	-	2
Artigos encontrados nas referências de artigos			13
Total de artigos			36

No ANEXO A, apresenta-se um quadro resumido com os principais artigos utilizados na elaboração deste projeto.

5.2 Fundamentação teórica

5.2.1 Agrotóxicos

O uso e comercialização de agrotóxicos no Brasil são intensos, sendo amplamente utilizados nos sistemas de monocultivo em grandes extensões, como soja, café, arroz e algodão e em culturas com menor área plantada, como o fumo, uva, morango e outras

espécies hortícolas e frutícolas¹⁷. Estudos têm apontado que as intoxicações por agrotóxicos são um grave problema de saúde pública, especialmente entre trabalhadores rurais^{5,7,8}. Jacobson et al. (2009) descreveram que o uso elevado e indiscriminado de agrotóxicos no país tem contribuído para a contaminação ambiental. Além disso, o aumento das intoxicações ocupacionais ocorre devido à forma de armazenamento destes, que geralmente ocorre próximo a moradia, pelo uso e lavagem das roupas contaminadas e proximidade das residências as áreas de cultivo. Esses problemas, somados à exposição do trabalhador rural, constituem-se nos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro¹⁸.

Agrotóxicos organofosforados são compostos derivados do ácido fosfórico, altamente tóxicos para os animais vertebrados em relação aos demais tipos existentes no mercado, e também os mais utilizados na agricultura¹⁹. A ação dos agrotóxicos é descrita pela inibição das enzimas colinesterases resultando na síndrome tóxica ou síndrome colinérgica, causada pelo excesso de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica ou na junção neuromuscular^{2,20}. Os principais sintomas da exposição aos organofosforados são dores de cabeça, confusão mental, alterações somáticas e autônomas, vômitos e diarreia²⁰.

A intoxicação crônica surge após meses ou anos, independente da exposição ser pequena ou moderada, tanto por um ou mais agrotóxicos, acarretando danos frequentemente irreversíveis a estes indivíduos e podendo ocasionar neoplasias, como mieloma múltiplo e leucemias, anemia aplástica, transtornos mentais, alterações cognitivas, distúrbios do movimento, polineuropatias, encefalopatia tóxica; distúrbios oculares, auditivos, circulatórios, respiratórios, digestivos e dermatológicos^{21,22,23}.

A avaliação da inibição das colinesterases tem sido frequentemente utilizada nas últimas décadas como um biomarcador da exposição a agrotóxicos organofosforados^{4,24,25} e suas ações sobre o sistema nervoso²⁵. Um estudo realizado no Rio Grande do Sul indicou que a ocorrência de intoxicações agudas provocadas pela exposição aos agrotóxicos está

fortemente associada à prevalência de transtornos psiquiátricos, sendo a depressão e a ansiedade os diagnósticos mais frequentes^{8,26}. Segundo Salvi et al. (2003), indivíduos com exposição crônica a pesticidas apresentaram um aumento significativo na frequência de transtornos psiquiátricos²⁷. No Brasil a prevalência de DM é em torno de 5 a 12% em homens e 10 a 25% em mulheres²⁸, sendo que no Rio Grande do Sul a prevalência na população geral se encontra em torno de 10 a 15%^{29,30}. Entretanto, em uma população rural do Rio Grande do Sul, em que a taxa de exposição da população rural aos agrotóxicos foi de 86,3%, a prevalência de depressão encontrada foi de 45,9% para as mulheres e 27,2% para homens³¹.

O município de Canguçu, localizado na região sul do Rio Grande do Sul, possui 53.259 habitantes, sendo que 36,98% são moradores da zona urbana e 63,02% moradores da zona rural. É caracterizada pelo grande número de minifúndios, pela agricultura familiar e o uso indiscriminado de agrotóxicos na plantação de fumo, principal tipo de cultivo¹⁶. Portanto, o uso de agrotóxicos nesta população pode acarretar sérios danos à saúde destes trabalhadores rurais e serem associados a maior taxa de quadros depressivos e problemas de saúde associados^{8,18}.

5.2.2 Sistema Colinérgico

A Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor presente nas sinapses pós-ganglionares dos terminais nervosos parassimpáticos e no sistema nervoso central (SNC)²⁰. A ACh age ao nível das junções neuromusculares, onde os nervos motores fazem contato com as células do músculo esquelético, provocando a contração muscular e ainda pode estar envolvida nos processos de aprendizado e memória^{20,32}.

Armazenada em altas concentrações nas vesículas sinápticas do terminal pré-sináptico, a ACh é formada a partir da colina e acetilcoenzima A, em uma reação catalisada pela enzima citosólica colina acetiltransferase^{6,33}. Após liberação do neurotransmissor na fenda sináptica, a

sinalização colinérgica ocorre pela ativação de receptores específicos nicotínicos e muscarínicos^{20,33}. Os receptores nicotínicos, inotrópicos, são encontrados predominantemente nos gânglios e nas junções neuromusculares, estes presentes nos músculos são heteropentâmeros constituídos por subunidades $\alpha, \beta, \gamma, \epsilon$. No cérebro são formados por várias subunidades $\alpha 2-10$ e $\beta 2-4$, que estão amplamente distribuídos no SNC, os receptores $\alpha 3$ e $\beta 2$ estão presentes no córtex, tálamo, hipocampo e cerebelo. Estes receptores localizados no cérebro encontram-se nas regiões pré-, pós-peri e extrassinápticas, modulando a liberação de neurotransmissores, atividade sináptica neuronal e também possuem envolvimento nos processos de aprendizado e memória, desenvolvimento neuronal e participação no sistema de recompensa, isto deve-se às diferentes estruturas destes receptores e sua ampla distribuição no sistema nervoso^{33,34,35}. Os receptores muscarínicos, metabotrópicos, estão disseminados em estruturas do encéfalo, no músculo liso, e glândulas^{20,33}, amplamente distribuídos pelos sistemas biológicos, onde participam de várias funções vitais, assim como redução da frequência e força da contração cardíaca, relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e constrição das vias respiratórias. No SNC estão envolvidos no controle da função extrapiramidal, vestibular, funções cognitivas como memória, aprendizado e atenção, respostas emocionais, modulação do estresse, sono e vigília. Apresentam cinco subtipos: M1, M2, M3, M4 e M5, estes presentes no SNC, especialmente no hipocampo e nos neurônios estriatais^{33,35}.

O término da sinalização colinérgica ocorre através da degradação do neurotransmissor ACh em colina e ácido acético, em uma reação catalisada por uma família de enzimas denominadas colinesterases. A acetilcolinesterase (AChE), está localizada principalmente na membrana das células do sangue, junção neuromuscular, e nas sinapses neuronais. A butirilcolinesterase (BChE), é produzida pelo fígado e encontrada principalmente no plasma e nas células gliais, apresentando uma atividade menos

específica^{6,20}. A inibição de ambas as enzimas, AChE e BChE, são consideradas marcadores de efeitos biológicos iniciais relatados com a exposição a organofosforados³⁶. Em geral, a inibição da AChE eritrocitária é considerada um melhor marcador de toxicidade, entretanto, a inibição da BChE plasmática é um marcador mais sensível da exposição, porque sua isoforma é mais efetivamente inibida pela maioria dos organofosforados^{36,37}.

A síndrome colinérgica aguda ocorre imediatamente após a exposição ao agrotóxico, surgindo em até 96 horas após a intoxicação, e este tempo e intensidade é variável em virtude da via de intoxicação, sendo a via inalatória a mais rápida, e a via dérmica apresenta aparecimento dos sintomas mais tardio. Os sinais e sintomas resultam da estimulação dos receptores específicos que representam os efeitos muscarínicos e/ou nicotínicos, assim como miose, lacrimejamento, salivação excessiva, alteração da acuidade visual, além de manifestações cardíacas e neurológicas como fraqueza muscular, fasciculações, tremores, paralisia e convulsões. Na síndrome intermediária ocorre principalmente a falência respiratória, mas também pode ocorrer a paralisia dos músculos comandados pelos nervos cranianos e do pescoço, da musculatura das pernas, e diarreia intensa. Na neuropatia tardia os sintomas geralmente surgem como uma sensação de formigamento ou queimação nos dedos e causando fraqueza nos membros, podendo ocorrer por degeneração dos axônios em alguns nervos periféricos ou envolvimento degenerativo do SNC^{21,22,23}. Alterações na atividade colinérgica têm sido demonstradas em diversas doenças clínicas, principalmente em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson, bem como na DM^{7,17,33,38}.

Embora a etiologia precisa da DM ainda não seja conhecida, a hipótese da hiperatividade do sistema colinérgico na neuropatologia da depressão foi apresentada há mais de três décadas. Esta hipótese é consistente com observações iniciais de que a intoxicação por organofosforados leva a uma profunda inibição da AChE, elevando os níveis de ACh que por sua vez desencadeia um quadro de depressão e ansiedade⁷. De fato, estudos recentes tem

sugerido que os níveis de ACh estão elevados na fenda sináptica em pacientes em episódio atual de depressão e permanecendo aumentados em pacientes com histórico de depressão³⁹.

Estudos em humanos utilizando um inibidor da AChE demonstrou um aumento dos sintomas depressivos em indivíduos com ou sem histórico de depressão⁴⁰. Além disso, um estudo utilizando modelo animal de estresse crônico demonstrou uma hipersensibilidade do sistema colinérgico associada ao comportamento depressivo induzido pelo estresse⁴¹. Recentemente, Mineaur et al. (2013) demonstrou que a inibição da AChE em modelo animal de estresse social está envolvida no comportamento depressivo e ansiogênico dos animais. As alterações comportamentais decorrentes do estresse social, foram revertidas pela administração de inibidores da recaptação de serotonina, diminuindo significativamente a atividade da AChE no hipocampo⁴².

A ampla distribuição de nAChR no SNC sugere que estes receptores desempenham um papel importante na fisiologia do cérebro. Tendo em vista o papel modulador de nAChRs e suas interações com diferentes neurotransmissores, tais como dopamina ou serotonina, assim apresentando associação com a Depressão^{34,35}. Dados consistentes obtidos com pacientes com depressão, têm associado disfunção no sistema neuroendócrino possivelmente resultante de prolongada resposta ao stress. A evidência disponível sugere que a acetilcolina (ACh) desempenha um significativo papel na mediação neuroendócrina, emocional, e a resposta ao estresse^{43,44,45}. A teoria colinérgica-adrenérgica da depressão gera hipótese de um equilíbrio entre sistemas colinérgicos e adrenérgicos, sugerindo que a hiperatividade do sistema colinérgico sobre o sistema adrenérgico pode levar a sintomas depressivos. Com esta hipótese, se evidencia a presença de respostas comportamentais, neuroquímicas e sono exagerado^{43,44}. A administração de agentes colinérgicos em indivíduos normais, como o agonista indireto da Ach, fisostigmina, provoca um aumento da frequência cardíaca e pressão

arterial e produz sintomas de disforia, depressão, ansiedade, irritabilidade, agressividade e hostilidade^{44,45}.

Em relação ao envolvimento do uso de agrotóxicos e a atividade enzimática das colinesterases, um estudo realizado na Índia em 2012, demonstrou uma redução na atividade das enzimas AChE e BChE em trabalhadores rurais em relação a um grupo controle⁴⁶. Do mesmo modo, Singh et al., (2012) encontrou uma redução da atividade da AChE em indivíduos expostos aos agrotóxicos frente a uma população controle, mostrando ainda uma correlação negativa entre a atividade, idade e o tempo de exposição aos agrotóxicos⁵. Além disso, um estudo longitudinal demonstrou uma diminuição prolongada na atividade da BChE em uma população agrícola exposta a agrotóxicos⁴⁷.

Até o momento, um único estudo avaliou a possível relação da intoxicação com organofosforados nos sintomas depressivos em uma análise observacional com trabalhadores expostos a agrotóxicos no sul do Brasil. O estudo não apresentou associação entre a atividade do sistema colinérgico com os sintomas depressivos e extrapiramidais²⁷. Entretanto, ressaltamos que os achados mostram uma ação dos pesticidas na indução de sintomas neurológicos e psiquiátricos, fazendo se necessários mais estudos para a determinação desta associação e solicitação de medidas educativas e de segurança.

5.2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre nas células e tecidos a partir de uma produção aumentada de radicais livres e/ou uma depleção dos sistemas de defesa antioxidante. Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contêm um número ímpar de elétrons, ou seja, possuem um elétron não pareado em sua órbita externa, como por exemplo, as espécies reativas de oxigênio, representadas pelo radical superóxido (O_2) e radical hidroxil (OH), e as espécies reativas de nitrogênio, representadas pelo óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2). O

óxido nítrico reage com o radical superóxido para formar o peroxinitrito (ONOO), ainda mais reativo^{9,10,11,48}.

Os radicais livres são instáveis e muito reativos, de forma que reagem com biomoléculas como o DNA, RNA, proteínas e lipídios. A presença de grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas biológicas, torna-as suscetíveis ao processo de peroxidação lipídica, levando a uma degradação progressiva de sua integridade e a formação de vários produtos, como o malondialdeído (MDA)^{9,10,49}. A maioria dos tecidos produz normalmente radicais livres, assim como o processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, as enzimas monoamino oxidase (MAO), lipooxigenases, xantina oxidase e o citocromo P450^{9,10}. Portanto, a formação de radicais livres é um processo natural, mas a ocorrência destes é controlada pelo sistema de defesa antioxidante, podendo este ser enzimáticos ou não-enzimáticos^{10,11}.

Diferentes tipos de pesticidas atuam como indutores de stress oxidativo devido à geração de radicais livres e alteração dos mecanismos de defesa antioxidantes⁵⁰ levando a neurodegeneração¹³. Em intoxicações causadas pelos agrotóxicos, os radicais livres são principalmente produzidos pelo citocromo P450 que realiza a metabolização dos pesticidas⁵¹. Dois importantes estudos realizados em trabalhadores rurais expostos a pesticidas quando comparados com um grupo controle apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros oxidativos, como peroxidação lipídica, ON e enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx)^{52,53}. No entanto, a indução de stress oxidativo vem sendo reportada como mecanismo de toxicidade tanto para exposição aguda como crônica a agrotóxicos¹⁴. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram alterações nos parâmetros oxidativos e sugerem que a determinação dos parâmetros oxidativos pode ser utilizada para monitoramento da exposição aos agrotóxicos⁵⁴.

Alterações nos parâmetros de estresse oxidativo contribuem para o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas através da modificação de diversos substratos biomoleculares nas células^{55,56}. Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que a DM é acompanhada por um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, aumento do dano oxidativo através da peroxidação lipídica e alterações nas defesas antioxidantes^{57,58}. O aumento dos níveis séricos de ON em pacientes com DM em relação aos indivíduos controles também foi demonstrado recentemente⁵⁹. A capacidade antioxidante dos grupamentos SH foi observada em estudo pré-clínico¹⁵. Estudos recentes apresentaram aumento dos níveis de peroxidação lipídica, representada por TBARS em pacientes com depressão^{53,54,60}.

6. METODOLOGIA

6.1 Delineamento

O estudo seguiu um delineamento transversal realizado com a população da zona rural da cidade de Canguçu/RS, Brasil, na faixa etária de 18 a 60 anos de idade.

6.2 Participantes

A seleção da amostra foi realizada por conglomerados, considerando a divisão censitária do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), e foram selecionados aleatoriamente setores censitários do primeiro e segundo Distrito da zona rural da cidade de Canguçu.

6.2.1 Critérios de inclusão

- Ter entre 18 e 60 anos de idade.
- Ser domiciliados na zona rural e estejam em contato com agrotóxicos.

6.2.2 Critérios de exclusão

- Incapacidade dos indivíduos em responderem à entrevista por problemas físicos ou cognitivos.
- Indivíduos que apresentarem alguma doença crônica e indivíduos que não aceitem participar da pesquisa.

6.3 Procedimentos e Instrumentos

6.3.1 Desfecho primário – Depressão

6.3.2 Desfecho secundário - Síndrome Colinérgica e parâmetros bioquímicos.

6.3.3. Diagnóstico

6.3.3.1. Entrevista diagnóstica Mini International Neuropsychiatric Interview- MINI

O MINI é uma entrevista de curta duração – 15 a 30 minutos – destinada à utilização na prática clínica e de pesquisa, que visa classificação diagnóstica dos entrevistados de forma compatível com os critérios do DSM-IV e da entrevista diagnóstica semi-estruturada (SCID-10). A versão que utilizamos foi do MINI 5.0 em português que foi desenvolvida para a utilização em cuidados primários e em ensaios clínicos de acordo com Amorim (2000)⁶¹.

6.3.3.2. Entrevista diagnóstica Inventário de Depressão de Beck (BDI) –

O BDI foi utilizado para avaliar a presença e a intensidade de sintomas depressivos. Consiste em uma escala de auto-relato com 21 itens, cada um com quatro alternativas. A soma dos itens fornece um escore total, correspondente à intensidade da depressão⁶².

6.3.4 Coleta de dados

Foi realizada a coleta de dados dos indivíduos participantes como idade, gênero, status socioeconômico, principal cultivo, exposição a agrotóxicos (tempo de exposição, tipos de

agrotóxicos utilizados e uso de EPI) e também quanto a sinais e sintomas da Síndrome Colinérgica (com efeitos muscarínicos, nicotínicos e centrais – SNC), através do questionário sociodemográfico. A classificação socioeconômica foi obtida através do uso do Indicador Econômico Nacional⁶³.

6.3.5 Coleta do material biológico

As amostras de sangue foram obtidas através de uma punção venosa por um profissional treinado entre 8h e 11h da manhã no período de Outubro a Novembro de 2012. Logo após as coletas, as amostras de sangue foram identificadas, acondicionadas e encaminhadas ao Laboratório de Neurociências Clínicas da UCPel para processamento. Estas amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3.500rpm para separação do soro, plasma e eritrócitos. Alíquotas de soro e plasma foram separadas e eritrócitos lavados três vezes com salina 0,9%, hemolizados em água MilliQ e diluídos na proporção de 1:10. Após processadas estas foram armazenadas em freezer -80°C até a realização das técnicas bioquímicas. O período para a coleta da amostra foi determinada pela caracterização da população estudada ser em sua maioria trabalhadores envolvidos na plantação de fumo, evitando assim a etapa da colheita, momento onde ocorre maior contato com a planta e ocorrência de casos da síndrome colinérgica, devido à nicotina.

6.3.6 Análises bioquímicas

6.3.6.1. Determinação proteica

A concentração de proteína foi determinada pelo método do Lowry utilizando albumina bovina como padrão. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução

quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II) e produz um composto com absorção máxima em 750nm⁶⁴.

6.3.6.2. Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As amostras reagiram com 10% de ácido tricloroacético e 0.67% de ácido tiobarbitúrico e em seguida foram aquecidas em banho seco por 1 hora. A curva de calibração foi realizada utilizando 1.1.3.3-tetrametoxipropano, seguindo o mesmo tratamento das amostras. A absorbância de TBARS foi determinada em 535 nm, conforme método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Os resultados foram calculados em nmol de TBARS/mg de proteína⁶⁵.

6.3.6.3 Teste do óxido nítrico (ON)

A concentração de óxido nítrico foi mensurada através da reação de redução do nitrito e nitrato usando cádmio granulado e na conversão, através do reagente de Greiss, do nitrito em um composto com cromóforo roxo, o qual é mensurado colorimetricamente em 540 nm. Os produtos de ON foram expressos como $\mu\text{mol/L}$ de soro⁶⁶.

6.3.6.4. Medida do conteúdo total de tióis (SH)

Utilizado o método de Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução de 5.5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) por tióis resultando num derivado amarelo 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) cuja absorção é lida em 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol de TNB/ mg de proteína⁶⁷.

6.3.6.5. Atividade enzimática de AChE e BChE

A atividade enzimática foi realizada nos eritrócitos para medida da atividade da AChE e no soro para medida da atividade da BChE. Em uma alíquota da amostra foi adicionado o reagente de cor, água Milli-Q fazendo uma pré-incubação a 25°C por 2 minutos, logo após foi adicionado o substrato acetilcolina, pois AChE hidrolisa esta e produz tiocolina e acetato. A tiocolina, por sua vez reduz Ditiobis-nitrobenzólico em nitrobenzoato que possui coloração amarela e pode ser lido espectrofotometricamente em absorbância de 412 nm. Semelhantemente ocorre com a BChE, sendo o substrato a butiriltiocolina, após as leituras foi realizado o cálculo e expressão da atividade enzimática, que está expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, método Ellman modificado^{68,69,70,71}.

6.4 Análise de dados

As entrevistas foram realizadas com entrada simultânea dos dados no programa Epi-Info, enquanto que a análise dos dados foi processada no pacote estatístico SPSS 21.0. Foram realizadas frequências simples das variáveis de interesse para descrever as características da amostra, exposição a agrotóxicos e prevalência de depressão. Os fatores sócio demográficos associados à ocorrência de depressão foram verificados através do teste qui-quadrado (χ^2), e teste *t* de Student.

Diferenças nos parâmetros bioquímicos entre indivíduos com depressão e sem diagnóstico da doença foram avaliadas através do teste *t* de Student. Foi realizada correlação entre parâmetros oxidativos e atividade enzimática com a síndrome colinérgica, nos grupos deprimidos e não deprimidos. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

6.5 Aspectos éticos

Foram respeitados todos os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nº 196 de 10 de Outubro de 1996. Todos os pacientes que aceitarem participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B), assegurando o direito à confidencialidade dos dados e o cuidado na utilização das informações nos trabalhos desenvolvidos, de modo que os participantes não possam ser identificados. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Católica de Pelotas sob o parecer 80935.

6.5.1 Riscos

Os indivíduos estavam suscetíveis a um pequeno risco quanto à coleta de sangue, podendo apresentar algum hematoma ou flebite.

6.5.2 Benefícios

Os indivíduos que foram avaliados neste estudo receberam diagnóstico de hipertensão arterial e tipo sanguíneo, avaliados durante a entrevista. O estudo prevê o atendimento psicológico destes indivíduos no Centro de Atenção Psicossocial- CAPS.

6.6 Cronograma

Atividade	1° Semestre 2013	2° Semestre 2013	1° Semestre 2014	2° Semestre 2014
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
Coleta de Dados		X	X	X
Análise Enzimática		X	X	X
Análise dos Dados			X	X
Elaboração do Artigo			X	X
Apresentação do Artigo				X

6.7 Orçamento

Item	Quantidade	Custo Unitário (R\$)	Custo Total (R\$)
MATERIAL DE CONSUMO			
Tubos vacutainer capacidade 4mL com 100	8 caixas (100 un)	40,00	320,00
Luvas em látex Cx. c/100Un	30 caixas	21,90	657,00
Reagentes de grade analítica	6 frascos	166,66	1.000,00
Ponteiras com filtro 10, 100, 200 e 1000 µl	40 caixas (96 un)	25,00	1.000,00
Seringas de 10mL	400 unidades	0,55	220,00
Total em material de consumo			2.977,00
Reserva técnica			297,70
TOTAL			3.274,70

7. REFERÊNCIAS

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
2. Brunton L, Lazo J, Parker K, Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica, 11ª ed., Artmed, Porto Alegre, 2010, 190-195.
3. Jun D, Musilova L, Musilek K, Kuca K, *In Vitro* Ability of Currently Available Oximes to Reactivate Organophosphate Pesticide-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase, *Int. J. Mol. Sci.*, 2011,12, 2077-2087.
4. Pasiani JO, Torres P, Silva JR, Diniz BZ, Caldas ED, Knowledge, Attitudes, Practices and Biomonitoring of Farmers and Residents Exposed to Pesticides in Brazil, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012,9, 3051-3068.
5. Singh S. et al., Influence of CYP2C9, GSTM1, GSTT1 and NAT2 genetic polymorphisms on DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides, *Mutation Research*,741, 2012, 101– 108.
6. Lullmann H, Mohr K, Hein L, Bieger D, *Farmacologia: Texto e Atlas*, 5ª ed, Artmed, Porto Alegre, 2008, 116-126.
7. Mineur Y, Picciotto M, Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis, *Trends Pharmacol Sci.* 2010, 31(12) 580–586.
8. Faria NMX, Facchini, LA, Fassa, ACG, Tomasi E, Processo de produção rural e saúde na serra gaúcha: um estudo descritivo, *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2000, 115-128.
9. Ohara, Augusto, *Radicais Livres: bons, maus e naturais*, Oficina de Textos, São Paulo, 2006, 28-33.
10. Emerit J, Edeas M, Bricaire F, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomedicine e Pharmacotherapy*, v58, 2004, 39-46.
11. Free Radicals and other reactive species in Disease, *Encyclopedia of life sciences*, 2001 disponível em www.els.net.

12. Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organo phosphorus pesticides manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol*. 2002a,21:179-182.
13. Baltazer MT et al., Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach, *Toxicology Letters* 230 (2014) 85–103.
14. Ranjbar, HA., Mashayekhi FJS, Susanabdi A, Rezaiee A, Abdollahi M, Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (2005) 88–91.
15. Gazal M, Ortmann CF, Martins FA, Streck EL, Quevedo J, de Campos AM, Stefanello FM, Kaster MP, Ghisleni G, Reginatto FH, Lencina CL. *Brain Res Bull* 2014 Sep; 108: 10-7.
16. IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidades>> Acesso em: 25 jul. 2013.
17. Silva, JM et al., Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Revista Ciência e Saúde Coletiva*, 10, n. 004, p. 891-903. 2005.
18. Jacobson L S V, Comunidade pomerana e uso de agrotóxicos: uma realidade pouco conhecida, *Ciência & Saúde Coletiva*, 2009, 2239-2249.
19. Moreau R L M, Siqueira M E P B, *Toxicologia Analítica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008, 269-275.
20. Baynes J, Dominiczack M, *Bioquímica Médica*, 1º ed., Manole, São Paulo, 2007, 508-509.
21. Protocolo de avaliação das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos, Secretaria de Estado e da Saúde de Paraná, Superintendência de Vigilância em Saúde, Centro Estadual de Saúde do Trabalhador, Curitiba, 2013.
22. King A M, Aaron C K, Organophosphate and Carbamate Poisoning, *Emerg Med Clin N Am* 33 (2015) 133–151.
23. Caldas, LQ de A et al., Intoxicações Exógenas Agudas: por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretróides, Centro de controle de intoxicações,

Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2000.

24. Brahmí N, Prognostic value of human erythrocyte acetyl cholinesterase in acute organophosphate poisoning, *American Journal of Emergency Medicine* 2006, 24, 822–827.

25. Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T, Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives, *BioMed Research International*, 2013, 2013,1-8.

26. Faria N M X, Fassa A G, Meucci R D, Fiori N S, Miranda V I, Occupational exposure to pesticides, nicotine and minor psychiatric disorders among tobacco farmers in southern Brazil, *NeuroToxicology* xxx (2014) xxx–xxx.

27. Salvi RM, Lara, DR, Ghisolfi, ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO, Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides, *Toxicological Sciences*, 2003, 72, 267–271.

28. Botega, N. J, Furlaneto, L, Frágoas Jr, *Depressão: Prática Psiquiátrica no Hospital Geral: interconsulta e emergência*, Porto Alegre: Artmed, 2006, 225-246.

29. Meneghel SN et al., Características Epidemiológicas do Suicídio no Rio Grande do Sul. *Ver Saúde Pública*, 2004; 38: 804-10.

30. Lovisi GM, Santos SA, Legay L, Abelha L, Valencia E. Análise Epidemiológica do Suicídio no Brasil entre 1980 e 2006. *Ver Bras Psiquiatria* 2009; 31:86-93.

31. Etges V E, *O impacto da cultura do tabaco no ecossistema e na saúde humana*, Textual, Porto Alegre, 2002, 14-21.

32. Wallace TL, Bertrand D, Importance of the nicotinic acetylcholine receptor system in the prefrontal cortex. *Biochem Pharmacol.* 2013 Jun 15;85(12):1713-20.

33. Ventura A L M, Abreu P A, Freitas R C C, Sat hler P C, Loureiro N, Castro H C, Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo, *Rev Psiq Clín.* 2010;37(2):66-72.

34. Daniel Bertrand, The possible contribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in

- Depression, *Dialogues Clin Neurosci.* 2005;7:207-216.34. Araki H, Suemaru K, Gomita Y, Neuronal Nicotinic Receptor and Psychiatric Disorders: Functional and Behavioral Effects of Nicotine, *Jpn. J. Pharmacol.*, 2002,88, 133 – 138.
35. Pohanka M, Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Is a Target in Pharmacology and Toxicology, *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 2219-2238.
36. USEPA. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency; 2000. The use of data on cholinesterase inhibition for risk assessments of organophosphorous and carbamate pesticides.
37. Lotti, M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger, R., editor. *Handbook of Pesticide Toxicology*. Second Edition. San Diego, CA: Academic Press; 2001. p.1043-1085.
38. Greig NH, Reale M, Tata AM, New pharmacological approaches to the cholinergic system: an overview on muscarinic receptor ligands and cholinesterase inhibitors. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2013 Aug;8(2):123-41.
39. Saricicek A, et al. Persistent $\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholinergic receptor dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, 2012, 169(8):851–859.
40. Risch SC, et al., Physostigmine induction of depressive symptomatology in normal human subjects. *Psychiatry Res*, 1981 4(1):89–94.
41. Dilsaver SC, Peck JA, Overstreet DH, The Flinders Sensitive Line exhibits enhanced thermic responsiveness to nicotine relative to the Sprague-Dawley rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 41(1):23–27.
42. Mineur YS et al., Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior, *PNAS*, 2013, vol. 110, n° 9, 3573–3578.
43. Gilad GM. The stress-induced response of the septo-hippocampal cholinergic system. A vectorial outcome of psychoneuroendocrinological interactions. *Psychoneuroendocrinology* 1987; 12: 167–184.

44. Janowsky DS, Risch SC. Cholinomimetic and anticholinergic drugs used to investigate and acetylcholine hypothesis of affective disorders and stress. *Drug Devel Res* 1984; 4: 125–142.
45. Shytle RD, Silver AA, Lukas RJ, Newman MB, Sheehan DV, SanbergPR, Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants *Molecular Psychiatry*, 2002, 7, 525–535
46. Dhananjayan V, Ravichandran B, Anitha N, Rajmohan, H R, Assessment of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in blood plasma of agriculture workers, *Indian J Occup Environ Med*, 2012,16(3), 127-130.
47. Hofmann J N, Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State, *Occup Environ Med*. 2010, 67 (6), 375–386.
48. Fang Y Z, Yang S, Wug. Free radicals antioxidants and nutrition, *Nutrition*, v18, 2002, p 39-46.
49. Sies H, Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *advances in Pharmacology*, v38, California, Academic Press, 1997, p 707.
50. Soltaninejad K & Abdollahi M. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review, *Med Sci Monit*. 2009 Mar;15(3):RA75-90.
51. Chambers JE, Carr RL, Boone, HW, Chambers S, The metabolism of organophosphorus insecticides, *Handbook of Pesticide Toxicology*, Ed. II, Academic Press, USA 2 (2001) 919–927.
52. Rastogi SK, Satyanarayan PV, Ravishankar D, Tripathi S., A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying, *Indian J Occup Environ Med*. 2009 Dec;13(3):131-4.
53. Surajudeen YA, Sheu RK, Ayokulehin KM, Olatunbosun AG., Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Int J Appl Basic Med Res*. 2014 Sep;4(Suppl 1):S37-40.

54. Lukaszewicz-Hussain A, Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 98 (2010) 145–150.
55. Popa-Wagner A, Mitran S, Sivanesan S, Chang E, Buga AM: ROS and the brain diseases: the good, the bad, and the ugly. *Oxid Med Cell Longev* 2013 Dec 5; 2013:963520.
56. Siwek M, Sowa-Kućma M, Dudek D, Styczeń K, Szewczyk B, Kotarska K et al. Oxidative stress markers in affective disorders. *Pharmacol Rep* 2013; 65(6): 1558-71.
57. Bilici M, Efe H, Köroğlu MA, Uydu HÁ, Bekaroğlu M, Geğer O: Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001;64: 43-51.
58. Stefanescu C, Ciobica A: The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *J Affect Disord* 2012;143:34-38.
59. Gonzalez-Trujano ME, Alvarado-Vásquez N, Mendoza-Sotelo J, López G, Estrada-Camarena E et al. Alterations on the morphology, nitric oxide synthesis and activity of platelets reproduced in rats as possible biomarkers for depression are reversed by fluoxetine. *Pharmacol Biochem Behav* 2012 Aug; 102(2): 349-56.
60. Stefanescu C., & Ciobica, A. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *Journal of Affective Disorders*, 143(1-3),2012, 34-38.
61. Amorim P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2000; 22 (3): 106-115.
62. Cunha JA, Manual da versão em português das Escalas de Beck. São Paulo: Casa do Psicólogo 2001.
63. Barros AJD, Victora CG. Indicador econômico para o Brasil baseado no censo demográfico de 2000. *Rev. Saude Publica* 2005 Aug; 39(4): 523–529.
64. Noble JE, Bailey MJ, Quantitation of protein, *Methods Enzymol.* 2009;463:73-95.
65. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1980;186: 407-21.

66. Smith C, Marks A, Lieberman M. *Bioquímica Médica de Marks Uma abordagem clínica*. 2ª ed. Porto Aegre (RS): Artmed; 2007.
67. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001 Apr 20; 302(2-3): 141-5.
68. Worek et al., Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta* 1999; 288:73-90.
69. Eyer et al. Molar absorption coefficients for reduced Ellman reagent: reassessment. 2003; 312:224-227.
70. Sinko G, Calic M, Bosak A, Kovarik Z. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes, *Analytical Biochemistry* 370 (2007) 223–227.
71. Pohanka M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker, *Bratisl Lek Listy* 2013; 114 (12)726 – 734.

8. ARTIGO

MS will be submitted as an Original Report to the Toxicology Letters

Cholinesterase activity and oxidative stress parameters are correlated with cholinergic syndrome in depressive subjects exposed to pesticides in Southern Brazil.

Josiane Beatriz Wruck¹, Janaína Schulz¹, Fernanda N Kaufmann¹, Clarissa Ribeiro Bastos¹, Marta Gazal², Jennifer Specht Dias¹, Liana Longo Teixeira¹, Carol D Wiener¹, Karen Jansen¹, Manuella P. Kaster³, Carla D Bonan², Gabriele Ghisleni^{1*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento – Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil; ² Biologia Celular e Molecular – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; ³ Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

* Corresponding Author

Gabriele Ghisleni (ghisleni.g@gmail.com)

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Centro de Ciências da Vida e da Saúde, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Rua Gonçalves Chaves 373

96015560

Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Phone: +55 53 2128 8031

FAX: +55 53 2128 8229

Abstract

Pesticides are highly neurotoxic and may produce a series of health problems by cholinesterases inhibition and induction of oxidative stress. Both factors are described to be related to the physiopathology of major depression. The aim of this study was evaluate the cholinergic syndrome symptoms and biological markers in a rural population according to major depression. The study was composed by 100 workers involved in family agriculture of tobacco from southern Brazil. AChE and BChE activities and serum oxidative stress parameters were evaluated. No association was found between cholinergic syndrome, major depression and biological parameters. However, the time of pesticides exposure, muscarinic, nicotinic and central symptoms of cholinergic syndrome were higher in subjects in current depression episode. A positive correlation was found between BChE activity and NO levels with CNS effects in depressive subjects. In conclusion, we can suggest that these mechanisms could be increasing the inflammatory response, involved in the pathophysiology of major depression, and promote the central effects of cholinergic syndrome in depressive subjects.

Keywords: Major depression, pesticides, cholinergic syndrome, cholinesterase activity, oxidative stress

1. Introduction

The intensive use of pesticides is currently a major public health problem. Pesticides are often applied in a combination with several classes of compounds featuring synergistic interactions. Brazil has been the world's largest pesticide consumer in the last ten years (Anvisa, 2012). In southern Brazil, tobacco is one of the most prevalent productions among grower families. Studies have reported increased prevalence of psychiatric problems and associated risk factors in this group of farmers (Farial et al., 2014, Poletto & Gontijo, 2012, Etges et al., 2002, Faria et al., 1999). Moreover, besides the pesticides use, these farmers are also heavily exposed to dermal absorption of nicotine during harvesting (Fassa et al., 2014).

Intensive use of pesticide represents adverse impact on health in general and on mental health in particular, and recent research has linked long-term use of pesticides to higher rates of depression and suicide. The acute toxicity in humans has been associated with a host of central nervous system, cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, sensory, and motor manifestations which are frequently life threatening (Collombet, 2011). Likewise, there is significant evidence suggesting that chronic exposure to pesticides, mainly organophosphorus, can be associated with neurobehavioral abnormalities including anxiety, depression, psychotic symptoms, deficits in short-term memory, learning, attention, information processing, and extrapyramidal symptoms (King et al., 2015, Salvi et al., 2003, Singh & Sharma, 2000).

The toxicological effects of some pesticides occur by the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) resulting in an accumulation of acetylcholine and the continued stimulation of cholinergic receptors, and for this are also called anticholinesterase agents (Strelitz et al., 2014, Polanka 2013, Singh et al., 2012, Junn et al., 2011, Hofmann et al., 2010). Moreover, organophosphorus compounds produce the most toxic effects, while carbamates mainly used as home insecticides and herbicides are less toxic than organophosphorus pesticides (Ballantyne & Marrs, 1992).

Although, the mechanisms of pesticides toxicity is primarily attributed to inhibitory actions on various forms of cholinesterase leading to excessive peripheral and central cholinergic activity, new evidences suggest other biological process to better explain the wide-variety of adverse consequences of long-term exposure (Terry, 2012). In this context, the aim of the present work is evaluate the impact of pesticides use in cholinergic system as well as oxidative stress parameters, and correlate these biological markers with symptoms of

cholinergic syndrome and central nervous system effects in tobacco farmers according to clinical diagnosis of major depression.

2. Methods

2.1 Participants

This is an observational cross-sectional study conducted in rural zone of Canguçu, southern Brazil, from September to November 2012, the period of pesticides application. The sample of people aged 18 to 60 years consisted of 100 workers involved in family agriculture of tobacco. A standard questionnaire was conducted in morning home visits to collect information on socio-demographic characteristics, life style, pesticides exposure (time and type of exposure, use of protective equipment). Signs and symptoms of cholinergic syndrome were evaluated and classified as muscarinic effects (increased bronchial secretion, excessive sweating, salivation and lacrimation, pinpoint pupils, bronchoconstriction, abdominal cramps, bradycardia, hypotension), nicotinic effects (tachycardia, hypertension, mydriasis, twitching and fasciculation of muscles), and central nervous system effects (mental confusion, headache, somnolence, convulsion, coma) (Balali- Moodnet et al., 2012, Balali- Moodnet & Balali- Moodnet, 2008). In order to ascertain psychiatric disorders Mini International Neuropsychiatric Interview 5.0 (MINI) (Amorin 2000) was used according to Diagnosis and Statistical Manual of Mental Disorder (*DSM-IV*) and International Statistical of Disease and Health related problems (CID-10) (OMS, 1993). The University's Ethics Committee approved the study protocol (protocol number 80935) and all subjects provided informed consent in writing.

2.2. Biochemical assay

Ten milliliters of blood sample was withdrawn by venipuncture between 8 and 11 a.m. from participants. The blood was immediately centrifuged at 3500rpm for 15 min and the isolated serum was kept frozen at -80°C until analysis. Before biochemical assay serum protein content was measured by Lowry assay using bovine serum albumin as standard (Noble & Baley, 2009). All biochemical assay were performed in 80 participants due decline of blood collection.

Acetylthiocholine, butyrylthiocholine, albumin, DTNB, Naftil-etilen-diamino-dicloro, sulfonamide, thiobarbituric acid were purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). All other chemicals were from analytical grade.

2.2.1 Oxidative parameters

Serum level of thiobarbituric acid reactive species formation (TBARS), a measure of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Esterbauer and

Cheeseman (Esterbauer & Cheeseman, 1980). Briefly, serum samples were mixed with trichloroacetic acid 10 % and thiobarbituric acid 0.67 % and heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS was determined by the absorbance at 532 nm. Results were reported as nmol of TBARS per mg protein. Nitric oxide (NO) was measured in terms of its products nitrite (NO^{2-}) and nitrate (NO^{3-}). The test is based on the reduction of nitrate to nitrite using Greiss reagent, measured colorimetrically at 540 nm (Talarowska et al., 2012) and expressed as $\mu\text{mol/L}$ of serum. Total sulfhydryl content was performed in serum as described by Aksenov and Markesbery (Aksenov & Markesbery, 2001), which is based on the reduction of DTNB by thiols and in turn becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, serum assays were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Results were reported as $\mu\text{mol TNB}$ per mg protein.

2.2.2. Enzymatic activity

Acetylcholinesterase (AChE) activity was estimated in erythrocytes and Butirylcholinesterase (BChE) activity was estimated in serum, using respectively achetylthiocholine and butirylthiocholine as substrate, as described previously (Eyer et al., 2003, Ellman 1961). Upon arrival at the laboratory, blood samples were centrifuged, the erythrocyte portion was washed three times in saline solution (0.9%), hemolysated in Milli-Q water, and the fractions kept frozen (-80°C) until analysis. Briefly, thiocholine produced was coupled with 5-5-bis dithionitrobenzoic acid (DTNB, a coloring agent) to give the yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion, and was quantified at 412nm using a Spectramax 190 spectrophotometer. The activity was expressed of $\mu\text{mol/min/mg}$ of protein.

2.3. Statistical analysis

Descriptive analyses are presented as %, mean \pm standard deviation (SD). Biochemical parameter with skewed distribution, were log-transformed and analyzed by *Student t test*. Socio-demographic characteristics according to clinical diagnostic of depression episode were analyzed by *Student t test* or χ^2 . Furthermore, correlation between biochemical parameters and symptoms of cholinergic syndrome was performed using Spearman's analysis. Statistical Program for Social Sciences (SPSS) 21.0 was used to perform the statistical analysis and values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

In Table 1 we show the socio-demographic characteristics of 100 rural workers from the southern Brazil. The average age of the subjects was 40.07 ± 13.05 years. Of all subjects

evaluated, 57% were female, 12% are smokers, and all subjects were exposed to pesticides lifelong (23.43 ± 25.47 years). The majority of workers used individual protective equipment (86%). Psychiatric disorders are present in 18% of subjects and 7% are in depressive episode. Moreover, 66% of the subjects presented some symptoms of cholinergic syndrome.

We showed in Table 2 the socio-demographic and clinical characteristics of subjects according to clinical diagnoses of major depression. The mean age was significantly different between controls and depressive subjects (39.2 ± 12.5 and 51.0 ± 15.6 , respectively). The time of pesticides exposure in years was also higher in depressive (38.7 ± 41.7) than controls subjects (21.6 ± 22.9 ; $p=0,049$), and no difference was observed for hours of working per day. The parameters of oxidative stress for TBARS ($p=0.851$), NO ($p=0.193$), as well acetylcholinesterase ($p=0.911$) and butirilcholinesterase activity ($p=0.705$) were not different between groups. However, subjects without depressive symptoms have higher levels of total sulfidril groups (16.1 ± 1.6) than depressive one (14.0 ± 2.3 ; $p=0.003$). In relation to cholinergic syndrome, the scores for muscarinic symptoms were higher in depressive (1.3 ± 1.2) than control subjects (0.5 ± 0.9 ; $p=0.029$), as well as for nicotinic symptoms (1.9 ± 1.3 and 0.5 ± 0.9 ; $p=0.001$) and central effects (1.7 ± 0.7 and 0.8 ± 0.9 ; $p=0.014$).

The results for the correlation analysis between the cholinergic syndrome symptoms and the biological parameters analyzed according to clinical diagnosis of major depression are showed in Table 3. Our data show no significantly correlation in control subjects for any parameter analyzed. However in depressive subjects we show a positive correlation between the NO levels ($r=0.772$; $p=0.042$) and BChE activity ($r=0.8$; $p=0.015$) with central symptoms of cholinergic syndrome.

4. Discussion

The present study found that time of pesticide exposure, symptoms of cholinergic syndrome and central nervous system (CNS) effects were higher in subjects in current depressive episode. Moreover, our results showed a positive correlation between the scores of CNS effects, BChE activity and NO levels in depressive subjects, but did not found association between the biological parameters evaluated with current depressive episode and the presence of cholinergic and CNS effects in family tobacco farmer workers of southern Brazil.

A variety of pesticides commonly used by farmer workers irreversibly inhibit enzymes AChE and BChE by phosphorylation or phosphonylation of the serine hydroxyl group at the enzyme's active site leading to acetylcholine accumulation in the nerve synapses that cause cholinergic crisis. Central cholinergic factors were suggested to play a role in the etiology of

affective disorders, including major depression (Mineur et al., 2013; 2010). Indeed, central cholinergic activation observed in subjects poisoned with cholinesterase inhibitors produce depression-like symptoms. The prevalence of major depression in farmer workers evaluated in this study seems not increase with the pesticide uses. However, current depressive episode was associated with time of pesticides exposure in years. Similar with our data, a recent study enrolled in the southern Brazil with tobacco farm workers, showed a prevalence of 12% for minor psychiatric morbidity which considers anxiety, depression and somatic disorders (Faria et al., 2014). In another study, Faria et al. (1999) demonstrated a prevalence of 37% for minor psychiatric morbidity in farmers workers engaged in cultures other than tobacco. The discordance in the literature can be due the distinct farming of rural population, by the diagnosis instrument, and the number of individuals evaluated.

Cholinergic hypersensitivity was thus considered essential in depression with evidence of anticholinesterases and cholinomimetics producing acute syndromes characterized by dysphoria, psychomotor retardation and energy loss. Some studies have showed that individuals poisoning with cholinesterase inhibitors develop depression symptoms and peripheral parasympathetic toxicity (Gershon & Shaw 1961; Janowsky et al., 1974). However, the relationship between cholinergic system modulation and psychiatric disorders or depressive symptoms associated with pesticides poisoning are scarce in the literature. In this study, we did not found significant differences between AChE and BChE activities according to major depression diagnosis in individual chronically exposed. Our results are in agreement with Salvi et al. (2003) in which no alterations in AChE activity was found as consequences of chronic pesticides exposure. The authors suggest that AChE was not a valid parameter for monitoring health consequences of chronic pesticides exposure since there was a relatively high rate of extrapyramidal and psychiatric symptoms.

Signs and symptoms of cholinergic syndrome occurring in acute poisoning with organophosphorus pesticides are predictable from their biochemical mechanism of action and are directly related to the levels of cholinesterases activity. In cases of human poisoning, general acute symptoms of peripheral nicotinic and muscarinic intoxication are clearly apparent (Jokanović 2010). Indeed, in patients with acute cholinergic crisis, the correlation between severity of the organophosphate poisoning judged by certain symptoms of cholinergic syndrome and cholinesterase activity, was demonstrated by the decreased activity of AChE in comatose patients and those presenting other aspects of muscarinic symptoms (Brahmi et al., 2006). However, at chronic pesticides exposure, our data show no association between cholinergic syndromes with cholinesterases activity (data not shown). Nevertheless,

we found that time of pesticide exposure increase some aspects of CNS and nicotinic symptoms.

Furthermore, different pesticides have been reported to induce oxidative stress due to generation of free radicals and alteration in antioxidant defense mechanisms (Soltaninejad & Abdollahi, 2009). It has been demonstrated that organophosphate can evoke lipid peroxidation in the developing rat brain at concentrations that only cause mild signs of systemic toxicity (Slotkin, 2005). In rats following lactational organophosphorus insecticide poisoning and one month post-poisoning, decreased cholinesterases activity and changes in brain, plasma and erythrocyte lipid peroxidation, total SH groups and antioxidants enzymes were found (Selmi et al., 2012). The platelets analysis of patients with severe aluminum phosphide poisoning showed yet a significant increase in lipid peroxidation and protein carbonylation, lower levels of total SH content, as well as a decrease in the activities of mitochondrial complexes I, II and IV (Anand et al., 2014). In these aspects, alterations in cholinesterases activity and oxidative stress parameters evaluated in chronic pesticide toxicity could be linked to the adverse health effects.

Oxidative stress through increased levels of reactive oxygen species, hydrogen peroxide, nitrate and nitrite, has been implicated as one of the mechanisms for the adverse health effects of pesticides (Abdollahi & Karami-Mohajeri 2012, Lukaszewicz-Hussain 2010). The accumulation of reactive oxygen species in brain and other tissues may disturb the normal physiological function thus aggravating the toxicity symptoms caused of pesticides (Baltazar et al., 2014). Current literature has been showed that oxidative stress is associated with psychiatric disorders, in special major depression (Stefanescu & Ciobica 2012, Ng et al., 2008, Akyol et al., 2004). The relationship between oxidative stress and major depression may arise from the vulnerability of nervous system to oxidative damage. This assumption is supported by the high utilization of oxygen by brain cells, high content of lipids as substrates for oxidation and redox potential of several neurotransmitters. This scenario is even aggravated by inefficient antioxidant mechanisms in the brain tissue (Gutteridge & Halliwell, 2010). Besides this, our results only found a decrease in total SH content, a parameter of antioxidant defense, in subjects with current depressive episode in relation to non-depressed.

Important to note that in the present study a positive correlation was found between BChE activity and NO levels with CNS effects in depressive subjects. In this context, evidence indicates that inhibitors of cholinesterases can promote suppression of pro-inflammatory cytokines release through a cholinergic anti-inflammatory pathway (Pohanka, 2014). This pathway is a regulatory link between nerve terminations in blood and

macrophages expressing the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) on their surface (Polanka 2012, Rosas-Ballina & Tracey 2009, Wessler & Kirkpatrick, 2008). The mechanism of inflammatory regulation is suggested by the termination of cholinergic anti-inflammatory pathway activation due AChE bound on erythrocytes (Silva-Herdade & Saldanha 2013, Polanka 2012). Although the conversion rate of acetylcholine by BChE is lower than the conversion by AChE, the effect of BChE became relevant once the cholinergic anti-inflammatory pathway mediated by BChE plays a greater role in the blood than in the nervous system. Moreover, in the treatment with antioxidant compounds a stronger correlation between AChE and BChE inhibition and the inhibition of NO production was demonstrated (Mazlan et al., 2013). In this work we showed that increased BChE activity might correspond to decreased levels of acetylcholine and higher levels of NO. In this way, we can suggest that these mechanisms could be increasing the inflammatory response and subsequently promoting the central effects of cholinergic syndrome in depressive subjects.

5. Conclusion

To conclude, our data suggest that chronic pesticides exposure could promote the modulation of biological parameters which induces CNS effects that may increase the risk for psychiatric disorders. Important limitations for this study are the sample size, and the absence of a control group without pesticides exposure to comparison. However, although the results might give a first insight on the top-down process that link brain functional activation patterns, peripheral alterations and major depression in farmers workers exposed to pesticides, future studies should address these populations.

Acknowledgments

We thank all the individuals who participated in this study and to the founding sources that supported this study CNPq, CAPES, FAPERGS, and CEREST (Brazil).

Conflict of interest

The authors of this paper do not have any potential conflict of interests in connection with this manuscript.

References

Abdollahi, M., & Karami-Mohajeri, S., 2012. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicol. App. Pharmacol.* 258, 309–314.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, 2013. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília.

- Amorim, P., 2000. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 3, 106-115.
- Anand, R., Sharma, D.R., Verma, D., Bhalla, A., Gill, K.D., Singh, S., 2013. Mitochondrial electron transport chain complexes, catalase and markers of oxidative stress in platelets of patients with severe aluminum phosphide poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 807-816.
- Akyol, O., Zoroglu, S.S., Armutcu, F., Sahin, S., Gurel, A., 2004. Nitric oxide as physiopathological factor in neuropsychiatric disorders. *In vivo* 8, 377-390.
- Aksenov, M.Y. & Markesbery, W.R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 302, 141-145.
- Ballantyne, B. & Marrs, T., 1992. Overview of the biological and clinical aspects of organophosphates and carbamates. In: Ballantyne B, Marrs TC, eds. *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Oxford: Butterworth & Heinemann; 3 – 14.
- Balali-Mood, M., Balali-Mood, K., Moodi M., Balali-Mood, B., 2012. Health Aspects of Organophosphorous Pesticides in Asian Countries. *J. Publ. Health.*41, 01-14.
- Balali-Mood, M. & Balali-Mood K., 2008. Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch. Iranian Med.* 11, 65-89.
- Brahmi, N., 2006. Prognostic value of human erythrocyte acetyl cholinesterase in acute organophosphate poisoning. *Am. J. Emerg. Med.* 24, 822–827.
- Collombet, J.M., 2011. Nerve agent intoxication: recent neuropathophysiological findings and subsequent impact on medical management prospects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 229-241.
- Ellman, G et al., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Eyer, et al., 2003. Molar absorption coefficients for reduced Ellman reagent: reassessment. 312, 224-227.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1980. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407-421.
- Etges, V.E., 2002. O impacto da cultura do tabaco no ecossistema e na saúde humana, *Textual.* 14-21.
- Faria, N.M.X., Facchini, L.A., Fassa, A.C.G., Tomasi, E., 1999. Estudo transversal sobre saúde mental de agricultores na Serra Gaúcha (Brasil), *Rev. Saúde Públ.* 33, 391- 400.
- Fassa, A.G., Faria, N.M.X., Meucci, R.D., Fiori, N.S., Miranda, V.I., Facchini, L.A., 2014. Green tobacco sickness among tobacco farmers in southern Brasil. *Am. J. Ind. Med.* 57, 726-735.
- Gershon, S., Shaw, F.H., 1961. Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphorus insecticides. *Lancet.* 1, 1371–1374.

- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561-564.
- Hofmann, J.N., 2010. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. *Occup. Environ. Med.* 67, 375–386.
- Janowsky, D.S., el-Yousef, M.K., Davis, J.M., 1974. Acetylcholine and depression. *Psychosom. Med.* 36, 248–257.
- Jokanović, M., & Kosanović, M., 2010. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29, 195–201.
- Jun, D., Musilova, L., Musilek, K., Kuca, K., 2011. In Vitro Ability of Currently Available Oximes to Reactivate Organophosphate Pesticide-Inhibited Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 2077-2087.
- King, A.M., Aaron, C.K., 2015. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* 33, 133–151.
- Lukaszewicz-Hussain, A., 2010. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pest. Biochem. Physiol.* 98,145–150.
- Mazlan, N.A., Mediani, A., Abas, F., Ahmad, S., Shaari, K., Khamis, S., Lajis, N.H., 2013. Antioxidant, antityrosinase, anticholinesterase, and nitric oxide inhibition activities of three Malaysian macaranga species. *Sci. World J.* 312741, 1-8.
- Mineur, Y.S. et al., 2013. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *PNAS.* 110, 3573–3578.
- Mineur, Y., Picciotto, M., 2010. Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 580–586.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I., 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base on therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 851-876.
- Noble, J.E., Bailey, M.J., 2009. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 463, 73-95.
- Organização Mundial da Saúde, 1993. Divisão de Saúde Mental. Protocolo para teste de campo da CID-10 versão para cuidados primários (CID-10 CP). Genebra.
- Pohanka, M., 2012. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2219–2238.
- Pohanka, M., 2013. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratisl. Lek. Listy.* 114, 726 – 734.
- Pohanka, M., 2014. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9809-9825.
- Poletto, A.R., Gontijo, L.A., 2012. Family farming workers mental health in a microrregion in southern Brazil. *Work* 41,4987-4994.

- Rosas-Ballina, M. & Tracey, K.J., 2009. Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* 265, 663–679.
- Salvi, .RM., Lara, D.R., Ghisolfi, E.S., Portela L.V., Dias R.D., Souza D.O., 2003. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicol. Sci.* 72, 267–271.
- Selmi, S., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2012. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to malathion. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 753-760.
- Silva-Herdade, A.S., Saldanha, C., 2013. Effects of acetylcholine on an animal mode of inflammation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 53, 209–216
- Singh, S. & Sharma, N., 2000. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. *Neurol. India.* 48, 308-313.
- Slotkin, T.A., Oliver, C.A., Seidler, F.J., 2005. Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Dev. Brain Res.* 157, 172-180.
- Soltaninejad, K. & Abdollahi, M., 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med. Sci. Monit.* 15, 75-90.
- Stefanescu, C., Ciobica, A., 2012. The relevance of oxidative stress status in first episode and recurrent depression. *J. Affect Disord.* 143, 34-38.
- Strelitz, J., Engel, L.S., Keifer, M.C., 2014. Blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as biomarkers of cholinesterase depression among pesticide handlers. *Occup. Environ. Med.* 71, 842–847.
- Talarowska, M., Galecki, P., Maes, M., Orzechowska, A., Chamielec, M., Bartosz, G., & Kowalczyk, E., 2012. Nitric oxide plasma concentration associated with cognitive impairment in patients with recurrent depressive disorder. *Neurosci. Lett.* 510, 127-131.
- Terry Jr, A.V., 2012. Functional Consequences of Repeated Organophosphate Exposure: Potential Non-Cholinergic Mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 134, 355–365.
- Wessler, I., Kirkpatrick, C.J., 2008. Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1558–1571.

Table 1: Socio demographics and clinical characteristics of sample.

Characteristics	Values % (N) or MEAN (\pmSD)
Gender	
Female	57% (57)
Male	43% (43)
Age (Years)	40,07 \pm 13,05
Ethnicity	
Caucasian	93,9% (93)
No Caucasian	6,1% (6)
Socioeconomic class	
High	25% (25)
Intermediate	50% (50)
Low	25 % (25)
Smokers	
No	88% (88)
Yes	12% (12)
Exposure (years)	23,43 \pm 25,47
Working hours per Day	10,59 \pm 2,28
Use of protection (EPI)	
No	14% (14)
Yes	86% (86)
Clinical Disease	
Have not	62% (62)
High Pressure	15% (15)
Problems of nerves	10% (10)
Other	13 % (13)
Psychiatric Disorders	
No	82% (82)
Yes	18% (18)

Displayed as mean \pm standard deviation or n and %. Descriptive analysis were made by single frequency.

Table 2: Socio demographic and clinical characteristics according to the clinical diagnosis of major depression.

Characteristics	Control	DM	P - value
Age (Years)	39,25 ± 12,55	51,00 ± 15,66	0,019*
Gender			0,625
Female	58,2 (54)	42,9 (3)	
Male	41,8 (39)	57,1 (4)	
Exposure (years)	21,57 ± 22,88	38,71 ± 41,68	0,049*
Working hours per day	10,63 ± 2,30	10,33 ± 1,97	0,758
TBARS (nmol of TBARS/mg of protein)	0,0005 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0004	0,851
SH (µmol TNB/mg of protein)	16,06 ± 1,59	14,04 ± 2,31	0,001*
NO (µmol/L of serum)	40,29 ± 40,35	38,87 ± 67,87	0,193
AChE(µmol/min/mg of protein)	1,14 ± 0,39	1,07 ± 0,29	0,911
BChE(µmol/min/mg of protein)	4,35 ± 1,18	4,16 ± 1,09	0,705
Scores symptoms muscarinic	0,52 ± 0,86	1,29 ± 1,25	0,029*
Scores symptoms nicotinic	0,52 ± 0,94	1,86 ± 1,35	0,001*
Scores CNS effects	0,78 ± 0,95	1,71 ± 0,76	0,014*
Total	93	7	

Displayed as mean ± standard deviation or n and %. *P* values ≤ 0.05 were considered significant for differences in socio demographic characteristics between clinical diagnoses of current depression. The differences were evaluated by Student *t test*, and χ^2 , as appropriated.

Table 3. Determination of oxidative stress parameters and activity of AChE and BChE correlation with symptoms of Cholinergic Syndrome in group depression and in group control.

Controls						
Indices	Muscarinic symptoms		Nicotinic symptoms		CNS symptoms	
	r-value	P	r-value	P	r-value	P
TBARS (nmol of TBARS/mg of protein)	-0,219	0,067	-0,098	0,416	-0,100	0,409
SH (μ mol TNB/mg of protein)	0,089	0,460	0,047	0,695	-0,151	0,210
NO (μ mol/L of serum)	0,186	0,120	0,020	0,871	-0,026	0,832
AChE (μ mol/min/mg of protein)	-0,060	0,616	-0,158	0,183	-0,126	0,289
BChE (μ mol/min/mg of protein)	0,194	0,105	0,094	0,437	-0,031	0,800
Depression						
Indices	Muscarinic symptoms		Nicotinic symptoms		CNS symptoms	
	r-value	P	r-value	P	r-value	P
TBARS (nmol of TBARS/mg of protein)	0,472	0,284	0,000	1,000	-0,309	0,501
SH (μ mol TNB/mg of protein)	-0,661	0,106	-0,346	0,448	-0,424	0,343
NO (μ mol/L of serum)	-0,094	0,840	-0,436	0,328	0,772	0,042*
AChE (μ mol/min/mg of protein)	-0,472	0,284	0,364	0,423	-0,463	0,296
BChE (μ mol/min/mg of protein)	0,000	1,000	-0,436	0,328	0,849	0,016*

Correlation using Spearman's analysis of AChE and BChE, TBARS formation, nitric oxide (NO) levels and total thiol content (SH) with muscarinic symptoms, nicotinic symptoms and CNS symptoms in rural workers exposed to pesticides with group depression and group control, values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÃO

No presente estudo observamos que a exposição crônica aos agrotóxicos não aumentou o risco de DM, mas os indivíduos depressivos apresentaram maior tempo de exposição aos agrotóxicos e um aumento dos sintomas decorrentes da síndrome colinérgica e centrais em relação aos não deprimidos. Não observamos diferença na atividade das enzimas colinesterases, AChE e BChE, e dos parâmetros oxidativos entre os sujeitos deprimidos e não deprimidos. Entretanto os indivíduos com depressão maior apresentaram maior tempo de exposição aos agrotóxicos assim como um maior número de sintomas colinérgicos e centrais, provavelmente em decorrência do uso crônico de agrotóxicos.

Estudos realizados na população rural do Rio Grande do Sul apresentaram variações de 38% a 12%^{8,26}, quanto a prevalência de transtornos psiquiátricos em indivíduos expostos a agrotóxicos. Importante salientar que estas populações variam de acordo com o tipo de cultivo e região de plantio. Nosso estudo encontrou resultados similares para indivíduos expostos aos agrotóxicos no cultivo do fumo na região sul, com prevalência de 18% dos indivíduos com algum transtorno psiquiátrico, e destes 7% com episódio de depressão atual.

Alguns estudos também demonstraram não haver alterações na atividade das colinesterases em indivíduos com depressão maior expostos à agrotóxicos^{24,27}. Entretanto, estudos mais recentes demonstraram uma redução da atividade enzimática em indivíduos expostos a agrotóxicos quando comparado com um grupo controle não exposto^{3,4,5,24,47}. Além disso, os parâmetros de estresse oxidativo têm sido associados com a depressão maior bem como com a intoxicação por agrotóxicos^{12,13,15,49,50,51}.

Apesar da prevalência de transtornos psiquiátricos e depressão atual encontrada no nosso estudo serem próxima da população em geral de 8% a 15%^{29,30}, o presente estudo identificou uma associação entre o tempo de exposição em anos e aumento dos sintomas colinérgicos/ centrais nos indivíduos com diagnóstico de depressão atual. Dessa forma

investigamos neste estudo se possíveis alterações na atividade das colinesterases e parâmetros oxidativos poderiam responder pelo aumento dos sintomas da síndrome colinérgica e efeitos centrais nos indivíduos com depressão atual que foram cronicamente expostos aos agrotóxicos. Nossos resultados mostraram uma correlação positiva entre os sintomas centrais, a atividade da BChE e níveis de ON nos indivíduos com depressão atual. Nenhuma correlação foi encontrada entre estas variáveis em pacientes não deprimidos.

Contudo, nosso estudo apresenta limitações importantes como o número de indivíduos avaliados e a ausência de um grupo controle, sem exposição a agrotóxicos para comparação. No entanto, embora os resultados apontem alterações nos efeitos centrais, periféricos e depressão maior em população exposta a agrotóxicos, estudos futuros devem abordar esta população.

ANEXO A

Autor, ano e país	Delineamento e População	Instrumentos	Metodologia	Resultados
Singh, et al, 2012 India	- Estudo transversal. - Com 310 trabalhadores expostos e 395 controles saudáveis.	- Questionário com dados demográficos padrão, habitação, saúde, estilo de vida, doença, informação relacionada com a ocupação tempo de exposição e sintomas relacionados a toxicidade dos agrotóxicos.	- A atividade da AChE foi estimada utilizando acetiltiocolina como substrato, e quantificada a 412 nm usando um espectrofotômetro pelo método de Beckman.	- A atividade da AChE em indivíduos controle variaram de 6,84 a 9,98 UAE / L (média \pm DP, 9,33 \pm 0,52 UAE / L), enquanto que nos trabalhadores variou 2,01-6,45 UAE / L (média \pm D.P., 3,76 \pm 1,06 UAE / L). A diferença observada foi altamente significativa (p <0,001). - A atividade da AChE foi correlacionada com a idade (r = -0,14, P = 0,05) e duração da exposição em trabalhadores (r =-0,36, P <0,05).
Brahmi et al, 2006 Tunisia	- Estudo transversal. - Com 42 pacientes sem qualquer histórico de problemas neurológicos ou doença respiratória com intoxicação aguda por organofosforados.	- Fatores demográficos, características clínicas, taxa respiratória, pressão arterial sistólica, necessidade de ventilação mecânica, e tempo de internação hospitalar.	- A atividade da AChE foi determinada pela reação colorimétrica utilizando ácido acetil hidroxamico com sal férrico.	- A atividade média de AChE na admissão foi de 24,3 F 11,6 Imol / mL por hora a 37 8C; e diminuiu para menos de 27, Imol / mL por hora, a 37 8C. - SCHE (H0) foi reduzida em mais de 39 doentes com um valor médio de F 1.260 2.204 UI / L. Em 3 pacientes, o SCHE era normal na admissão, porque eles consultaram dentro 10 minutos após a intoxicação.

<p>Dhananjayan et al., 2012 India</p>	<p>- Estudo transversal. - Com 28 trabalhadores rurais e 13 trabalhadores no grupo controle que nunca tiveram qualquer exposição a pesticidas.</p>	<p>- Questionário para avaliação ocupacional e estilo de vida.</p>	<p>- Atividade da colinesterase foi determinada pelo método de Ellman modificado - O sangue foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 min a 4 ° C para separar o plasma e depois seguido o método.</p>	<p>- AChE apresentou valores de 1,65 a 3.54µmoles/min/ml em indivíduos expostos e no grupo controle apresentou valores de 2,22 a 3.51µmoles/min/ml. - BChE apresentou valores de 0,16 a 5.2µmoles/min/ml entre indivíduos expostos, e para indivíduos controle foi de 2,19 a 5.06µmoles/min/ml. Os resultados demonstraram redução estatisticamente significativa na atividade das enzimas (AChE 14%; BChE 56%) entre os indivíduos expostos.</p>
<p>Salvi, et al., 2003 Brasil</p>	<p>- Estudo observacional. - A primeira amostra foi de 37 trabalhadores em Dezembro de 2001, expostos a organofosforados. - Segunda avaliação com 25 trabalhadores da amostra inicial em Março de 2002, desligado da exposição durante 3 meses.</p>	<p>- Características demográficas, referentes ao uso de álcool e tabaco e exposição a organofosforados.</p>	<p>- Atividade da acetilcolinesterase foi determinada por utilização de uma técnica colorimétrica descrito por Ellman et al. e Kolf-Clauw et al.</p>	<p>- Este estudo reforça a necessidade de outros parâmetros de atividade da acetilcolinesterase para monitorar consequências de doenças crônicas referentes a exposição a organofosforados. - Sugere que os indivíduos expostos podem adquirir não só consequências psiquiátricas Como também desenvolver sintomas extrapiramidais duradouras.</p>

<p>Pasiani et al., 2012 Brasil</p>	<p>-Estudo transversal. - Com 112 agricultores, 18 residentes e 64 controles.</p>	<p>- Questionário sobre sintomas adversos após a exposição a pesticidas. - Atividade AChE e BChE</p>	<p>- As amostras de sangue foram centrifugadas, hemolisados mantidos congelados (-20 ° C) até ser analisado, método de Ellman modificado.</p>	<p>- Entre 60 agricultores expostos e não-expostos 16,7% tinha esgotamento AChE de mais 30% durante o período de exposição. Seis residentes que viviam nas mesmas fazendas também apresentaram esgotamento. - AChE foi superior a 30% do que a linha de basenível para 19 agricultores (31,7%), indicando um efeito de reinicialização.</p>
<p>Hofmann et al., 2010 Estados Unidos</p>	<p>- Estudo longitudinal - 154 manipuladores de pesticidas agrícolas no período de 2006 a 2007.</p>	<p>- Informações sobre inseticidas utilizados e culturas tratadas, atividades de manuseio, duração e frequência, uso, condição e armazenamento de EPI, práticas de descontaminação, eventos de exposição aguda e treinamento de segurança. - Informações sobre os sintomas que podem estar relacionados a exposição a organofosforados e fatores de risco. - Características demográficas. - Inibição BChE.</p>	<p>- A atividade da BuChE foi medida utilizando se o método de Ellman.</p>	<p>- Os manipuladores de pesticidas agrícolas expostas a inseticidas apresentaram inibição da BChE. - O artigo sugere que deveria ser modificado as práticas de trabalho para se reduzir a inibição BChE.</p>



QUEST _ _ _

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Responsável pelo projeto: Prof^ª Dr^ª Gabriele Cordenonzi Ghisleni
Telefone para contato: (53) 81350787 (Gabriele) e/ou (53) 21288031

Projeto: Investigação do papel do sistema colinérgico na depressão e risco de suicídio em uma população rural de Canguçu/RS exposta ao uso de agrotóxico.

Informações sobre o estudo ao participante:

Esta folha informativa tem o objetivo de fornecer a informação suficiente para quem considerar participar neste estudo. Ela não elimina a necessidade do pesquisador de explicar, e se necessário, ampliar as informações nela contidas.

Antes de participar deste estudo, gostaríamos que você tomasse conhecimento do que ele envolve. Damos abaixo alguns esclarecimentos sobre dúvidas que você possa ter.

Qual é o objetivo da pesquisa?

Com este estudo buscamos identificar a influência dos agrotóxicos na prevalência de depressão e risco de suicídio na população rural de Canguçu/RS e verificar o possível mecanismo de ação destes pesticidas na ocorrência da doença avaliando a atividade enzimática e perfil oxidativo em amostras de sangue periférico. A coleta de sangue será feita para análise de marcadores bioquímicos sanguíneos para verificar possível alteração devido à contaminação por agrotóxicos e desta forma predispondo aos transtornos de humor.

Como o estudo será realizado?

Será realizada a aplicação de um questionário breve e do Instrumento M.I.N.I para diagnóstico. Após a aplicação destes será efetuada uma coleta de sangue do seu braço, na qual será retirado 10 ml de sangue, o que não compromete a sua saúde. Esta coleta será realizada por pesquisadores da área da saúde devidamente treinados para tal função.

Quais são os riscos em participar?

Os riscos da coleta são mal-estar passageiro ou mancha roxa no local. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde.

Itens importantes:

Você tem a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento, sem fornecer um motivo, assim como pedir maiores informações sobre o estudo e o procedimento a ser feito.

O que eu ganho com este estudo?

Sua colaboração neste estudo pode ajudar a aumentar o conhecimento científico sobre fatores relacionados à contaminação por agrotóxicos e sua relação com a depressão, que poderão eventualmente beneficiar você e outras pessoas. Neste estudo será realizado o diagnóstico de depressão e risco de suicídio uma vez que estes têm uma alta prevalência na população de Canguçu, e se diagnosticado você será orientado a buscar atendimento psicológico e tratamento pelo SUS no Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do município. Além disso, o desenvolvimento deste projeto trará benefícios à população de Canguçu após a divulgação dos resultados, onde buscaremos desenvolver junto ao CEREST (Centro de Referência em Saúde do Trabalhador) um trabalho de prevenção e manuseio de pesticidas.

Quais são os meus direitos?

Os resultados deste estudo poderão ser publicados em jornais científicos ou submetidos à autoridade de saúde competente, mas você não será identificado por nome. Sua participação neste estudo é voluntária.

DECLARAÇÃO:

Eu, _____ declaro que:

1. Concordo total e voluntariamente em fazer parte deste estudo.
2. Recebi uma explicação completa do objetivo do estudo, dos procedimentos envolvidos e o que se espera de mim. O pesquisador me explicou os possíveis problemas que podem surgir em consequência da minha participação neste estudo.

3. Informe o pesquisador sobre medicamentos que estou tomando.
4. Concordo em cooperar inteiramente com o pesquisador supervisor.
5. Estou ciente de que tenho total liberdade de desistir do estudo a qualquer momento e que esta desistência não irá, de forma alguma, afetar meu tratamento ou administração médica futura.
6. Estou ciente de que a informação nos meus registros médicos é essencial para a avaliação dos resultados do estudo. Concordo em liberar esta informação sob o entendimento de que ela será tratada confidencialmente.
7. Estou ciente de que não serei referido por nome em qualquer relatório relacionado a este estudo. Da minha parte, não devo restringir, de forma alguma, os resultados que possam surgir neste estudo.

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura do Pesquisador: _____ Data: ____ / ____ / _____

ANEXO C



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação do papel do sistema colinérgico na depressão e risco de suicídio em uma população rural de Canguçu/RS exposta ao uso de agrotóxico.

Pesquisador: GABRIELE CORDENONZI GHISLENI

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06464812.2.0000.5339

Instituição Proponente: SOCIEDADE PELOTENSE DE ASSISTENCIA E CULTURA (SPAC)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 152.198

Data da Relatoria: 22/11/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de delineamento transversal com a população da zona rural e urbana da cidade de Canguçu, na faixa etária de 18 a 60 anos de idade.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar a relação entre o uso de agrotóxicos com depressão e risco de suicídio, bem como avaliar o envolvimento de marcadores bioquímicos na vulnerabilidade à depressão em uma amostra populacional da zona rural da cidade de Canguçu, RS.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco mínimo: Os riscos da coleta são mal-estar passageiro ou mancha roxa no local. O procedimento será feito com material esterilizado e descartável por profissionais da área de saúde.

Benefícios: Os pacientes com diagnóstico de depressão ou risco de suicídio serão encaminhados para atendimento psicológico e tratamento pelo SUS no Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do município.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem elaborado. Trata-se de emenda ao projeto inicial, para apreciação da alteração da população estudada, que irá incluir indivíduos de ambos os gêneros, na faixa etária entre 18 a 60 anos. Alterações na seleção da amostra foram realizadas para se adequar às regiões mais populosas e que realizam agricultura familiar segundo dados do IBGE e EMATER, contemplando o 1º e 2º Distritos da zona rural de Canguçu. Os critérios de inclusão foram

Endereço: Rua Felix da Cunha, 412

Bairro: Centro

CEP: 96.010-000

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)2128-8012

Fax: (53)2128-8298

E-mail: cep@ucpel.tche.br



modificados para que todos os indivíduos da zona rural que forem expostos aos agrotóxicos independente do cultivo possam participar, bem como todos os indivíduos da zona urbana que não estão expostos aos agrotóxicos. Foi adicionado ao projeto ainda, uma escala denominada Inventário de sintomas de estresse para adultos (ISSL) para avaliação da sintomatologia do estresse em adultos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. O projeto está orçado em R\$ 25.958,00, e está descrito que o financiamento é próprio.

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As modificações não alteram a situação de aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PELOTAS, 23 de Novembro de 2012

Assinador por:
Sandro Schreiber de Oliveira
(Coordenador)

ANEXO D

QUESTIONÁRIO SÓCIO-DEMOGRÁFICO

Sou aluno(a) da UCPel e estamos desenvolvendo uma pesquisa com objetivo de avaliar o bem estar e os cuidados com a saúde dos trabalhadores da cidade e do campo. Faremos uma entrevista para coletar algumas informações pessoais para fazer uma orientação e buscar junto ao CEREST (Centro de Referência a Saúde do Trabalhador) a melhor forma de melhorar a saúde dos trabalhadores nessa região. Os trabalhadores em geral sofrem de cansaço excessivo por muitas horas de trabalho e dificuldades sociais que podem acarretar problemas para a saúde.

Além disso, vamos fazer uma coleta de sangue para verificar substâncias que podem estar associadas com uma piora da sua saúde, como por exemplo, o cansaço, problemas de sono, dores; pensando que estas alterações no comportamento ou rotina podem estar associadas a mudanças nestas substâncias. Lembrando que estas análises não vão ser de utilidade para o seu médico, mas para a pesquisa.

O seu nome não será divulgado e nem utilizado. Tudo que você responder ficará em sigilo.

3. Estado civil: (1) solteiro (2) casado (3) divorciado (4) viúvo

etnia __

4. Qual a escolaridade do chefe da família?

estciv __

(0) nenhuma ou até 3º série (primário incompleto)

escch __

(1) 4ª série (primário completo) ou 1º grau (ginasial) incompleto

(2) 1º grau (ginasial) completo ou 2º grau (colegial) incompleto

(3) 2º grau (colegial) completo ou nível superior incompleto

(4) nível superior completo

5. Quantas peças são utilizadas como dormitórios nesta casa? __ __ peças

6. Quantos banheiros existem na casa? (*Considere somente os que têm vaso* dorm __ __

mais chuveiro ou banheira). __ __ banheiros (00) Caso não tenha banheiro nbanho __ __

Neste domicílio têm, e se têm: Quantos?

7. Televisão: (0) (1) (2) (3 ou +)

8. Automóvel (de uso particular): (0) (1) (2 ou +)

ntv __

Neste domicílio têm:

nauto __

9. Rádio: (0) não (1) sim

10. Geladeira ou freezer: (0) não (1) sim radio __

11. Videocassete ou DVD: (0) não (1) sim gelad __

12. Máquina de lavar roupa (não considerar o tanquinho): (0) não (1) sim vídeo __

13. Forno de micro-ondas: (0) não (1) sim lavar __

14. Telefone fixo (não considerar celular): (0) não (1) sim microond __

15. Microcomputador: (0) não (1) sim telfix __
16. Aparelho de ar condicionado: (0) não (1) sim microc __
arcond __
17. Qual seu principal cultivo hoje em dia: (1) Plantio de fumo (2) Outros princult __
18. Qual sua jornada de trabalho por dia: __ __ horas htrab __ __
19. Você utiliza agrotóxicos nas plantações: (0) Não (1) Sim usapest __
Se sim, quais? _____ quaispest __ __
20. Qual a frequência de aplicação do agrotóxico durante o ano: __ __ vez por dia ndia __ __
__ __ vezes por nsem __ __
semana
21. Desde quanto tempo você utiliza agrotóxico: __ __ meses tempom __ __
__ __ anos tempoa __ __
22. No momento você está aplicando agrotóxicos na plantação? aplicagrot __
(0) Não (1) Sim (*pular para a questão 23*) agdia __ __
23. Qual foi a última vez que esteve em contato com agrotóxicos? agme __ __
__ __ dias __ __ meses __ __ anos agano __ __
24. Você utiliza os equipamentos de proteção individual: (0) Não (1) Sim usaeq __
25. Você fuma? (0) Não (*pular para a questão 26*) (1) Sim fuma __
26. Se sim, há quanto tempo? __ __ meses tfumam __ __
__ __ anos tfumaa __ __
27. Você possui alguma doença clínica? doencli __
(0) Não (1) Diabetes (2) Hipertensão (3) Doença arterial coronariana
(4) Problemas de tireóide (5) Alergias (6) Problema dos Nervos (7) Outra
usamed __
28. Você utiliza algum medicamento? (0) Não (1) Sim
Se responder sim, diga qual (ais) e a dosagem:
Med 1: _____ Dos/dia: __ __ __ mg med1 __ __ dos1 __ __
Med 2: _____ Dos/dia: __ __ __ mg med2 __ __ dos2 __ __
Med 3: _____ Dos/dia: __ __ __ mg med3 __ __ dos3 __ __
Med 4: _____ Dos/dia: __ __ __ mg
Med 5: _____ Dos/dia: __ __ __ mg

29. Alguém da sua família apresenta problema dos nervos:

(0) Não (1) Sim. Quem? _____

med4__ dos4 __

med5__ dos5 __

30. Caso respondeu sim na questão anterior, algum deste familiar mora com você?

(0) Não (1) Sim. Quem: _____

probnergv __

probquem__ __

31. Nas últimas duas semanas você apresentou algum destes sintomas abaixo:

Falta de apetite	(0) Não	(1) Sim	morafami__
Náuseas	(0) Não	(1) Sim	moraque__ __
Vômitos	(0) Não	(1) Sim	
Cólicas abdominais	(0) Não	(1) Sim	sindcolin1 __
Diarréia	(0) Não	(1) Sim	sindcolin2 __
Dificuldade respiratória	(0) Não	(1) Sim	sindcolin3 __
Salivação	(0) Não	(1) Sim	sindcolin4 __
Sudorese	(0) Não	(1) Sim	sindcolin5 __
Tremores	(0) Não	(1) Sim	sindcolin6 __
Câimbras	(0) Não	(1) Sim	sindcolin7 __
Fraqueza	(0) Não	(1) Sim	sindcolin8 __
Paralisia muscular	(0) Não	(1) Sim	sindcolin9 __
Taquicardia	(0) Não	(1) Sim	sindcolin10 __
Pupila dilatada	(0) Não	(1) Sim	sindcolin11 __
Dor de cabeça	(0) Não	(1) Sim	sindcolin12 __
Sonolência	(0) Não	(1) Sim	sindcolin13 __
Confusão mental	(0) Não	(1) Sim	sindcolin14 __
Convulsões	(0) Não	(1) Sim	sindcolin15 __
Coma	(0) Não	(1) Sim	sindcolin16 __

sindcolin17 __

32. Caso respondeu sim na questão anterior, apresentou algum dos sintomas acima:

- (0) Em outro período qualquer
 (1) Durante a aplicação dos agrotóxicos na plantação
 (2) Durante o período de colheita

sindcolin18 __

sindcolin19 __

sintom __

A PARTIR DAQUI GOSTARÍAMOS QUE VOCÊ RESPONDESSE SOZINHO.

→ Neste momento, você tem experimentado algum destes sinais/sintomas nas últimas 24 horas?

Por favor, não preencha esta coluna.

34. Mãos e pés frios	(0) não	(1) sim	
35. Boca seca	(0) não	(1) sim	
36. Nó no estômago	(0) não	(1) sim	iss11 __
37. Aumento de sudorese (muito suor, suadeira)	(0) não	(1) sim	iss12 __
38. Tensão muscular	(0) não	(1) sim	iss13 __
39. Aperto da mandíbula/ranger os dentes	(0) não	(1) sim	iss14 __
40. Diarreia passageira	(0) não	(1) sim	iss15 __
41. Insônia (dificuldade para dormir)	(0) não	(1) sim	iss16 __
42. Taquicardia (batedeira no peito)	(0) não	(1) sim	iss17 __
43. Hiperventilação (respirar ofegante, rápido)	(0) não	(1) sim	iss18 __
44. Hipertensão arterial súbita e passageira (pressão alta)	(0) não	(1) sim	iss19 __
45. Mudança de apetite	(0) não	(1) sim	iss110 __
46. Aumento súbito de motivação	(0) não	(1) sim	iss111 __
47. Entusiasmo súbito	(0) não	(1) sim	iss112 __
48. Vontade súbita de iniciar novos projetos	(0) não	(1) sim	iss113 __
		TOTAL A	iss114 __
			iss115 __

→ E na última semana, você tem experimentado algum destes sinais/sintomas?

49. Problemas com a memória		(0) não	iss116 __
(1) sim			iss117 __
50. Mal-estar generalizado, sem causa específica		(0) não	iss118 __

(1) sim			iss119 __
51. Formigamento das extremidades	(0) não		iss120 __
(1) sim			iss121 __
52. Sensação de desgaste físico constante	(0) não		iss122 __
(1) sim			iss123 __
53. Mudança de apetite	(0) não		iss124 __
(1) sim			iss125 __
54. Aparecimento de problemas dermatológicos (na pele)	(0) não	(1) sim	iss126 __
55. Hipertensão arterial (pressão alta)	(0) não		iss127 __
(1) sim			iss128 __
56. Cansaço constante	(0) não		iss129 __
(1) sim			iss130 __
57. Aparecimento de úlcera	(0) não		
(1) sim			
58. Tontura/sensação de estar flutuando	(0) não		
(1) sim			
59. Sensibilidade emotiva excessiva (estar muito nervoso)	(0) não	(1) sim	iss131 __
60. Dúvida quanto a si próprio	(0) não		iss132 __
(1) sim			iss133 __
61. Pensar constantemente em um só assunto	(0) não		iss134 __
(1) sim			iss135 __
62. Irritabilidade excessiva	(0) não		iss136 __
(1) sim			iss137 __
63. Diminuição da libido (sem vontade de sexo)	(0) não		iss138 __
(1) sim			iss139 __
		TOTAL B	iss140 __
→ Agora gostaríamos de saber se você tem experimentado algum destes sinais/sintomas no <u>último mês</u>.			iss141 __
			iss142 __
64. Diarreia frequente	(0) não	(1) sim	iss143 __
65. Dificuldades sexuais	(0) não	(1) sim	iss144 __
66. Insônia (dificuldade para dormir)	(0) não		iss145 __
(1) sim			iss146 __
67. Náuseas	(0) não	(1) sim	iss147 __

68. Tiques	(0) não	(1) sim	iss148 __
69. Hipertensão arterial continuada (pressão alta)	(0) não	(1) sim	iss149 __
70. Problemas dermatológicos prolongados (problemas de pele)	(0) não		iss150 __
(1) sim			iss51 __
71. Mudança extrema de apetite	(0) não		iss152 __
(1) sim			iss153 __
72. Excesso de gases	(0) não	(1) sim	
73. Tontura frequente	(0) não	(1) sim	
74. Úlcera	(0) não	(1) sim	
75. Enfarte	(0) não	(1) sim	
76. Impossibilidade de trabalhar	(0) não	(1) sim	
77. Pesadelos	(0) não	(1) sim	
78. Sensação de incompetência em todas as áreas	(0) não	(1) sim	
79. Vontade de fugir de tudo	(0) não	(1) sim	
80. Apatia, depressão ou raiva prolongada	(0) não	(1) sim	
81. Cansaço excessivo	(0) não		
(1) sim			
82. Pensar/falar constantemente em um só assunto	(0) não	(1) sim	
83. Irritabilidade sem causa aparente	(0) não	(1) sim	
84. Angústia/ansiedade diária	(0) não		
(1) sim			bdi1 __
85. Hipersensibilidade emotiva	(0) não		
(1) sim			
86. Perda do senso de humor	(0) não	(1) sim	
			bdi2 __
			TOTAL C __ __

Some os pontos da questão 34 a 48 → TOTAL A = ___ pontos → Se o resultado obtido no TOTAL A for igual ou superior a seis isso é um indicativo de estado de alerta para o estresse.

Some os pontos da questão 49 a 63 → TOTAL B = ___ pontos → Se o resultado obtido no TOTAL B for igual ou superior a três isso é um indicativo de estado de resistência ao estresse.

Some os pontos da questão 64 a 86 → TOTAL C = ___ pontos → Se o resultado obtido no TOTAL C for igual ou superior a oito isso é um indicativo de estado de exaustão de estresse.

Caso você pontue algum indicativo de estresse e considere necessário, procure o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador.

descreve melhor a maneira que voce tem se sentido na ultima semana,

incluindo hoje. Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer a sua escolha.

87. (0) Não me sinto triste. bdi5 __
(1) Eu me sinto triste.
(2) Estou triste e não consigo sair disto.
(3) Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar.
88. (0) Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro. bdi6 __
(1) Eu me sinto desanimado quanto ao futuro.
(2) Acho que nada tenho a esperar.
(3) Acho o futuro sem esperança e tenho impressão de que as coisas não podem melhorar.
89. (0) Não me sinto um fracasso. bdi7 __
(1) Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum.
(2) Quando olho para trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos.
(3) Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso.
90. (0) Tenho tanto prazer em tudo como antes. bdi8 __
(1) Não sinto mais prazer nas coisas como antes.
(2) Não encontro um prazer real em mais nada.
(3) Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo.
91. (0) Não me sinto especialmente culpado. bdi9 __
(1) Eu me sinto culpado grande parte do tempo.
(2) Eu me sinto culpado na maior parte do tempo.
(3) Eu me sinto sempre culpado.
92. (0) Não acho que esteja sendo punido. bdi10 __
(1) Acho que posso ser punido.
(2) Creio que vou ser punido.
(3) Acho que estou sendo punido.
93. (0) Não me sinto decepcionado comigo. bdi11 __
(1) Estou decepcionado comigo mesmo.
(2) Estou enojado de mim.
(3) Eu me odeio.
94. (0) Não me sinto de qualquer modo pior que os outros. bdi12 __
(1) Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros.
(2) Eu me culpo sempre por minhas falhas.

- (3) Eu me culpo por tudo de mal que acontece.
95. (0) Não tenho quaisquer ideias de me matar.
(1) Tenho ideias de me matar, mas não as executaria. bdi13 __
(2) Gostaria de me matar.
(3) Eu me mataria se tivesse oportunidade.
96. (0) Não choro mais que o habitual.
(1) Choro mais agora do que costumava. bdi14 __
(2) Agora, choro o tempo todo.
(3) Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queira.
97. (0) Não sou mais irritado agora do que já fui.
(1) Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava.
(2) Agora, me sinto irritado o tempo todo. bdi15 __
(3) Não me irrita mais por coisas que costumavam me irritar.
98. (0) Não perdi o interesse pelas outras pessoas.
(1) Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar. bdi16 __
(2) Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas.
(3) Perdi todo o interesse pelas outras pessoas.
99. (0) Tomo decisões tão bem quanto antes.
(1) Adio as tomadas de decisões mais do que costumava. bdi17 __
(2) Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes.
(3) Absolutamente não consigo mais tomar decisões.
100. (0) Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes.
(1) Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo. bdi18 __
(2) Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo.
(3) Acredito que pareço feio.
101. (0) Posso trabalhar tão bem quanto antes. bdi19 __
(1) É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa.
(2) Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa.
(3) Não consigo mais fazer qualquer trabalho.
102. (0) Consigo dormir tão bem como o habitual.
(1) Não durmo tão bem como costumava.
(2) Acordo 1 a 2 horas mais cedo que o habitualmente e acho difícil voltar a dormir. bdi20 __

- (3) Acordo várias horas mais cedo que costumava e não consigo voltar a dormir.
103. (0) Não fico mais cansado que o habitual.
 (1) Fico cansado mais facilmente do que costumava.
 (2) Fico cansado em fazer qualquer coisa.
 (3) Estou cansado demais para fazer qualquer coisa.
104. (0) O meu apetite não está pior do que o habitual.
 (1) Meu apetite não é tão bom como costumava ser.
 (2) Meu apetite é muito pior agora.
 (3) Absolutamente não tenho mais apetite.
105. (0) Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente.
 (1) Perdi mais do que 2 quilos e meio.
 (2) Perdi mais do que 5 quilos.
 (3) Perdi mais do que 7 quilos.
 Eu estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: () Sim () Não
106. (0) Não estou mais preocupado com minha saúde do que o habitual.
 (1) Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação.
 (2) Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa.
 (3) Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa.
107. (0) Não notei qualquer mudança no meu interesse por sexo.
 (1) Estou menos interessado por sexo do que costumava.
 (2) Estou muito menos interessado por sexo agora.
 (3) Perdi completamente o interesse por sexo.

bdi21 __

Some os pontos da questão 87 a 107 → TOTAL = __ __ pontos
Atenção: não some os pontos da questão 105 caso esteja perdendo peso de propósito.

Se o resultado obtido for igual ou superior a treze isso é um indicativo de que você pode estar passando por um episódio de depressão.

Caso você considere necessário, o Ambulatório de Pesquisa e Extensão em Saúde Mental da UCPel oferece psicoterapia individual para depressão. Para mais informações entre em contato com Karen Jansen: (53) 81186112.

POR FAVOR, AGORA PASSE O QUESTIONÁRIO PARA O PESQUISADOR.

Anexo: Módulo *Episódio Depressivo Maior* da versão brasileira do MINI 5.0. (DSM-IV)*

↓: IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR NÃO EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

A. EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR

A1	Nas duas últimas semanas, sentiu-se triste, desanimado(a), deprimido(a), durante a maior parte do dia, quase todos os dias?	NÃO	SIM	1				
A2	Nas duas últimas semanas, teve, quase todo tempo, o sentimento de não ter mais gosto por nada, de ter perdido o interesse e o prazer pelas coisas que lhe agradam habitualmente?	NÃO	SIM	2				
	A1 OU A2 SÃO COTADAS SIM ?	NÃO	SIM					
A3	Durante as duas últimas semanas, quando se sentia deprimido(a) / sem interesse pela maioria das coisas:							
a	O seu apetite mudou de forma significativa, <u>ou</u> o seu peso aumentou ou diminuiu sem que o tenha desejado ? (variação de $\pm 5\%$ ao longo do mês, isto é, $\pm 3,5$ Kg, para uma pessoa de 65 Kg) COTAR SIM, SE RESPOSTA SIM NUM CASO OU NO OUTRO	NÃO	SIM	3				
b	Teve problemas de sono quase todas as noites (dificuldade em pegar no sono, acordar no meio da noite ou muito cedo, dormir demais)?	NÃO	SIM	4				
c	Falou ou movimentou-se mais lentamente que de costume ou pelo contrário, sentiu-se agitado(a) e incapaz de ficar sentado quieto, quase todos os dias?	NÃO	SIM	5				
d	Sentiu-se a maior parte do tempo cansado(a), sem energia, quase todos os dias?	NÃO	SIM	6				
e	Sentiu-se sem valor ou culpado(a), quase todos os dias?	NÃO	SIM	7				
f	Teve dificuldade para concentrar-se ou tomar decisões, quase todos os dias?	NÃO	SIM	8				
g	Teve, por várias vezes, pensamentos ruins como, por exemplo, pensar que seria melhor estar morto(a) ou pensar em fazer mal a si mesmo(a)?	NÃO	SIM	9				
A4	HÁ PELO MENOS 3 RESPOSTAS «SIM» EM A3? (ou 4 se A1 OU A2 = “NÃO”)	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>NÃO</td> <td>SIM</td> </tr> <tr> <td colspan="2">EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL</td> </tr> </tbody> </table>			NÃO	SIM	EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL	
NÃO	SIM							
EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL								
	SE O(A) ENTREVISTADO(A) APRESENTA UM EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR ATUAL :							
A5a	Ao longo da sua vida, teve outros períodos de 2 semanas ou mais, em que se sentiu deprimido (a) ou sem interesse pela maioria das coisas e durante os quais teve os problemas dos quais falamos [SINTOMAS EXPLORADOS DE A3a à A3g]?	↓	NÃO	SIM	10			
b	Desta vez, antes de se sentir deprimido(a) e/ou sem interesse pela maioria das coisas, sentia-se bem desde há pelo menos dois meses?	NÃO	SIM	11				
	A5b É COTADA SIM ?	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>NÃO</td> <td>SIM</td> </tr> <tr> <td colspan="2">EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR PASSADO</td> </tr> </tbody> </table>			NÃO	SIM	EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR PASSADO	
NÃO	SIM							
EPISÓDIO DEPRESSIVO MAIOR PASSADO								

→ IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR NÃO EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

C. RISCO DE SUICÍDIO

Durante o último mês:

C1	Pensou que seria melhor estar morto (a) ou desejou estar morto (a) ?	NÃO	SIM	1
C2	Quis fazer mal a si mesmo (a) ?	NÃO	SIM	2
C3	Pensou em suicidar-se ?	NÃO	SIM	3
C4	Pensou numa maneira de se suicidar ?	NÃO	SIM	4
C5	Tentou o suicídio ?	NÃO	SIM	5

Ao longo da sua vida:

C6	Já fez alguma tentativa de suicídio ?	NÃO	SIM	6
----	---------------------------------------	-----	-----	---

HÁ PELO MENOS UM "SIM" DE C1 À C6 ?

SE SIM, ESPECIFICAR O NÍVEL DO RISCO DE SUICÍDIO:

- C1 ou C2 ou C6 = SIM : LEVE
 C3 ou (C2 + C6) = SIM : MODERADO
 C4 ou C5 OU (C3 + C6) = SIM : ELEVADO

NÃO	SIM
<i>RISCO DE SUICÍDIO ATUAL</i>	
LEVE	<input type="checkbox"/>
MODERADO	<input type="checkbox"/>
ELEVADO	<input type="checkbox"/>

→ IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR NÃO EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

J. DEPENDÊNCIA / ABUSO DE ÁLCOOL

J1	Nos últimos 12 meses, por mais de três vezes você bebeu, em menos de três horas, mais do que cinco latas de cerveja ou uma garrafa de vinho ou três doses de uma bebida alcoólica forte (pinga, caipirinha, conhaque, vodka, whisky...)?	→ NÃO	SIM	1
J2	Durante os últimos 12 meses:			
a	Constatou que precisava de quantidades cada vez maiores de álcool para obter o mesmo efeito?	NÃO	SIM	2
b	Quando bebia menos, as suas mãos tremiam, transpirava ou sentia-se agitado (a)? Alguma vez bebeu uma dose para evitar esses problemas ou evitar uma ressaca? COTAR "SIM", SE RESPOSTA "SIM" NUM CASO OU NO OUTRO	NÃO	SIM	3
c	Quando começava a beber, com frequência bebia mais do que pretendia?	NÃO	SIM	4
d	Tentou, mas não conseguiu diminuir seu consumo de álcool ou parar de beber?	NÃO	SIM	5
e	Nos dias em que bebia, passava muito tempo procurando bebida, bebendo ou se recuperando dos efeitos do álcool?	NÃO	SIM	6
f	Reduziu suas atividades (lazer, trabalho, cotidianas) ou passou menos tempo com os outros por causa da bebida?	NÃO	SIM	7
g	Continuou a beber mesmo sabendo que isso lhe causava problemas de saúde ou problemas psicológicos?	NÃO	SIM	8

HÁ PELO MENOS 3 RESPOSTAS "SIM" EM J2 ?

NÃO	SIM
DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL ATUAL	

O(A) ENTREVISTADO(A) APRESENTA UMA DEPENDÊNCIA DE ÁLCOOL ?

→
NÃO SIM

J3 **Durante os últimos 12 meses:**

a	Ficou embriagado ou de "ressaca" várias vezes, quando tinha coisas para fazer no trabalho (/ na escola) ou em casa? Isso lhe causou problemas? COTAR "SIM" SOMENTE SE A EMBRIAGUEZ / RESSACA CAUSOU PROBLEMAS	NÃO	SIM	9
---	--	-----	-----	---

➔ IR DIRETAMENTE AO(S) QUADRO(S) DIAGNÓSTICO(S), ASSINALAR NÃO EM CADA UM E PASSAR AO MÓDULO SEGUINTE

O. TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA

O1	a	Durante os últimos 6 meses, sentiu-se excessivamente preocupado (a), inquieto (a), ansioso (a) com relação a vários problemas da vida cotidiana (trabalho / escola, casa, familiares / amigos), ou teve a impressão ou lhe disseram que se preocupava demais com tudo ?	➔ NÃO	SIM	1
NÃO COTAR SIM SE A ANSIEDADE DESCRITA CORRESPONDE A UM TIPO DE ANSIEDADE JÁ EXPLORADA, COMO MEDO DE TER UM ATAQUE DE PÂNICO (TRANSTORNO DE PÂNICO), DE SER HUMILHADO EM PÚBLICO (FOBIA SOCIAL), DE SER CONTAMINADO (TOC), DE GANHAR PESO (ANOREXIA NERVOSA)...					
	b	Teve essas preocupações quase todos os dias?	➔ NÃO	SIM	2
O2		Tem dificuldade em controlar essas preocupações (/ essa ansiedade) ou ela (s) o(a) impede(m) de se concentrar no que tem que fazer?	➔ NÃO	SIM	3
DE O3 A O3f COTAR “NÃO” OS SINTOMAS QUE OCORREM APENAS NO QUADRO DOS TRANSTORNOS EXPLORADOS ANTERIORMENTE					
O3		Nos últimos seis meses, quando se sentia particularmente preocupado(a), inquieto(a), ansioso(a), freqüentemente:			
	a	Sentia -se agitado(a), tenso(a), com os nervos à flor da pele?	NÃO	SIM	4
	b	Tinha os músculos tensos?	NÃO	SIM	5
	c	Sentia-se cansado (a), fraco(a) ou facilmente exausto(a)?	NÃO	SIM	6
	d	Tinha dificuldade em concentrar-se ou ter esquecimentos / “dar branco” ?	NÃO	SIM	7
	e	Ficava particularmente irritável ?	NÃO	SIM	8
	f	Tinha problemas de sono (dificuldade em pegar no sono, acordar no meio da noite ou muito cedo, dormir demais)?	NÃO	SIM	9
HÁ PELO MENOS 3 RESPOSTAS “SIM” EM O3 ?			<p>NÃO SIM</p> <p>TRANSTORNO DE ANSIEDADE GENERALIZADA ATUAL</p>		

MUITO OBRIGADA PELA SUA CONTRIBUIÇÃO!