

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA  
COMUNICAÇÃO HUMANA - PPGDCH**

**ASPECTOS ULTRA – ESTRUTURAIIS DE CÓCLEAS  
DE COBAIAS EXPOSTAS A AGROTÓXICO E  
GINKGO BILOBA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Andréa Dulor Finckler**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2010**

# **ASPECTOS ULTRA – ESTRUTURAIS DE CÓCLEAS DE COBAIAS EXPOSTAS A AGROTÓXICO E GINKGO BILOBA**

**por**

**Andréa Dulor Finckler**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audiologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**.

**Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira**

Santa Maria, RS, Brasil

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação – CIP

F499a Finckler, Andréa Dulor.

Aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba / Andréa Dulor Finckler. – 2010.  
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audiologia, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira.

1. Otologia. 2. Ototoxicidade. 3. Otoproteção. 4. Agrotóxico. 5. Ginkgo biloba. 6. Medicamento. I. Silveira, Aron Ferreira da. II. Título.

CDU: 616.28

Ficha catalográfica elaborada por

Heloisa Helena Nagel – CRB 10/981

---

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Andréa Dulor Finckler. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser efetuada com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Sport Club São José, 75/605, Porto Alegre, RS, 91030510.

Endereço Eletrônico: [andrea\\_finkler@hotmail.com](mailto:andrea_finkler@hotmail.com)

---

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ASPECTOS ULTRA – ESTRUTURAIS DE CÓCLEAS DE COBAIAS  
EXPOSTAS A AGROTÓXICO E GINKGO BILOBA**

elaborada por  
**Andréa Dulor Finkler**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira.**  
**(Presidente/Orientador)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Garcia Rossi (UFSM)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Fighera Bortholuzzi (UFSM)**

Santa Maria, 20 de julho de 2010.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, José Carlos e Maria Helena, que durante esses anos vem me dando suporte, propiciando-me através de carinho, amor, orientação e incentivo, seguir em frente, superando os obstáculos da vida.*

*A vocês minha admiração e amor eterno!*

*À minha tia, Sonia, pela companhia e cuidados e principalmente por fazer parte de minha vida.*

*Ao Nagel, meu esposo, pelo apoio incondicional, amor, compreensão e paciência durante toda a realização deste trabalho.*

*Dedico a vocês este trabalho!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira**, professor titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria, pela amizade e pela oportunidade de novos conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito**, professor doutor do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela ajuda na parte experimental e na correção deste trabalho, colaborando para seu enriquecimento.

À **Maria Rossato**, técnica do Laboratório de Microdissecção do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo carinho, apoio e dedicação durante toda a minha estada em Ribeirão Preto. Muito Obrigada!

À **equipe do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental** do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por colocar à disposição o biotério, a área experimental e o laboratório.

À **equipe do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por colocar à disposição o microscópio eletrônico de varredura e o laboratório.

Aos **Colegas** do Mestrado da UFSM, e aos meus **Amigos**, pela parceria e pelo incentivo.

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP e à Universidade Federal de Santa Maria**, pela oportunidade da realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!!!!**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Curso de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### ASPECTOS ULTRA – ESTRUTURAIS DE CÓCLEAS DE COBAIAS EXPOSTAS A AGROTÓXICO E GINKGO BILOBA

AUTORA: ANDRÉA DULOR FINCKLER  
ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA  
Local e Data: Santa Maria, 20 de julho de 2010

O Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos e sua maior utilização se dá na agricultura, especialmente na monocultura, em grandes extensões. Pesquisas demonstram que os agentes ototóxicos, além de comprometer os sistemas auditivo e vestibular periféricos, provocam ainda alterações nas vias auditivas centrais. O objetivo deste estudo foi verificar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície. Trata-se de um estudo experimental prospectivo, realizado em cobaias albinas, cujo critério de inclusão foi a presença de OEAPD. A amostra foi dividida em cinco grupos, nos quais se administrou soro fisiológico 0,9% (grupo 1 - controle), agrotóxico - 0,3mg/Kg/dia (grupo 2), Ginkgo biloba - 100mg/kg/dia, 90 minutos após, agrotóxico 0,3 mg/Kg/dia (grupo 3), agrotóxico – 3 mg/Kg/dia (grupo 4) e Ginkgo biloba - 100mg/kg/dia, 90 minutos após, agrotóxico 3,0 mg/Kg/dia (grupo 5) durante sete dias consecutivos. O agrotóxico utilizado foi o metamidofós da Fersol®. A avaliação anatômica foi realizada com Microscopia Eletrônica de Varredura. As cobaias submetidas ao agrotóxico apresentaram alterações morfológicas cocleares, com lesões nas três espiras analisadas na microscopia eletrônica, intensificadas de acordo com a dosagem recebida do agente. As cobaias tratadas com agrotóxico e Ginkgo biloba, apresentaram uma manutenção da arquitetura ciliar nas células ciliadas externas em todas as espiras da cóclea, enquanto que nos grupo tratado somente com agrotóxico, houve desaparecimento dos cílios das células ciliadas externas e distorção na arquitetura dos cílios remanescentes à ME. Concluímos que quanto maior a exposição ao agrotóxico maior o dano nas CCE da cóclea de cobaias albinas, enquanto que aquelas que recebem previamente o ginkgo biloba mantêm a citoarquitetura das CCE preservadas.

**Palavras-chave:** ototoxicidade, agrotóxico, otoproteção, ginkgo biloba.

## ABSTRACT

Master's Degree Dissertation  
Post-Graduation Program in Human Communication Disorders  
Universidade Federal de Santa Maria

### ULTRASTRUCTURAL ASPECTS IN THE GUINEA PIG INNER EAR EXPOSED TO PESTICIDE AND GINKGO BILOBA.

AUTHOR: ANDRÉA DULOR FINCKLER  
ADVISER: ARON FERREIRA DA SILVEIRA  
Local and Date of the Defense: Santa Maria, 20 de July de 2010

Brazil is among the world's largest consumers of pesticides and their increased use is given in agriculture, especially monoculture in large areas. Research shows that the ototoxic agents, in addition to compromising the peripheral auditory and vestibular systems, they may cause changes in central auditory pathways. O objetivo deste estudo foi verificar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície. The aim of this study was to evaluate the ultrastructural aspects of the cochlea of guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba, using ototoxic doses, damaging the outer hair cells, to evaluate the anatomic changes by surface electron microscopy. This is a prospective experimental study, conducted in guinea pigs, with the inclusion criterion was the presence of DPOAE. The sample was divided into five groups, in which they administered 0.9% saline solution (group 1 - control), pesticides - 0.3 mg / kg / day (group 2), Ginkgo biloba - 100mg/kg/day, 90 minutes after a pesticide 0.3 mg / kg / day (group 3), pesticides - 3 mg / kg / day (group 4) and Ginkgo biloba - 100mg/kg/day, 90 minutes after a pesticide 3.0 mg / kg / days (group 5) for seven consecutive days. The pesticide used was that of methamidophos from Fersol ®. The anatomical evaluation was performed with scanning electronic microscopy. The guinea pigs subjected to pesticides showed morphological cochlear lesions in the three turns analyzed by electronic microscopy, intensified according to the dosage received from the pesticide agent. Guinea pigs treated with pesticides and Ginkgo biloba showed a maintenance of ciliary architecture in outer hair cells in all cochlear turns, whereas in the group treated only with pesticides, there was disappearance of the cilia of outer hair cells and distortion in the architecture of cilia remaining the MoU. We conclude that the greater the exposure to pesticides increased the damage in outer hair cells of the cochlea of albino guinea pigs, while those who had previously received ginkgo biloba keep outer hair cells cytoarchitecture preserved.

**Keywords:** Ototoxicity; Pesticide; Otoprotection; Ginkgo biloba



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1, mostrando a Basal. Observa-se a preservação das estruturas. A: prolongamento digital da célula de Deiters; B:CCE; C: estereocílio da CCE; D: membrana reticular. Aumento de 1000x.....	31
Figura 2 - Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1 em “panorâmica”, mostrando a E3. Observa-se a preservação das estruturas. Aumento de 200x.....	32
Figura 3 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2 mostrando a E2. Observa-se ausência de CCE na F2 e F3. CCI: células ciliadas internas; CCE: células ciliadas externas; F1: fileira 1; F2: fileira 2; F3: fileira3. Aumento de 750x.....	33
Figura 4 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2 mostrando a E3. Observa-se ausência de CCE na F1, distorção ciliar com desarranjo no padrão em W e encurtamento dos cílios. Aumento de 1500x.....	33
Figura 5 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3 mostrando a Basal. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.....	34
Figura 6 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3 mostrando a E2. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.....	35
Figura 7 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a E3 em “panorâmica”. Observa-se ausência de CCE na F1, F2 e F3. Aumento de 350x.....	36
Figura 8 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a E3. Observa-se ausência de CCE na F1, F2 e F3. Aumento de 1000x.....	36
Figura 9 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a Basal. Observa-se ausência de CCE na F3. Aumento de 1500x.....	37
Figura 10 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 5, mostrando a Basal. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.....	38
Figura 11 - Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 5, mostrando a E2. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.....	38

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**CCE** Célula Ciliada Externa

**CCI** Célula Ciliada Interna

**CETEA** Comissão de Ética em Experimentação Animal

**COBEA** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

**E2** Espira 2

**E3** Espira 3

**EGb 761** Extrato de Ginkgo biloba 761

**GB** Ginkgo biloba

**EOA** Emissões Otoacústicas

**EOAPD** Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção

**EP** Potencial endococlear

**EPI** Equipamento de Proteção Individual

**f(1)** Frequência 1

**f(2)** Frequência 2

**FMRP** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**MAE** Meato Acústico Externo

**MEV** Microscópio Eletrônico de Varredura

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**PEATE** Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

**SINITOX** Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas

**SNC** Sistema Nervoso Central

**USP** Universidade de São Paulo

## LISTA DE SÍMBOLOS

**°C** Graus Celsius

**CO<sub>2</sub>** Dióxido de Carbono

**dB** Decibel

**dB NA** Decibel em Nível de Audição

**dB NPS** Decibel em Nível de Pressão Sonora

**g** Gramas

**Hz** Hertz

**KHz** Kilo Hertz

**Kg** Kilograma

**M** Molar

**mg** Miligrama

**ml** Mililitros

**mm** Milímetros

**ms** Milissegundos

**s** Segundos

**®** Marca Registrada

**%** Porcento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Agrotóxicos.....	14
2.2 Ototoxicidade.....	18
2.3 Otoproteção pelo Extrato de Ginkgo biloba.....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	25
3.1 Material.....	25
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Seleção dos animais experimentais e critérios de inclusão.....	27
3.2.2 Formação dos grupos de estudo.....	27
3.2.3 Avaliação histológica.....	28
3.2.4 Preparação do material.....	28
3.2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
3.2.5 Delineamento experimental.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	44
<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA</b> .....	50
<b>ANEXO</b> .....	51

## INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Lei Federal 7.802 de 11.07.89).

O trabalho agrícola no Brasil é uma atividade significativa do ponto de vista social e de negócio. Entretanto, a saúde do trabalhador desse setor nem sempre recebe a atenção necessária. Agregados ao trabalho agrícola, podem-se encontrar ruídos de vários tipos, vibrações e produtos químicos específicos, como os agrotóxicos (MANJABOSCO, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram aproximadamente três milhões de envenenamentos humanos por pesticidas em todo o mundo ao longo de um ano, com mais de 220.000 mortes relatadas. No Brasil, a ocorrência de intoxicações por pesticidas do grupo dos organofosforados continua sendo alta, apesar da diminuição no seu uso em relação à década dos anos oitenta. Estima-se que na atualidade cerca de 2,5 a 3 milhões de toneladas de agrotóxicos sejam utilizados anualmente na agricultura em todo o mundo (MEYER et al., 2003).

A ação deletéria dos agrotóxicos sobre a saúde humana pode causar uma série de manifestações clínicas, como náuseas, tontura, fraqueza, falta de apetite, nervosismo, dores de cabeça, alergias, lesões renais e hepáticas, câncer e alterações genéticas. Em decorrência da inespecificidade dos sintomas relacionados à intoxicação, sendo estes de comuns a múltiplos fatores etiológicos, torna-se difícil, muitas vezes, estabelecer a manipulação do organofosforado como o nexos causal. Sabe-se que os produtos químicos podem causar problemas, tão ou mais sérios que alterações auditivas. (CAMPO, 2002; FECHTER, 1999; MORATA et. al., 1995).

São do conhecimento científico as inúmeras alterações provocadas pela intoxicação por organofosforados no ser humano, levando-se em consideração todos os sistemas e órgãos que o compõe. Apesar da literatura concordar a respeito da associação existente entre a exposição a agrotóxicos e a ocorrência de alterações auditivas, são escassos os estudos, que avaliam as alterações histológicas especificamente relacionadas ao sistema auditivo periférico com drogas otoprotetoras.

Diversas drogas têm sido testadas com o objetivo de otoproteção como o tiosulfato de sódio, o dietilcarbamato, o ACTH e derivados, o ácido 4-metilthiobenzóico, o ácido lipóico, o glutation e seus ésteres, metionina, procaína, hormônio estimulador alfa-melanocítico (melatonina), antioxidantes como a ginkgo biloba e fosfomicina e compostos sulfurados (RYBAK, RADHIKA E SOMANI,1995; STENGS et al., 1998; SOCKALINGAM et al., 2000).

As tentativas de proteção da orelha interna contra a agressão dos ototóxicos, sobretudo aminoglicosídeos e quimioterápicos, iniciaram-se desde que estas drogas começaram a ser utilizadas e seu efeito deletério foi identificado. Inúmeras drogas já foram identificadas e estudos publicados mostrando terem efeito protetor ou atenuador contra lesão por drogas ototóxicas, porém nenhuma com ação totalmente eficaz.

A ginkgo biloba também tem sido demonstrada como agente protetora de lesão de células ciliadas externas quando administrada concomitantemente à droga ototóxica. A ginkgo biloba teria uma ação antioxidante protegendo as células dos metabólicos oxidativos. Esta ação protetora foi demonstrada por HYPPOLITO et al. (2003) para a cisplatina e por MINAMI, SHA E SCHACHT (2004) para amicacina.

Conforme a semelhança anátomo-fisiológica existente entre o sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias, pesquisas realizadas com estes animais de laboratório são deveras importantes, uma vez que os achados podem ser correlacionados com a população humana e servirem, assim, de alerta para os possíveis comprometimentos auditivos ocasionados pelo contato com agrotóxicos organofosforados.

Em razão do exposto, o objetivo desta pesquisa consiste em verificar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e Ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Este capítulo terá como objetivo apresentar a revisão da literatura relacionada ao tema desta pesquisa, abordando aspectos relacionados aos agrotóxicos bem como seus tipos, procurando, em seguida, relacionar a sua influência na saúde em geral, e em seguida, são apresentados estudos respectivos da apresentação clínica da ação tóxica no sistema auditivo, ou seja, a ototoxicidade e por fim faz-se referência ao uso do Extrato de Ginkgo biloba (EGb 761) como otoprotetor.

### **2.1 Agrotóxicos**

O Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos e sua maior utilização se dá na agricultura, especialmente na monocultura, em grandes extensões. Também são utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de doenças endêmicas, no tratamento de madeira para construção, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, para combate a piolhos e outros parasitas, na pecuária etc. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Os agrotóxicos são definidos como produtos químicos ou biológicos utilizados, entre outras finalidades, para exterminar pragas ou patógenos que atacam as culturas agrícolas. Estima-se que na atualidade cerca de 2,5 a 3 milhões de toneladas de agrotóxicos sejam utilizados anualmente na agricultura em todo o mundo (MEYER et. al., 2003).

O Brasil tem grande parte de sua economia baseada na atividade agrícola, ocupando o quarto lugar no mercado de pesticidas no mundo. Os pesticidas são potencialmente tóxicos ao homem, mas em decorrência de sua importância econômica, o seu uso é muito difundido e os resíduos de pesticidas podem ser encontrados nos alimentos, na água e no meio ambiente (CALDAS e SOUZA, 2000).

O termo agrotóxico ao invés de defensivo agrícola passou a ser utilizado, no Brasil, para denominar os venenos agrícolas, após grande mobilização da sociedade civil organizada. Mais do que uma simples mudança da terminologia, esse termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e a saúde humana. São ainda genericamente denominados praguicidas ou pesticidas. Por determinação legal, tais produtos devem apresentar, nos rótulos, uma faixa colorida indicativa de sua classe toxicológica: Classe I Extremamente tóxicos - Faixa vermelha, Classe II Altamente tóxicos - Faixa amarela, Classe

III Medianamente tóxicos - Faixa azul, Classe IV Pouco tóxicos - Faixa verde. Essa classificação também está relacionada à ação e ao grupo químico ao qual pertencem SOBREIRA et al. (1998).

... Os agrotóxicos não são, via de regra, substâncias seletivas para o combate das pragas a que se destinam. Por isso, recebem também o nome de biocidas, pois tanto o homem como os demais vertebrados também se expõem a esses compostos, sofrendo as consequências dessa exposição, através das intoxicações que frequentemente produzem (MÍDIO e MARTINS, 2000, p. 191).

Nesse contexto, outro autor acrescenta que,

... Por não terem seletividade, os inseticidas atingem não só os vetores e o ambiente em toda sua biodiversidade, mas também o homem. Um dos indicadores dos efeitos nocivos à saúde dos trabalhadores são as intoxicações percebidas através dos dados epidemiológicos, dos efeitos toxicológicos e clínicos (GURGEL, 1998).

No Brasil, a ocorrência de intoxicações por pesticidas do grupo dos organofosforados continua sendo alta, apesar de seu uso ter diminuído em relação à década de oitenta. Os dados estatísticos dos Centros de Toxicologia de Belo Horizonte, Campinas, Florianópolis, Ribeirão Preto, Londrina e Maringá mostram que de 495 casos de intoxicações ocupacionais, cerca de 34,9% foram devidos a organofosforados; de 622 casos de tentativas de suicídio, 38,1% resultaram do uso de compostos deste grupo; de 38 casos de óbitos, o organofosforado esteve presente em 44,7% das ocorrências (CAVALIERE et al., 1996).

O metamidofós (O,S-dimetilfosforamidotoato), conhecido comercialmente, entre outros nomes, por Tameron®, é um pesticida organofosforado de largo espectro de ação. Devido à ampla utilização e à moderada toxicidade para alguns organismos, o metamidofós pode apresentar sérios riscos à saúde dos homens e dos animais, sobretudo quando presente em quantidade acima da tolerada por estes organismos, seja na água, no ar, no solo ou nos alimentos (MORGAN et al., 2005).

Em estudo realizado por Araújo et al. (2007), o organofosforado metamidofós, foi o agrotóxico mais utilizado (90%) na comunidade rural de Córrego de São Lourenço. Alguns sintomas de intoxicação referidos foram intenso prurido, rubor facial e irritação das mucosas nasal, faríngea e dos olhos.

Em estudo realizado por Delgado e Paumgarten (2004), em 55 lavouras do Município de Paty do Alferes, no Rio de Janeiro, os autores verificaram que o organofosforado



metamidofós é o produto mais utilizado nas lavouras (53%), dentre os mais de 18 inseticidas em uso na região. Neste estudo, 55 agricultores foram entrevistados a respeito do uso dos agrotóxicos. Dos entrevistados, 92% dos trabalhadores envolvidos no manuseio destes produtos informaram não utilizar qualquer tipo de EPI para preparar e/ou aplicar os pesticidas. Esta negligência ou falta de conhecimento das medidas preventivas acarreta em prejuízos à saúde do trabalhador, como verificado pelos autores, visto que 62% dos trabalhadores referiram já ter apresentado alguns sintomas durante o manuseio do agrotóxico. Dos indivíduos que referiram os sintomas, 30% estavam usando o organofosforado metamidofós.

Soares, Almeida e Moro (2003), desenvolveram uma pesquisa na qual foi aplicado um questionário durante os anos de 1991, 1994, 1995, 1998 e 2000, em aproximadamente 1.064 trabalhadores rurais de nove municípios de Minas Gerais, e verificaram que o agrotóxico mais utilizado foi o organofosforado metamidofós, citado por 530 trabalhadores (39,61%). Os autores realizaram exame de dosagem da colinesterase, no qual foi identificada uma proporção considerável de trabalhadores rurais intoxicados (aproximadamente 50% da amostra).

Araújo et al. (2007) referiram que a elevada prevalência de quadros de intoxicação pelos agrotóxicos, tanto aguda como crônica, reflete a precariedade com que são realizadas as atividades de controle de pragas no campo, sem proteção por equipamentos de segurança, e com uso indiscriminado de substâncias químicas prejudiciais ao meio ambiente, às espécies e ao homem. Os autores comentaram ainda que a frequência de sinais e sintomas provém de uma ocorrência elevada de casos de contaminação humana por sobre-exposição a inúmeros produtos, utilizados geralmente na forma de coquetel, em curtos intervalos de reaplicação, e sem a adoção das adequadas medidas de segurança. O agricultor que não conhece os efeitos danosos dos agrotóxicos na saúde pode superestimar seus benefícios e usar doses maiores que as necessárias (SOARES, ALMEIDA e MORO, 2003).

A intoxicação por pesticidas pode ocorrer por três vias: inalação, ingestão e dérmica (LEMUS e ABDELGHANI, 2000; LIMA et al., 2001). No caso de envenenamento por inalação, os sintomas iniciais mais comuns são caracterizados por dores no tórax, dificuldade de respiração e dores de cabeça, aliados à visão borrada e lacrimejante. Quando ingerido, provoca náuseas, vômitos, diarréias e câimbras (efeitos iniciais mais comuns de envenenamento). Contrações e suor na pele são sintomas observados em caso de contato do produto com partes do corpo (LIMA et al., 2001).

Como sintomas da intoxicação aguda por inseticidas organofosforados, podem ser descritos suor, salivação, lacrimejamento, fraqueza, tontura, dores e cólicas abdominais, seguidos de vômitos, dificuldade respiratória, colapso, tremores musculares, convulsões e morte (AMES et al., 1995; PIRES, CALDAS e RECENA, 2005). Os organofosforados causam também efeitos neurológicos retardados após a exposição aguda e como consequência da exposição crônica, incluindo confusão mental e fraqueza muscular (ALAVANJA, HOPPIN e KAMEL, 2004). A exposição crônica a estes compostos pode levar ao desenvolvimento de sintomas de depressão, um fator importante nos suicídios. Caldas e Souza (2000) complementaram referindo que a exposição crônica ao agrotóxico está relacionada, entre outros, ao câncer, efeitos teratogênicos, neuropatias periféricas tardias e toxicidade reprodutiva.

Em estudo de Hoshino et al. (2008), a tontura foi o sintoma de maior destaque, e por se tratar de uma das expressões clínicas da exposição aos agrotóxicos, os pesquisadores sugeriram que a mesma deve ser avaliada e detectada durante a anamnese específica do trabalhador rural, bem como devidamente investigada pelas equipes de saúde responsáveis pelo atendimento médico nas localidades.

Outra alteração resultante da exposição ao agrotóxico verificada por Salles Jr. e Faro (2010), foi uma diminuição significativa da atividade motora, em uma pesquisa cujo objetivo foi o de avaliar os efeitos comportamentais da administração de uma formulação comercial de agrotóxico, constituída de uma associação entre um organofosforado e um piretróide.

KÖRBS (2009) realizou um estudo experimental com cobaias albinas, divididas em três grupos, nos quais administrou o organofosforado (metamidofós) durante sete dias consecutivos. Realizou avaliação auditiva funcional Emissões Otoacústicas Produto de Distorção (EOAPD) e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE), ambos realizados antes e imediatamente após o período de aplicação do agrotóxico. A avaliação anatômica foi realizada com Microscopia Eletrônica de Varredura. As cobaias submetidas ao agrotóxico apresentaram alterações morfológicas cocleares, com lesões nas três espiras analisadas na microscopia eletrônica, intensificadas de acordo com a dosagem recebida do agente. Na avaliação auditiva funcional, todas as cobaias apresentaram EOAPD presentes, no entanto verificou significância estatística nos valores da relação sinal/ruído das frequências de 1.500 e 6.000 Hz das EOAPD das cobaias dos grupos 2 e 3 quando confrontados com os achados dos animais do grupo controle, indicando um possível sofrimento celular. Não encontrou alterações estatisticamente significantes na avaliação do VIII par craniano por meio da análise da onda I do PEATE. Concluiu que o organofosforado pode ser considerado um

agente lesivo agudo das células ciliadas externas visto a correlação entre a dosagem aplicada e a quantidade de alterações observadas à microscopia eletrônica, entretanto a exposição aguda ao agrotóxico não causou alteração funcional do sistema auditivo periférico.

## **2.2 Ototoxicidade**

As ototoxicoses são afecções iatrogênicas provocadas por drogas que alteram a orelha interna. Podem afetar o sistema coclear, o sistema vestibular ou ambos, afetando a audição e ou equilíbrio. Considera-se ototoxicose quando há perda auditiva neurosensorial de 25 dB em uma ou mais frequências de 250 a 8.000 Hz e ou manifestações vestibulares como vertigem ou desequilíbrio (OLIVEIRA e BERNAL, 2003).

Várias drogas têm sido descritas como potencialmente ototóxicas, como eritromicina, cloranfenicol, ampicilina, minociclina, cefalosporina, viomicina, capreomicina, polimixinas, actinomicina, frameticina, lincomicina, ácido nalidíxico, vancomicina e espectinomicina. Também drogas não antibióticas como quimioterápicos (cisplatina, vincristina), clorexedina, benzalcônio, iodo, etanol, propilenoglicol e substâncias como o mercúrio e solventes orgânicos (OLIVEIRA, 1989; ALMEIDA, ALMEIDA e DUPRAT, 1993; OLIVEIRA e BERNAL, 2003).

Agente ototóxico é definido como substância, químico ou droga que causa dano funcional ou lesão celular na orelha interna, especialmente em nível da cóclea e/ou canais semicirculares e VIII par craniano. Já os agentes neurotóxicos alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo primariamente em neurônios das vias auditivas periférica e central (JOHNSON, 1993).

Segundo preceitos de Almeida, Almeida e Duprat (1993), a ototoxicidade deve ser considerada e estudada como um problema de saúde pública. Existem mais de 200 substâncias que já foram citadas na literatura como ototóxicas, sendo a maioria delas desconsideradas como nocivas ao homem.

A perda auditiva pode ser de instalação rápida ou insidiosa e a gravidade depende da quantidade absorvida do agente, e ainda do tempo de exposição e interação com o ototóxico. Pode ocorrer durante a exposição ou ter aparecimento tardio (KÓS e KÓS, 1998). Azevedo (2004) citou como os métodos mais frequentemente utilizados para a avaliação da ototoxicidade a audiometria tonal, audiometria vocal, imitanciometria, pesquisa do declínio do reflexo acústico, pesquisa das Emissões Otoacústicas (EOA) e do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE).

Recentemente, os agrotóxicos organofosforados foram introduzidos no grupo de alta prioridade para pesquisa relacionada à ototoxicidade devido à exposição ocupacional, da qual já fazia parte os solventes industriais, além de metais pesados, e outros compostos, de natureza química diversa, que comumente apresentam ação asfíxiante, caso do monóxido de carbono e cianeto de hidrogênio (MORATA, 2003; AZEVEDO, 2004; MELLO e WAISMANN, 2004).

A configuração da perda auditiva provocada por substâncias químicas industriais pode ser muito semelhante àquela observada em drogas ototóxicas como aminoglicosídeos e cisplatina, bem como àquela relacionada ao ruído. Os descritores, em geral, dessas desordens são muito semelhantes: perda auditiva neurosensorial para frequências de 3 a 6 Khz, com lesão principalmente em células ciliadas cocleares, sendo a alteração bilateral, simétrica e irreversível (MORATA e LITTLE, 2002).

Harell, Shea e Ermett (1987) constataram um caso de perda auditiva após intoxicação aguda a dois tipos de organofosforados. Em uma variação de oito a nove horas após a exposição, o indivíduo pesquisado apresentou visão turva e episódios graduais de náusea. No quarto dia após a exposição, referiu perda auditiva e tontura, sendo constatada perda auditiva bilateral profunda.

Stefani, Matusuyama e Melo (1996) verificaram um caso de perda auditiva súbita nas frequências altas bilateralmente após a exposição aguda a um tipo de piretroide de uso doméstico. Contudo, houve regressão da perda auditiva posterior à desintoxicação mediante tratamento medicamentoso.

Em outro estudo, realizado com trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos do tipo organofosforado e piretroide, constatou-se que 57% dos sujeitos apresentaram perda auditiva neurosensorial nas frequências altas (TEIXEIRA e BRANDÃO, 1998).

Pela imensa quantidade de agrotóxicos utilizada na agricultura e pela falta de um sistema de vigilância sanitária que acompanhe a audição dos trabalhadores periodicamente, torna-se difícil prever qual o tipo de agrotóxico que pode causar dano auditivo no indivíduo. Sabe-se, no entanto, que grande parte desses produtos é neurotóxicos, podendo afetar diferentes porções do Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico (MANJABOSCO, 2005). Produtos neurotóxicos podem levar a problemas tão ou mais sérios do que a perda auditiva. Porém há evidências de que a perda auditiva possa ser uma manifestação precoce de intoxicação (AZEVEDO, 2004).

Relacionando-se as pesquisas de Pelegrino et al. (2006) nas quais utilizou-se o agrotóxico como agente de intoxicação de cobaias, foi realizado um estudo para verificar os

efeitos tóxicos do organofosforado metamidofós no SNC, objetivando estudar os aspectos morfométricos no cérebro de ratos, tratados com doses repetitivas de organofosforados metamidofós. A pesquisa envolveu ratos Wistar machos que foram inoculados via oral, com doses de 2,5 mg/Kg e 5,0 mg/Kg, durante dois meses, com intervalos de sete dias. Após a análise dos resultados, os autores concluíram que doses subletais de organofosforados metamidofós produzem hipotrofia da camada molecular do córtex cerebral, sem, contudo, causar redução do número de neurônios em regiões específicas do cérebro.

Reiterando este achado, Perez et al. (2006), em pesquisa com ratos albinos machos, que receberam doses semanais de metamidofós durante dois meses, verificaram que a administração crônica do agente anticolinesterásico metamidofós, em doses subletais, produziu afinamento da camada molecular do córtex parietal. Devido ao fato desta camada ser constituída basicamente por ramificações dendríticas e axonais dos neurônios, os autores concluíam que em doses baixas e repetitivas, o organofosforado possivelmente induza à perda ou afinamento de ramificações neuronais.

Salles Jr. e Faro (2010) realizaram um estudo sobre os efeitos comportamentais produzidos pela exposição aguda a pesticidas organofosforados. Os pesquisadores utilizaram uma formulação comercial de agrotóxico vendida no Brasil, o Deltaphos®, que constitui uma associação entre um organofosforado (triazofós) e um piretroide (deltametrina) sobre a atividade locomotora e em modelo de ansiedade e depressão em ratos. Os animais foram divididos em grupos que receberam, via subcutânea, o organofosforado administrado durante sete dias consecutivos. A ansiedade foi avaliada no Labirinto em Cruz Elevado; a atividade locomotora foi avaliada em campo aberto e a depressão foi avaliada no teste do nado forçado. Os resultados da pesquisa demonstraram que a administração aguda de agrotóxico alterou o comportamento locomotor e produziu ansiedade nos animais tratados, mas não produziu depressão nos mesmos.

Segundo Schanaider et al. (2004), a maior parte da pesquisa na área de educação médica é empreendida nos animais de pequeno porte (camundongo, rato, hãnmster, cobaia ou gerbil) e compreendem quase 90% do total das espécies utilizadas nos laboratórios. O conhecimento sobre a anatomia da orelha de cobaias e ratos é indispensável na área de otologia. Uma utilização mais adequada destes animais faz com que os resultados obtidos sejam mais confiáveis, evitando o uso de técnicas que não são adequadas para uma determinada espécie e provocando, desnecessariamente, a morbidade e mortalidade de grande número de animais.

De acordo com Oliveira (1989), em seu trabalho relacionado ao sistema labiríntico, a cobaia foi escolhida porque os sistemas auditivo e vestibular, neste animal, se assemelham sensivelmente aos do homem e é um animal que se presta muito bem para experimentos relacionados à labirintologia.

Diferentemente, Santos et al. (2005), utilizaram o rato como animal de experimentação por este apresentar vantagens práticas e semelhanças anatômicas e patológicas com a orelha média humana.

Para facilitar as pesquisas dos investigadores no campo da labirintologia que utilizam como animal de experimentação a cobaia, Oliveira (1989) descreveu a anatomia do osso temporal deste animal, com dissecação sob visão estereoscópica das peças anatômicas e microfotografias de preparação de superfície dos epitélios coclear e vestibular. Estes conhecimentos são essenciais, principalmente no estudo das alterações estruturais provocadas por drogas labirintotóxicas e trauma acústico.

Judkins e Li (1997) descreveram a anatomia topográfica da orelha média do rato albino através de microfotografias, ilustrando em detalhes estruturais diferentes exposições cirúrgicas. Muitas das estruturas anatômicas da orelha média do rato albino existem no humano, contudo, o nervo facial emerge do osso temporal em uma posição mais superficial e anterorostral. Os ossículos são mais finos do que os humanos, quase totalmente ocultos no epítimpano e a artéria carótida passa entre as cruras do estribo. Concluem que embora a exploração e dissecação possam ser feitas em animais eutanasiados, o procedimento das pesquisas é mais frequentemente traçado em animais vivos que serão avaliados algum tempo depois da cirurgia para analisar uma premissa científica.

Pinilla et al. (2001) descreveram um acesso simples à orelha média do rato causando mínima morbidade e mortalidade dos animais. Quando comparada com a cobaia, as estruturas anatômicas da orelha média do rato são mais similares do que quando comparadas ao humano. A única exceção é a localização mais superficial e anterorostral do nervo facial do rato quando comparado ao da cobaia e ao humano. Contudo, a cóclea da cobaia é maior e a cadeia ossicular é fundida no nível incudomaleolar, enquanto a cóclea do rato está projetada no interior da orelha e os ossículos estão claramente definidos e podem ser removidos separadamente como no humano. O rato não serve como um modelo para estapedotomia ou ossiculoplastia envolvendo substituição dos ossículos, devido à presença da artéria carótida que passa ao longo da base da cóclea e através das cruras do estribo, neste caso uma exposição da janela oval poderá causar danos por hemorragia, lesões cocleares e morte do animal. Por outro lado, o acesso fácil à janela redonda e a parede lateral pode ser uma

alternativa para a cocleostomia sem causar danos à membrana timpânica ou aos ossículos. Concluíram que são necessários cuidados específicos quando se trata de novos acessos a orelha média de pequenos animais, como o rato, quando uma sobrevida prolongada e um acompanhamento subsequente são desejados.

### **2.3 Otoproteção pelo Extrato de *Ginkgo biloba***

*Ginkgo biloba* é uma árvore de origem chinesa, sendo a única planta vivente da família Ginkgoaceae. Alguns fósseis da espécie possuem idade aproximada de 250 milhões de anos, sendo por esse motivo, referida por Darwin como um “fóssil vivo” (MAJOR, 1967). Curiosamente, possui forte resistência a uma grande quantidade de pragas e fungos, o que contribui para sua longevidade (GOLD et al., 2002). Foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão, Engelbert Kaelmpter, por volta de 1690, mas apenas despertou o interesse de pesquisadores após a Segunda Guerra Mundial, quando perceberam que a planta tinha sobrevivido à radiação em Hiroshima, brotando no solo da cidade devastada. A planta ginkgo tem origem chinesa e significa damasco prateado enquanto que a palavra biloba vem do formato bilobado das folhas desta planta (DIAMOND et al., 2000).

O extrato seco padronizado das folhas para uso fitoterápico (patenteado como Egb-761) contém 24% de flavonóides, 7% de proantocianidinas e 6% de terpenóides, 13% de ácidos carboxílicos e 2% de catequinas. Os flavonóides incluem canferol e quercetina conjugados com glicose ou rhamnose e biflavonas (ginkgetina, isoginkgetina). A fração terpênica consiste em lactonas diterpênicas (ginkgolideos A, B, C, J e M), e sesquiterpênicas como o composto bilobalídeo (VAN BEEK, 2002; MACLENNAN; DARLINGTON; SMITH, 2002).

O extrato de *Ginkgo biloba* tem sido usado tradicionalmente como fitoterápico para prevenção e tratamento de arteriosclerose, problemas de memória, demência, doença de Alzheimer, vertigens e cefaléia (MAHADY, 2001). Esses efeitos estão relacionados à alta atividade antioxidante de seus flavonóides e de suas lactonas diterpênicas (ginkgolideos), sendo que estas últimas atuam mais em regiões hidrofóbicas, como por exemplo, em membranas celulares (SCHOLTYSSSEK et al., 1997).

Para (Gardès-Albert et al., 1993), os compostos antioxidantes atuam bloqueando a ação de radicais livres como o ânion superóxido, o radical hidroxil o radical peróxido e o radical óxido nítrico. Atuam também indiretamente via diminuição da formação de radicais livres ao inibir a atividade ou expressão de enzimas que catalisam a geração desses radicais ou então

pelo aumento da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como a heme-oxigenase, a superóxido dismutase mitocondrial e a glutathiona peroxidase (MAITRA et al., 1995)

As tentativas de proteção da orelha interna contra a agressão dos ototóxicos, sobretudo aminoglicosídeos e quimioterápicos, iniciaram-se desde que estas drogas começaram a ser utilizadas e seu efeito deletério foi identificado. Inúmeras drogas já foram identificadas e estudos publicados mostrando terem efeito protetor ou atenuador contra lesão por drogas ototóxicas, porém nenhuma com ação totalmente eficaz.

Em 1964, um extrato de Ginkgo biloba (GB), chamado EGB 761, foi desenvolvido por uma companhia farmacêutica alemã e, desde então, centenas de estudos tem examinado os efeitos da ginkgo em modelos animais e humanos. (Diamond et al., 2000).

A ginkgo biloba também tem sido demonstrada como agente protetora de lesão de células ciliadas externas quando administrada concomitantemente à droga ototóxica. A ginkgo biloba teria uma ação antioxidante protegendo as células dos metabólicos oxidativos. Esta ação protetora foi demonstrada por Hyppolito et al. (2003) para a cisplatina e por Minami, Sha e Schacht (2004) para amicacina.

Huang, Whitworth e Rybak (2007) avaliaram a eficácia do EGB 761 como otoprotetor contra a ototoxicidade induzida pela cisplatina em ratos, por meio de medidas do potencial endococlear (EP), potencial evocado auditivo de tronco encefálico (PEATE) e microscopia eletrônica de varredura das cócleas processadas. Os achados demonstraram significativa otoproteção nos ratos recebendo EGB 761 e altas doses de cisplatina, pelas avaliações do PEATE, EP e da microscopia eletrônica, e oferecem evidências dos potenciais benefícios do antioxidante EGB 761 na preservação da audição daqueles em uso de quimioterapia.

Mahadevan e Park (2008), fizeram uma explanação sobre a química, a eficácia, a segurança e os usos do EGB 761 e informam que os dois mecanismos de ação propostos para sua atividade antioxidante seriam limpar radicais livres e, diretamente ou indiretamente, inibir a formação de radicais livres. Eles concluem que o EGB 761 tem exibido efeitos terapêuticos complexos, que incluem efeitos em doenças neurodegenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, tinido, queixas geriátricas, desordens psíquicas, e que os principais mecanismos de ação em todos esses casos seria sua atividade antioxidante.

Hyppolito et al. (2003) descreveram que a cisplatina é uma droga anti-neoplásica potente, largamente utilizada para o tratamento do câncer, tanto em adultos quanto em crianças. Entre seus efeitos colaterais, a ototoxicidade se apresenta como um dos mais importantes e leva à perda auditiva irreversível, bilateral, para as latas frequências (4 KHz à 8



KHz). O objetivo dos autores foi avaliar, por meio das emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPD) e por microscopia eletrônica de superfície (ME), a ação do extrato de Ginkgo biloba (EGb 761) na cóclea de cobaias albinas. Observaram EOAPD presentes pré e pós-tratamento no grupo EGb (100mg/kg via oral) e 90 minutos após Cisplatina (80mg/kg/dia via intraperitoneal) por oito dias. Verificaram que no grupo tratado com Ginkgo biloba a estrutura ciliar nas células ciliadas externas foi mantida em todas as espiras da cóclea, enquanto no grupo tratado somente com cisplatina as EOAPD desapareceram após o tratamento, com desaparecimento dos cílios das células ciliadas externas e distorção da arquitetura dos cílios remanescentes sob ME. Os autores concluem que o EGb, por sua ação anti-oxidante, atua como fator otoprotetor à ototoxicidade pela cisplatina.

Charagnac (1976) explica que a polivalência do Ginkgo biloba é facilmente compreendida se for considerado que o EGb 761 age como um “trivaso regulador”, ou seja, influencia o sistema circulatório total e não apenas o sistema arterial, capilar ou venoso. Outras ações que não são especificamente ligadas ao sistema cardio-vascular, como a “neuroproteção”, também contribuem para a ação polivalente do EGb 761. A neuroproteção determina melhoria do metabolismo cerebral, proteção contra hipóxia e isquemia, efeitos protetores e curativos no edema cerebral, efeitos nos sistemas colinérgicos centrais, redução de “déficits” de neurotransmissores por causa da idade avançada, proteção contra danos às estruturas cerebrais e melhoria da adaptação ao estresse.

Dubreil (1986) confirma os bons resultados obtidos com Ginkgo biloba no sofrimento isquêmico das células sensoriais da cóclea. Essa hipótese é invocada diante de qualquer surdez coclear aguda, quer se trate de surdez súbita idiopática, quer se trate de surdez por traumatismo sonoro ou por barotraumatismo. Com efeito além das propriedades hemodinâmicas, em particular sobre a microcirculação dos tecidos que sofreram isquemia, o Ginkgo biloba possui propriedades metabólicas que protegem as células com anóxia de suas conseqüências deletérias, em particular da peroxidação lipídica.

Renn (1993) sugere que o benefício da Ginkgo biloba EGb 761 sobre a audição deve-se, em parte, à sua ação anti radicais livres e argumenta que o EGb 761 exerce ações vasculares, hemorreológicas e metabólicas, que permitem a ele “irrigar” preferencialmente tecido isquêmico.

Hyppolito et al. (2003) argumenta que a ginkgo biloba apresenta propriedades antioxidantes, peróxido dismutase e glutadion. No plasma, também atua formando complexos com fosfolípidos, aumentando sua atividade anti-oxidante. Em nível intracelular, atua em mitocôndrias, na fosforilação oxidativa do RNA mitocondrial e no Complexo de Golgi,

auxiliando no mecanismo de reparo do DNA com melhora do “status antioxidante” celular e aumento dos níveis de glutadion intracelular e diminuição na incorporação de 3H-timidina.

### 3 METODOLOGIA

Neste capítulo são apresentadas a seleção e a descrição dos grupos avaliados no presente estudo, os procedimentos realizados e a análise dos dados.

A parte experimental desta pesquisa foi desenvolvida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) no período de janeiro a março de 2010, com o objetivo de verificar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e Ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície.

#### 3.1 Material

Escolhemos como animal experimental cobaias albinas, pela facilidade de manejo, dissecação coclear e manipulação e ainda pela igual facilidade de infusão de drogas anestésicas e drogas em experimentação, pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea, quando comparados a outros animais experimentais (AQUINO, OLIVEIRA e ROSSATO, 2008).

Para o estudo foram utilizadas 21 cobaias albinas fêmeas, espécie *Cavia porcellus*, linhagem inglesa, com peso entre 400 e 600g, divididas em cinco grupos: grupo 1 com 3 animais e 6 cócleas, grupo 2 com 2 animais e 4 cócleas, grupo 3 com 7 animais e 14 cócleas, grupo 4 com 2 animais e 4 cócleas e grupo 5 com 7 animais e 14 cócleas.

Para a intoxicação das cobaias, administrou-se o organofosforado - metamidofós comercializado pela Fersol® Ltda. Optou-se por este agente pelo mesmo ser largamente utilizado em uma grande variedade de culturas, tais como algodão, amendoim, batata, feijão, fumo, soja, tomate e trigo, mesmo sendo considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) (RAMOS, 1999). Em estudo realizado por Araújo et al. (2007), o organofosforado metamidofós, foi o agrotóxico mais utilizado (90%) na comunidade rural de Córrego de São Lourenço. Alguns sintomas de intoxicação referidos foram intenso prurido, rubor facial e irritação das mucosas nasal, faríngea e dos olhos.

Para testar o efeito otoprotetor nas células ciliadas externas à lesão provocada pelo metamidofós, utilizou-se o Extrato de Ginkgo biloba (EGb 761), cujo nome comercial é TEBONIN® comercializado pelo laboratório farmacêutico – Byk Química 40mg/ml. Optou-se por esta droga em razão de ser largamente utilizada na prática clínica e por não serem

descritos efeitos colaterais importantes, bem como existirem descrições sobre interações com outras drogas (HYPPOLITO et. al. 2003).

Os cuidados seguiram as diretrizes do Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources. O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido à análise e aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, sob o protocolo número 175/2009 (Anexo 1).

## **3.2 Métodos**

### **3.2.1 Seleção dos animais experimentais e critérios de inclusão**

Os animais foram selecionados no Biotério Central da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, através da presença do Reflexo de Preyer (JERO, COLING e LALWANI, 2001), e peso variando entre 400 e 600 gramas. Após um repouso auditivo de 24 horas, os animais eram avaliados e submetidos à otoscopia externa. Os animais que apresentavam sinais de otite externa ou otite média aguda, cerume de difícil remoção, alterações inflamatórias do conduto auditivo externo ou mesmo conduto auditivo muito estreito para acomodar adequadamente a sonda do equipamento de emissões otoacústicas (EOA), eram descartados do experimento. Os que apresentavam rolha de cerume e tinham a mesma removida eram mantidos. Todos os animais incluídos eram então submetidos a uma triagem auditiva por emissão otoacústica produto de distorção (EOAPD) em cabine com isolamento acústico e sob anestesia com ketamina (65 mg/Kg). As cobaias que apresentavam EOAPD presentes nas duas orelhas eram selecionadas para o experimento e as demais excluídas.

### **3.2.2 Formação dos grupos de estudo**

Grupo 1: (controle) 3 animais – 6 cócleas – soro fisiológico 0,9% via intraperitoneal em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de metamidofós para o peso da cobaia durante sete dias consecutivos;

Grupo 2: (controle) 2 animais – 4 cócleas - dose de 0,3 mg/Kg/dia de metamidofós via intraperitoneal por sete dias consecutivos;

Grupo 3: (estudo) 7 animais – 14 cócleas – Ginkgo biloba 100mg/kg via oral 90 minutos após, metamidofós 0,3 mg/Kg/dia via intraperitoneal por sete dias consecutivos;

Grupo 4: (controle) 2 animais – 4 cócleas - dose de 3,0 mg/Kg/dia de metamidofós via intraperitoneal por sete dias consecutivos;

Grupo 5: (estudo) 7 animais – 14 cócleas – Ginkgo biloba 100mg/kg via oral 90 minutos após, metamidofós 3,0 mg/Kg/dia via intraperitoneal por sete dias consecutivos;

A dose mínima utilizada de metamidofós, considerada potencialmente ototóxica, foi a mesma utilizada em estudos prévios de Körbes (2009) e confirmado pelo nosso grupo controle. O cálculo da dose máxima inicialmente baseou-se na dose letal para ratos descrita na bula do produto.

A dose utilizada de Ginkgo biloba capaz de promover um efeito otoprotetor as CCE expostas previamente a uma droga potencialmente ototóxica foi a mesma utilizada por Fukaya e Kanno (1999); Hyppolito et. al. (2003).

Para a estimativa correta das doses, as cobaias eram pesadas diariamente, imediatamente antes da administração das drogas. Para a aplicação controlada das drogas em teste, foram utilizadas seringas descartáveis BD® de insulina, milimetradas, para cada grupo, bem como foram utilizadas agulhas descartáveis BD® tamanho 21G1 (25 x 8 – 0.8 x 25 mm).

As cobaias foram previamente marcadas com ácido pícrico, para diferenciação das mesmas dentro do seu respectivo grupo. Em virtude da importância dos EPI para evitar contato com o agrotóxico, no momento da aplicação das doses diárias, nos animais do experimento foram adotadas medidas de precaução, tais como a utilização de jaleco, calças compridas, calçados fechado, luvas de látex antiderrapante, toca cirúrgica, óculos de segurança e máscara descartável contra vapores orgânicos cobrindo fossas nasais e cavidade oral.

### **3.2.3 Avaliação histológica**

No dia seguinte à última dose da droga ou da solução fisiológica administrada em cada um dos grupos, os animais foram sacrificados com injeção letal de tiopental (Thionembutal®) intraperitoneal, pelo método de decapitação e as bulas imediatamente retiradas bilateralmente e abertas, expondo-se as cócleas.

### **3.2.4 Preparação do material**

Em seguida à abertura da bula timpânica injetou-se solução de fixação de glutaraldeído a 2,5%, lentamente através da janela redonda, para que não houvesse lesão de estruturas vestibulococleares. Após esta fixação inicial com glutaraldeído, o material foi submetido a cinco lavagens com solução tampão-fosfato 0,1M e submetido à microdissecção expondo-se as espiras cocleares. Então foi novamente imerso em tampão-fosfato 0,1M por 12 horas depois de lavado com a mesma solução. Realizou-se a refixação em solução constituída de tetróxido de ósmio a 1% em tampão-fosfato a 0,1M durante 1 hora a 4°C. Em seguida o material foi lavado em três banhos de água bidestilada por 2 a 3 minutos cada e imerso em solução de ácido tânico aquosa 1% por 1 hora também a 4°C.

A desidratação das estruturas foi então realizada com banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e 95% durante 10 minutos cada. A seguir utilizou-se etanol a 100% em três banhos de 20 minutos cada, deixando-se as estruturas imersas no último banho à temperatura ambiente por 12 horas.

A secagem da água ainda presente nas amostras, após desidratação, foi realizada utilizando-se o equipamento BAL-TEC – CPD 030 – Critical Point Dryer (Balzers, 40 Liechtenstein), através do processo de ponto crítico, sendo as amostras transferidas para a câmara do aparelho e recobertas por dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) líquido.

Para a adequada observação à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as cócleas dissecadas e parcialmente preparadas, foram fixadas pela base em um porta-espécime cilíndrico de metal com pasta condutiva de carbono, Colloidal Graphite (Electron Microscopy Sciences – Hatfield, PA). As estruturas foram, então cobertas por uma fina camada de ouro de 24 quilates, através do processo de evaporação com o equipamento BAL-TEC – SCD 050 – Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein), tornando-se eletricamente condutivas, conforme estudos de OLIVEIRA, CANEDO E ROSSATO (2002), HYPPOLITO et al. (2003), AQUINO (2007) e KÖRBES (2009).

#### **3.2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Terminados os processos de preparação das estruturas, as mesmas foram levadas para análise à MEV. O microscópio eletrônico utilizado foi o JEOL Scanning Electron Microscope – JSM 5200 (Tokyo, Japan).

A análise estrutural foi padronizada pelo estudo do terço médio das primeiras três espiras cocleares. A espira apical não foi incluída no estudo visto que o desarranjo natural da mesma dificulta uma análise criteriosa da presença e integridade das células ciliadas

(AQUINO, 2007). Uma vez que a varredura era feita na superfície do órgão de Corti, a imagem era congelada e fotografada, para posterior estudo, considerando-se a integridade ou lesão das CCE.

A condição de integridade ou lesão das CCE foi definida pela análise dos estereocílios destas estruturas. Células que apresentaram estereocílios com forma e disposição perfeitas foram consideradas íntegras (normais). Células com estereocílios ausentes, disformes ou em padrão de desarranjo foram consideradas lesadas (OLIVEIRA e BERNAL, 2003; HYPPOLITO et al., 2003).

### **3.2.5 Delineamento experimental**

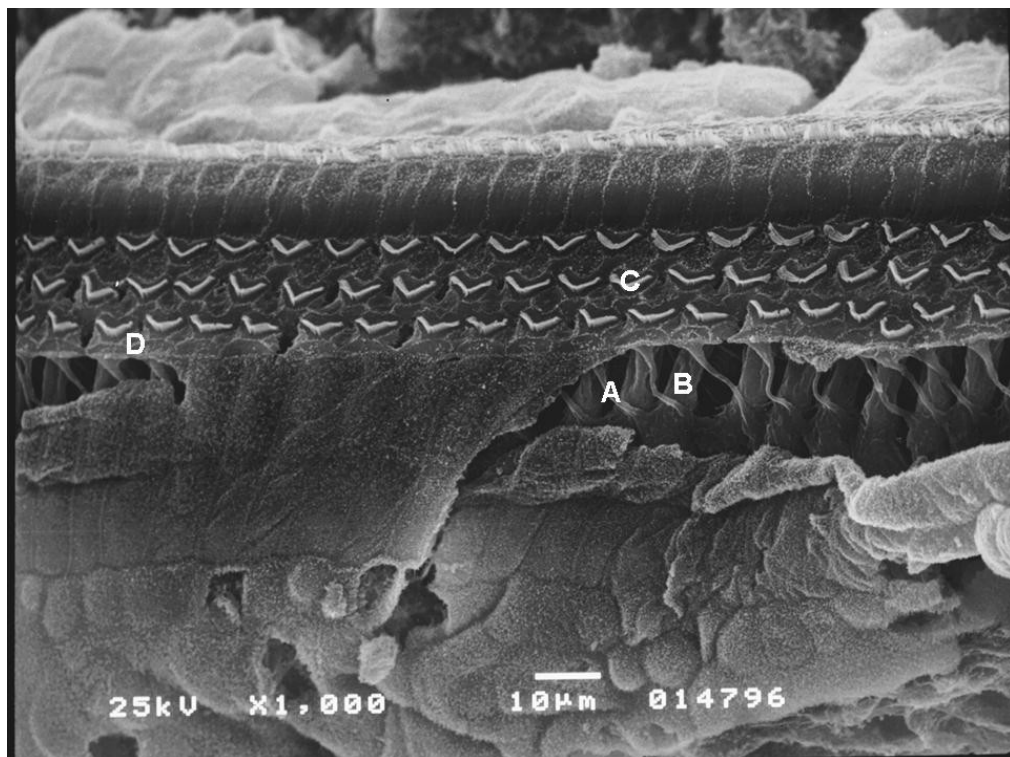
Quanto às EOAPD, foi considerada a situação de presença ou ausência de respostas. Foi adotado o delineamento experimental casualizado com um número diferente de repetições (duas a três cobaias para grupo controle e sete cobaias para cada um dos grupos expostos ao organofosforado e ao EGb).

## 4 RESULTADOS

Neste capítulo, são apresentados os resultados da pesquisa cujo objetivo consistiu em verificar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e Ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície.

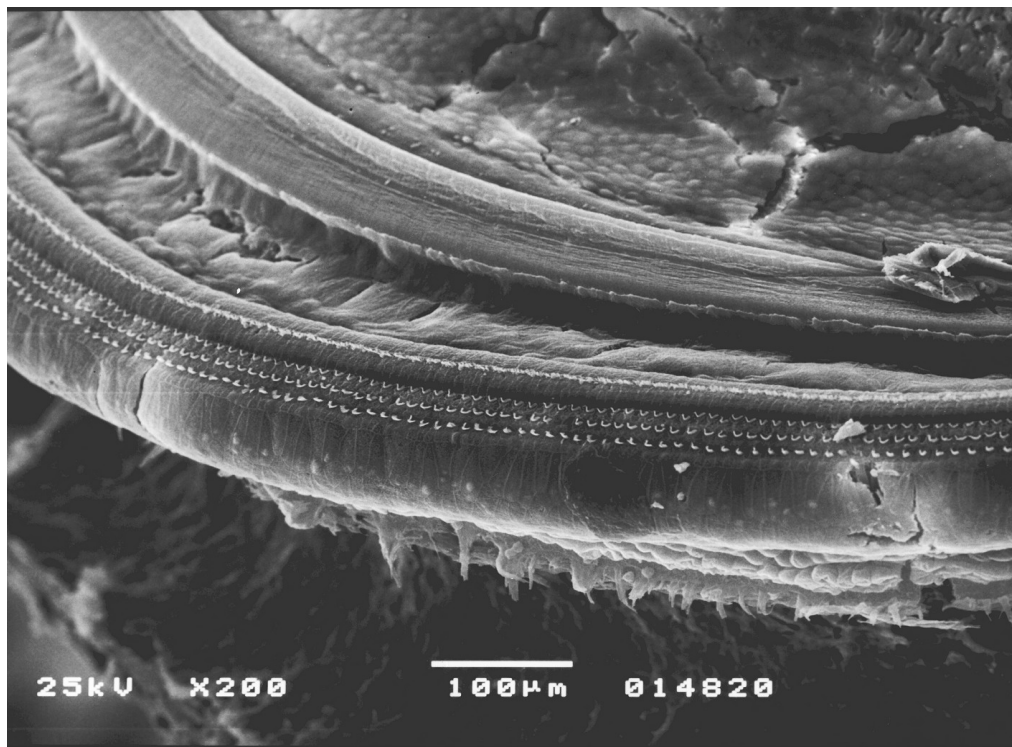
Com relação à avaliação funcional através das EOA, todas as cobaias dos cinco grupos avaliados apresentaram presença de resposta antes da aplicação do agrotóxico, totalizando 42 cócleas avaliadas.

Para identificar as lesões provocadas pela administração do agrotóxico no sistema auditivo periférico, foi realizada a MEV das cócleas. Nas cobaias do grupo 1, observou-se a manutenção da arquitetura normal das CCE (Figuras 1 e 2).



**Figura 1** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1, mostrando a Basal. Observa-se a preservação das estruturas. A: prolongamento digital da célula de Deiters; B:CCE; C: estereocílio da CCE; D: membrana reticular. Aumento de 1000x.

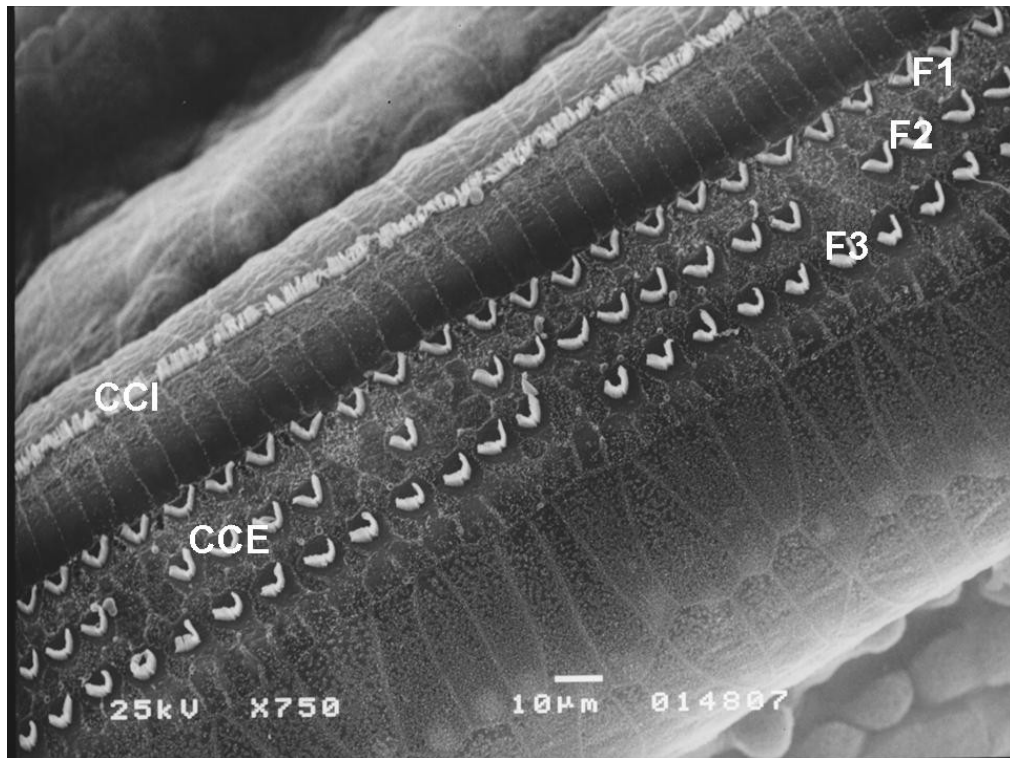




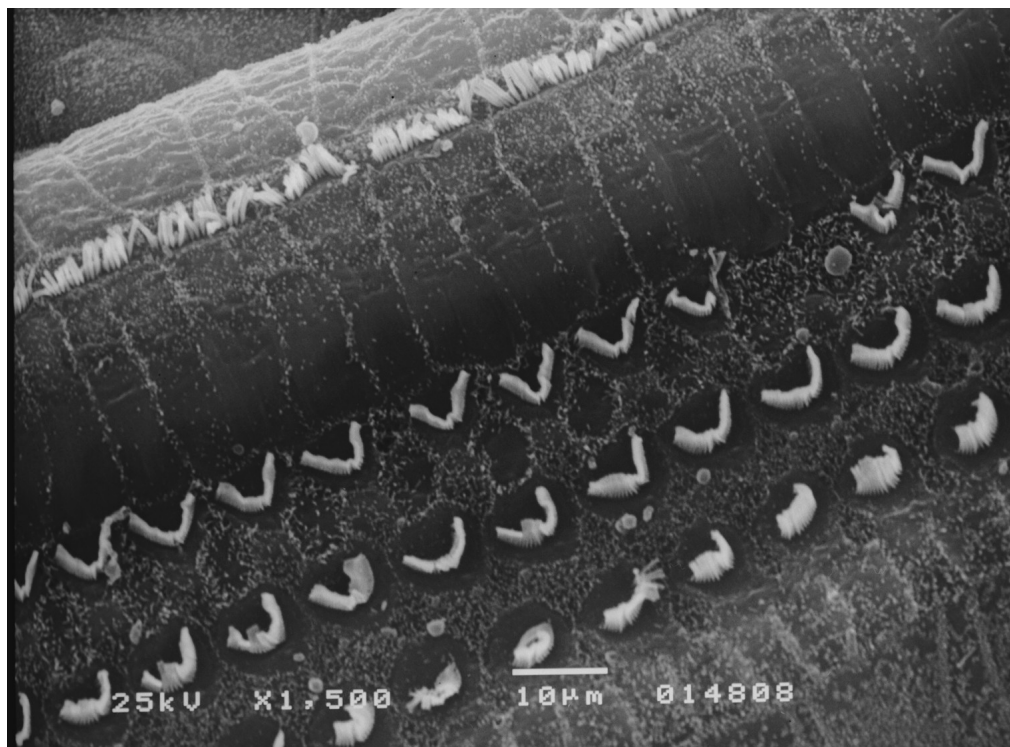
**Figura 2** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1 em “panorâmica”, mostrando a E3. Observa-se a preservação das estruturas. Aumento de 200x.

Quanto à MEV dos grupos nos quais foram administradas doses de agrotóxico, observou-se alterações morfológicas em 100% das cócleas do grupo 2 (0,3 mg/Kg/dia) e do grupo 4 (3 mg/Kg/dia), sendo as lesões mais extensas neste último grupo.

A avaliação anatômica do grupo 2, no qual foi administrado doses de 0,3 mg/Kg/dia, mostrou lesão de CCE em nível da E2 e E3, caracterizadas por distorção ciliar com desarranjo no padrão em W e encurtamento dos cílios, ou ainda, ausência dos mesmos. As alterações foram observadas na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> fileiras. As alterações estão exemplificadas nas Figuras 3 e 4.

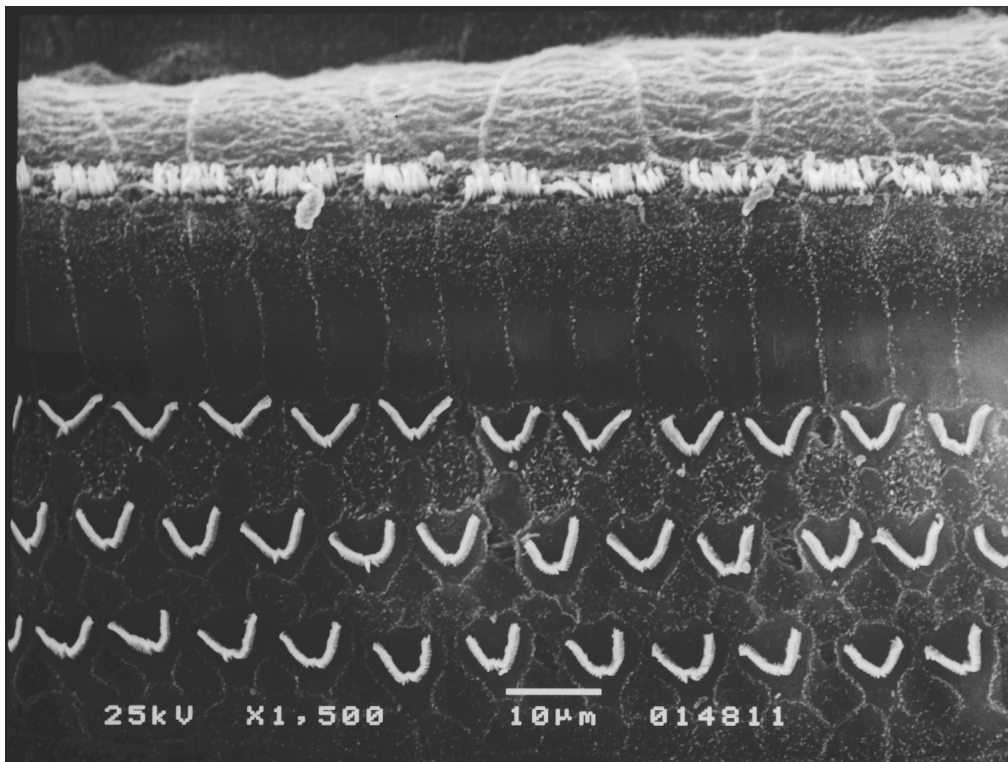


**Figura 3** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2 mostrando a E2. Observa-se ausência de CCE na F2 e F3. CCI: células ciliadas internas; CCE: células ciliadas externas; F1: fileira 1; F2: fileira 2; F3: fileira3. Aumento de 750x.

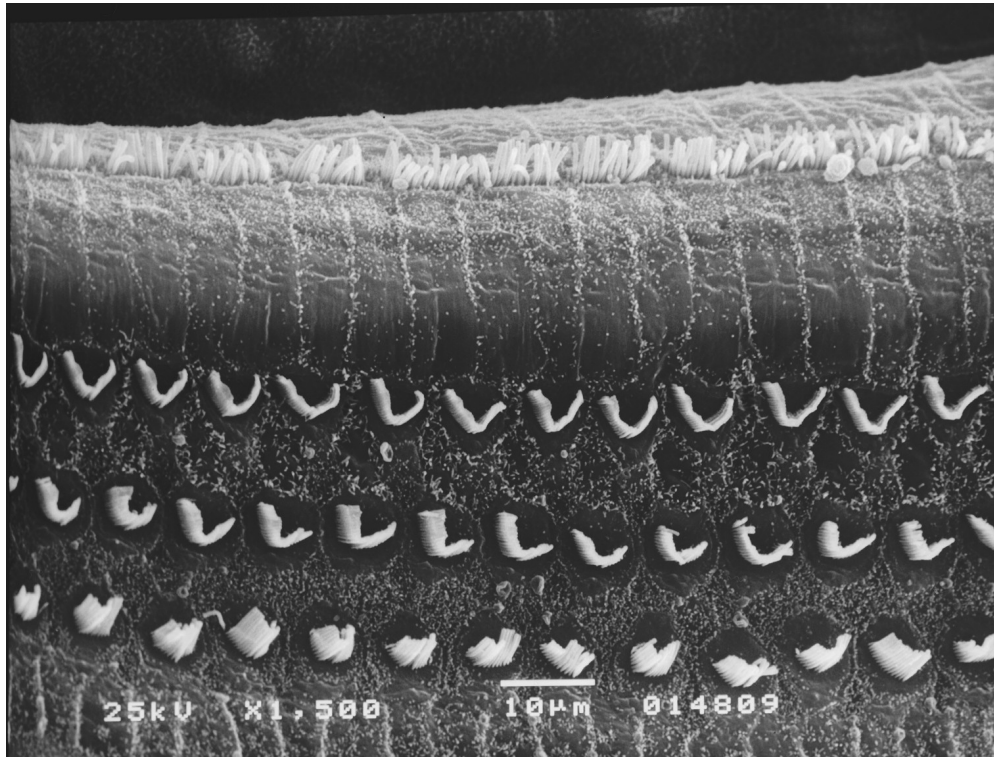


**Figura 4** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2 mostrando a E3. Observa-se ausência de CCE na F1, distorção ciliar com desarranjo no padrão em W e encurtamento dos cílios. Aumento de 1500x.

No Grupo 1 (Soro Fisiológico 0,9% - 7 dias) e no Grupo 3 (Ginkgo biloba 100mg/kg via oral 90 minutos após, metamidofós 0,3 mg/Kg/dia - 7 dias) não houve lesões significativas de células ciliadas externas à MEV em nenhuma cóclea (Figuras 1, 2, 6 e 7).

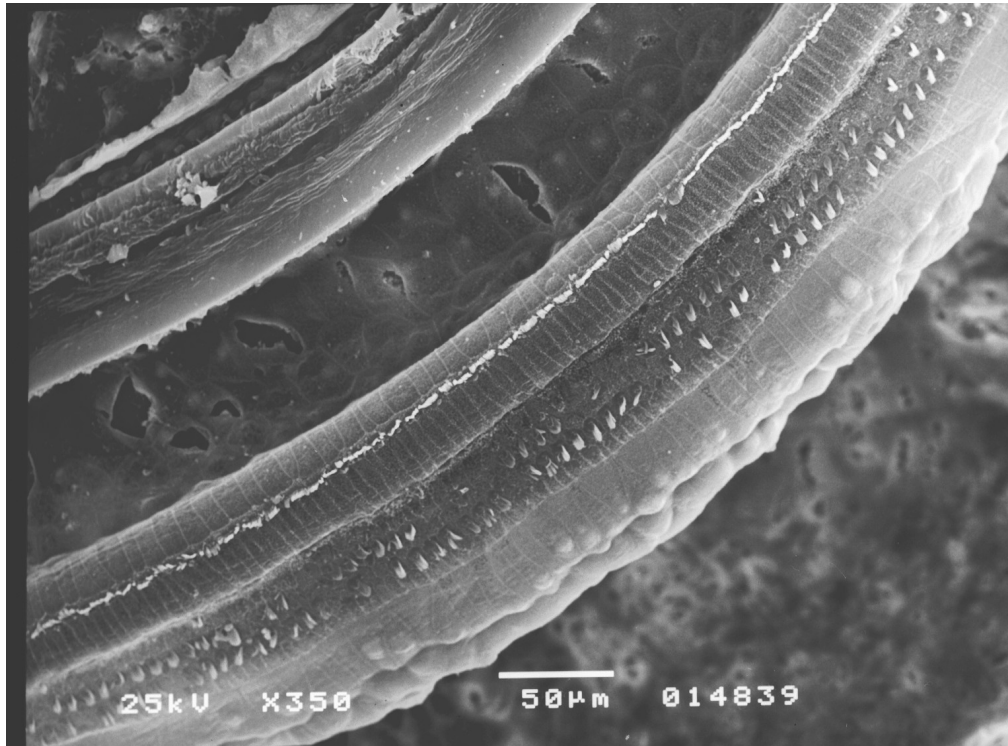


**Figura 5** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3 mostrando a Basal. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.

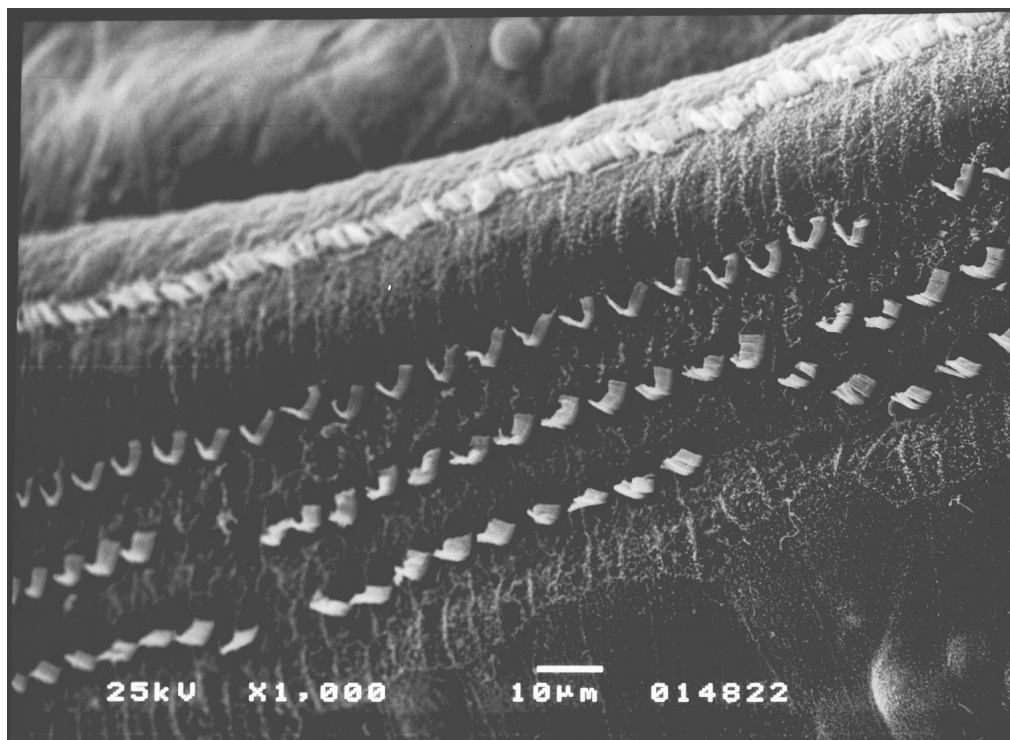


**Figura 6** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3 mostrando a E2. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.

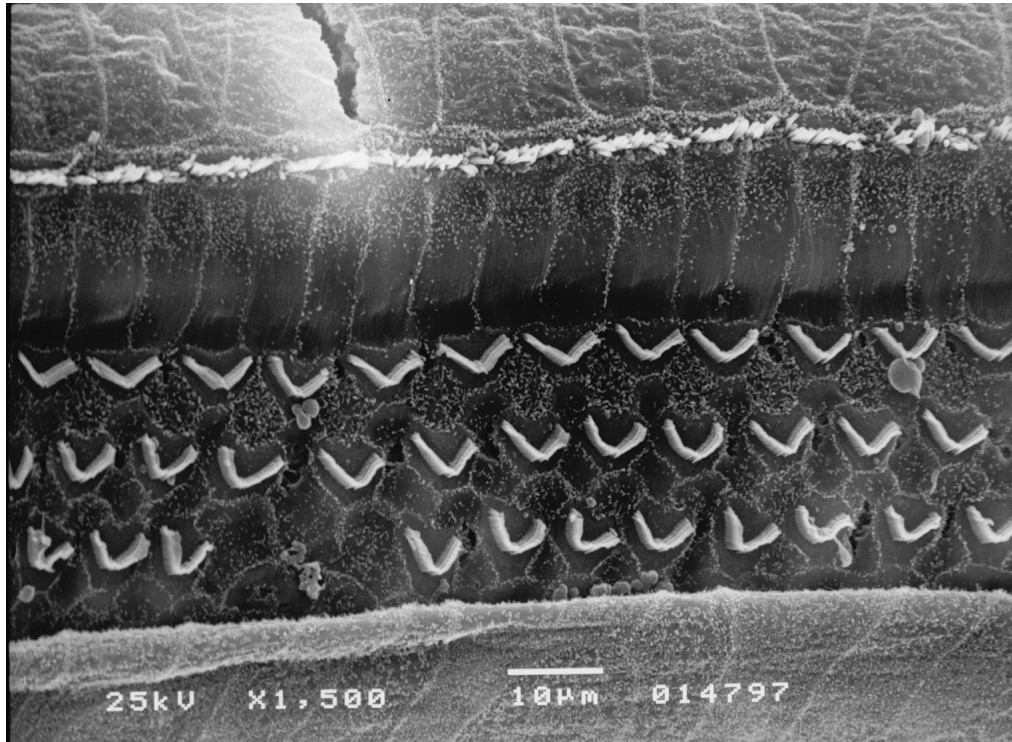
As alterações morfológicas encontradas no grupo 4, que recebeu doses de metamidofós 3,0 mg/Kg/dia - 7 dias, foram mais extensas e caracterizadas por ausência dos cílios das CCE, desarranjo no padrão em W e cílios dobrados. As alterações morfológicas encontradas na espira basal acometeram somente a 3ª fileira das CCE. Já na E3 observou-se lesão severa nas três fileiras das CCE (Figuras 7, 8 e 9).



**Figura 7** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a E3 em “panorâmica”. Observa-se ausência de CCE na F1, F2 e F3. Aumento de 350x.

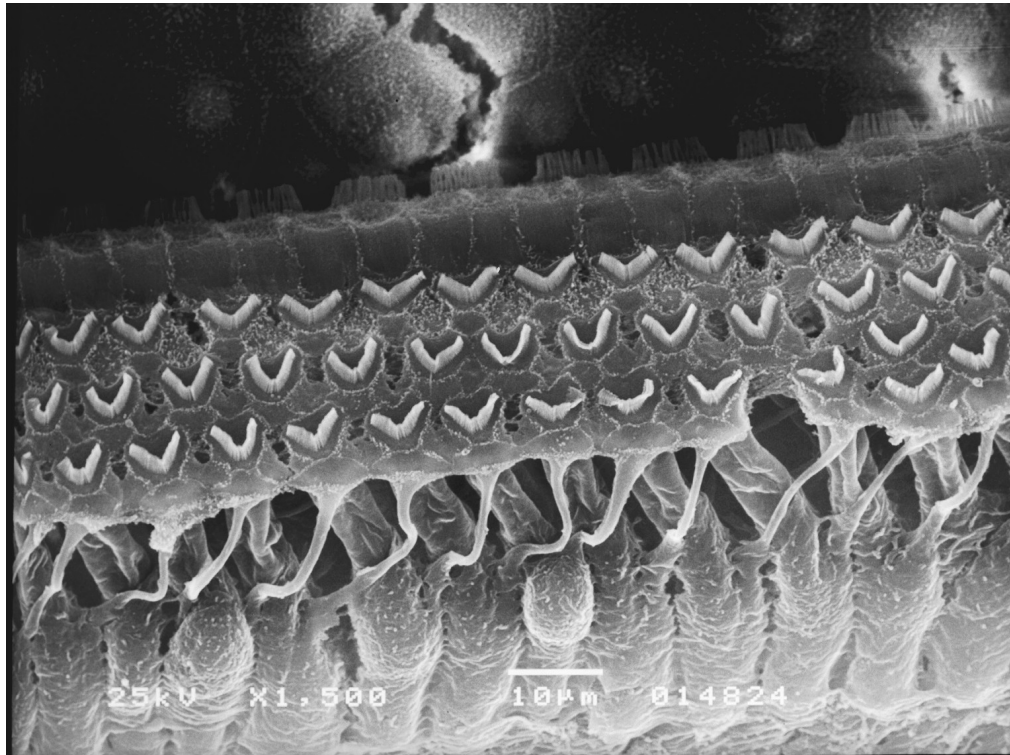


**Figura 8** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a E3. Observa-se ausência de CCE na F1, F2 e F3. Aumento de 1000x.

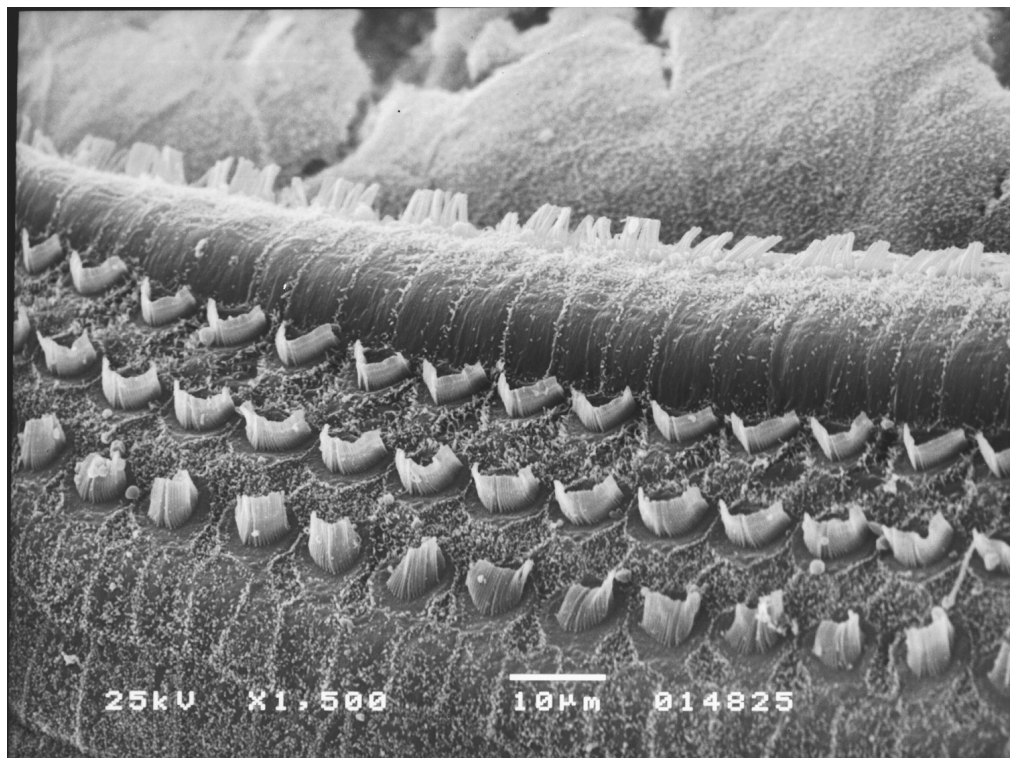


**Figura 9** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 4, mostrando a Basal. Observa-se ausência de CCE na F3. Aumento de 1500x.

No Grupo 5 que recebeu doses de 100mg/kg de Ginkgo biloba e 90 minutos após, metamidofós 3,0 mg/Kg/dia por 7 dias, 100% das CCE mantiveram-se normais ao final do experimento como pode ser observado nas Figuras 10 e 11.



**Figura 10** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 5, mostrando a Basal. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.



**Figura 11** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 5, mostrando a E2. Observa-se CCE preservadas. Aumento de 1500x.

Não consideramos a espira apical por ser um local responsável pela detecção de sons graves e os ototóxicos comprometem principalmente os sons agudos e, principalmente porque esta espira tem um desarranjo natural das células ciliadas que dificultam uma análise anatômica criteriosa. Da mesma forma não foram consideradas para efeito de estudo as CCI por serem células menos lesadas à exposição por ototóxico, comparativamente com as CCE.



## 5 DISCUSSÃO

Neste capítulo, com a finalidade de cumprir com o objetivo anteriormente proposto, realizou-se também uma correlação com resultados compilados e descritos por outros pesquisadores da área de Audiologia que buscam esclarecer as relações entre as alterações no sistema auditivo e a exposição aos agrotóxicos em seres humanos. Foram feitas correlações ainda com dados apresentados por estudiosos cujas metodologias de pesquisas estão concentradas no manejo com animais de laboratórios, principalmente cobaias.

O presente estudo buscou analisar os aspectos ultra-estruturais de cócleas de cobaias expostas a agrotóxico e Ginkgo biloba, utilizando doses comprovadamente ototóxicas, lesivas às células ciliadas externas, avaliando-se as alterações anatômicas através da microscopia eletrônica de superfície.

O modelo experimental utilizado foi a cobaia por ser um animal dócil, de fácil manejo, com orelha média e interna de bom tamanho e acesso, facilitando a dissecação e estudo. Por estes motivos, em otologia vem sendo um dos animais mais utilizados como modelo experimental (CANEDO, 1999; OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002; HYPPOLITO et al, 2003; MAUDONNET, 2005).

A análise morfológica mostrou que o tipo de lesão de CCE mais comum encontrado foi a ausência de estereocílios, seguido pela distorção ciliar com desarranjo do padrão “W”. Este achado coincide com aqueles descritos em outras publicações (OLIVEIRA; CANEDO; ROSSATO, 2002; HYPPOLITO ET AL, 2005).

Pesquisas que se estendem do final da década de 80 até o presente tem se dedicado à compreensão dos mecanismos de ototoxicidade e da utilização de drogas que atuam como otoprotetoras às células ciliadas. Acreditamos que a linha de pesquisa que estuda os mecanismos endógenos de autodefesa das células ciliadas do órgão de Corti, concomitantemente com as pesquisas genéticas e avaliação funcional, é o caminho mais racional para chegarmos a resultados concretos que nos possibilitem ter um melhor controle sobre a lesão e a prevenção da toxicidade na orelha interna.

Alguns estudos que buscaram analisar a ação do agrotóxico no sistema nervoso revelam que os sintomas ocorrem de maneira tardia, e não imediatamente após a intoxicação aguda (ALAVANJA, HOPPIN e KAMEL, 2004; ARAÚJO et al., 2007), e que, em doses baixas e repetitivas, o organofosforado possivelmente induza à perda ou afilamento de ramificações neuronais (PEREZ et al., 2006).

Analisando os achados à MEV, observou-se que as lesões provocadas pelo organofosforado no órgão de Corti são predominantemente nas CCE e progridem do ápice para a base da cóclea. Nas espiras analisadas, a primeira fileira de CCE é a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e terceira fileiras. Esta sequência de lesões também coincide com a altura das CCE, sendo a E3 a primeira a ser lesada; a segunda espira que sofre maior lesão do organofosforado é a E2; a espira basal é a terceira espira com o maior número de alterações. As células localizadas na espira apical não foram analisadas, uma vez que esta espira apresenta naturalmente uma configuração de desarranjo celular.

Estudos realizados por Aquino, Oliveira e Rossato (2008) em cobaias submetidas a drogas ototóxicas revelam resultado divergente aos do presente estudo, quanto à observação à MEV. Na exposição à amicacina, lesões ocorreram predominantemente nas duas primeiras espiras que, desta forma, apresentaram um menor número de CCE normais do que na E3, já as alterações estruturais encontradas neste estudo corroboram com onde encontraram alterações mais intensas na primeira fileira de CCE, seguidas pela segunda fileira.

Em pesquisas realizadas com cisplatina, autores como Kasse et al. (2008) descreveram lesões extensas das CCE na porção basal da cóclea, concordando com Hyppolito et al. (2005), segundo os quais as alterações mais evidentes também foram verificadas na espira basal, com ausência de cílios nas três fileiras de CCE, seguida pela E2 e E3, respectivamente. Em nível de CCI também foram observadas modificações ciliares, com cílios presentes, porém em padrão de desarranjo.

Neste estudo, os animais que receberam o extrato de Ginkgo biloba 90 minutos antes do agrotóxico mativeram a citoarquitetura das CCE e não apresentaram alterações estruturais no órgão de Corti. Tais achado concordam com os resultados da pesquisa de Fukaya e Kanno (1999), que estudaram, em ratos, os efeitos da ginkgo biloba como otoprotetor aos danos causados às células ciliadas externas pela cisplatina. Utilizaram a dose de 1,0 mg/ Kg/ dia por 10 dias consecutivos e 90 minutos após as cobaias receberem 100 mg/ Kg /dia de ginkgo biloba. Verificaram através de medidas do potencial de ação e por microscopia eletrônica de superfície que existe um efeito protetor porque a ginkgo biloba reduz a peroxidação lipídica e atua removendo do meio intracelular ânions superóxidos e radicais livres.

O EGb 761 age como limpador de radicais livres por impedir a peroxidação lipídica, aumentar os níveis de GSH e a atividade de enzimas antioxidantes, assim como possui uma atividade superóxido-dismutase (SOD) (Huang, Whitworth e Rybak, 2007). Dessa forma, o EGb 761 contribuiu para impedir o efeito ototóxico do metamidofós. Seus princípios ativos, em especial, ginkgolídeos e flavonóides seriam os responsáveis pelos efeitos antioxidantes, e

acredita-se que eles migrem para a orelha interna (Fukaya e Kanno, 1999), assim comprovamos neste estudo que o EGb 761, exerceu efeitos sobre a toxicidade induzida pelo organofosforado - metamidofós.

A Ginkgo biloba apresenta propriedades antioxidantes, atua diminuindo a peroxidação lipídica, aumentando os níveis de catalase, superóxido dismutase e glutathione. No plasma, também atua formando complexos com fosfolípidos, aumentando sua atividade antioxidante. Em nível intracelular, atua em mitocôndrias, na fosforilação oxidativa do RNA mitocondrial e a nível do Complexo de Golgi, auxiliando no mecanismo de reparo do DNA com melhora do "status antioxidante" celular, com aumento dos níveis de glutathione intracelular e diminuição na incorporação de 3H-timidina (FOSSLIEN, 2001).

Como Fukaya e Kanno (1999), observamos que existe um efeito protetor da ginkgo biloba para as células ciliadas externas, pois não encontramos lesão celular às células ciliadas externas na microscopia eletrônica de varredura, na espira basal da cóclea, nem nas espiras E2 e E3 após 7 dias consecutivos de uso de agrotóxico nas doses de (0,3 mg/ Kg/ dia e 3,0 mg/ Kg/dia), quando em associação com a Ginkgo biloba,

Considerando os mecanismos de ototoxicidade, relacionados aos mecanismos de oxidação celular e formação de radicais livres, e, sendo que o extrato de ginkgo biloba leva à redução da peroxidação lipídica, com limpeza de superóxidos, impedindo a formação de radicais livres, além de ser um medicamento largamente utilizado em humanos e com efeitos colaterais considerados pouco significativos e as evidências de otoproteção ao metamidofós, existe a possibilidade de uso concomitante da ginkgo biloba e metamidofós para tentar-se minimizar os efeitos ototóxicos deste agente. Assim, o extrato de Ginkgo biloba tem um efeito protetor para as CCE, em cócleas de cobaias contra a ação ototóxica do metamidofós.

## **6 CONCLUSÃO**

Em função dos resultados obtidos conclui-se que:

1. Quanto maior a exposição ao agrotóxico maior o dano nas CCE da cóclea de cobaias albinas, já aquelas que recebem previamente o ginkgo biloba mantém a citoarquitetura das CCE preservadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVANJA, M.C.R.; HOPPIN, J.A.; KAMEL, F. Health effects of chronicle pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. **Annual Review of Public Health**, v. 25, p. 155-197, 2004.

ALMEIDA, C.I.R.; ALMEIDA, R.R.; DUPRAT, A.C. Ototoxicidade. **Folha Médica**, v. 106, n. 3, p. 79-84, 1993.

AMES, R.G.; STEENLAND, K.; JENKINS, B.; CHRISLIP, D.; RUSSO, J. Chronic neurological sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. **Archives of Environmental Health**, v. 50, p. 440-444, 1995.

AQUINO, T.J.M. **Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais**. 2007. 1000 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

AQUINO, T.J.M.; OLIVEIRA, J.A.A.; ROSSATO, M. Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 74, n. 6, p. 843-852, 2008.

ARAÚJO, A.J.; LIMA, J.S.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; SOARES, M.O.; MONTEIRO, M.C.M.; et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

AZEVEDO, A.P.M. **Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional**. 2004. 162 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2004.

CALDAS, E.D.; SOUZA, L.C. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 529-537, 2000.

CAMPO, P. **Auditory effects of solvents on laboratory animals**. Best Practices Workshop: combined effects of chemicals and noise on hearing. Apr 11-12; Cincinnati, Ohio. p. 17-22, 2002.

CANEDO, D.J.M. Resistência a ação ototóxica de antibióticos aminoglicosídeos. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, 1999, 66p.

CAVALIERE, M.J.; CALORE, E.E.; PEREZ, N.M.; PUGA, F.R. Miotoxicidade por Organofosforados. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n.3, p. 267-272, 1996.

CHARAGNAC, J.L. La Trivasoregulation: Étude d' un trivasorégulateur: l' extract de Ginkgo biloba. **Doctoral Thesis**, Bichat-Beujon, Paris, 1976.

DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 180-186, 2004.

DIAMOND, B. J. et al. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. **Arch Phys Med Rehabil**. Newark, v. 81, n.5, p. 668-678, 2000.

DUBREIL, C. Essai thérapeutique dans les surdités cochléaires aiguës. **La Presse Médicale**. 15(31): 1559-61, 1986.

FECHTER, L. Mechanisms of ototoxicity by chemical contaminants: prospects for intervention. In: Cochlear pharmacology and noise trauma (Prasher, D., & Canlon, B. eds.), pp.129-149, London: **Noise Research Network Publications**, 1999.

FOSSLIEN E. Mitochondrial medicine—molecular pathology of defective oxidative phosphorylation. **Ann Clin Lab Sci** 2001;31(1):25-67.

FUKAYA H, KANNO H. Experimental studies of the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on cisplatin-induced toxicity in rats. **Nippon Jibiinkoka**, Gakkai Kaiho, 102:907, 1999.

GARDÈS-ALBERT, M.; FERRADINI, C.; SEKAKI, A.; DROY-LEFAIX, M.T. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202, in: FERRADINI, C.; DROY-LEFAIX, M.T.; CHRISTEN, Y. **Advances in Ginkgo biloba extract research**, v.2. Ginkgo biloba extract (EGb 761) as a free-radical scavenger, Paris:Elsevier, p.1-11, 1993.

GURGEL, I. D. Repercussão dos agrotóxicos na saúde dos agentes de saúde pública em Pernambuco. 1998. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife.

GOLD, P.E; CAHILL, L. WENK, G.L. Ginkgo biloba: a cognitive enhancer? **Psychological Science in the public interest**. V.3, n.1, p.2-11, 2002.

HARELL, M.; SHEA, J.J.; ERMMETT, J.R. Bilateral sudden deafness following combined insecticide poisoning. **The Laryngoscope**, v. 88, p. 1348-1351, 1987.

HOSHINO, A.C.H.; PACHECO-FERREIRA, H.; TAGUCHI, C.K.; TOMITA, S.; MIRANDA, M.F. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 74, n. 6, p. 912-918, 2008.

HUANG, X.; WHITWORTH, C.A.; RYBAK, L.P. Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects against cisplatin-induced ototoxicity in rats. **Otol Neurotol**, Springfield, v.28, n.6, p. 828-33, 2007.

HYPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, J.A.A.; CANEDO, D.M.; ROSSATO, M.; HOLANDA, F. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 504-511, 2003.

HYPOLITO, M.A; OLIVEIRA, A.A; LESSA, R.M; ROSSATO, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões

otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. *Rev. Bras. Otorrinol.* v. 71, p. 268-273, 2005.

JERO, J.; COLING, D.E.; LALWANI, A.K. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. *Acta Otolaryngologica*, Canadá, v. 121, n. 5, p. 585-589, 2001.

JOHNSON A.C. The ototoxic effect of toluene and the influence of noise, acetylsalicylic acid or genotype: a study in rats and mice. *Scandinavian Audiology*, suppl, v. 30, p. 1-40, 1993.

JUDKINS R.F.; LI H. Surgical anatomy of the rat middle ear. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;117(5):438-47.

KASSE, C.A.; CRUZ, O.L.M.; ILHA, L.C.N.; COSTA, H.O.; LOPES, E.C.; COELHO F. O uso de *Maytenus ilicifolia* na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, São Paulo, v. 74, n. 5, p. 712-717, 2008.

KÓS, A.O.; KÓS, M.I. Etiologia das perdas auditivas e suas características audiológicas. In: FROTA, S. (org.). **Fundamentos em Fonoaudiologia – audiológica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 131-135.

KÖRBES, D. **Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias: estudo anatômico e funcional**, 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana – UFSM, Santa Maria.

LEMUS, R.; ABDELGHANI, A. Chlorpyrifos: an unwelcome pesticide in our homes. *Archives of Environmental Health*, v. 15, n. 4, p. 421-433, 2000.

LIMA, F.J. da C.; MARQUES, P.R.B. de O.; NUNES, G.S.; TANAKA, S.M.C.N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 11, p. 17-34, 2001.

MACLENNAN, K.M.; DARLINGTON, C.L.; SMITH, P.F. The CNS effects of Ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol.*, v.67, n.3, p. 235-257, 2002.

MAHADY, G.B. **Ginkgo biloba: A Review of Quality, Safety and Efficacy**. Nutritional in Clinical Care, Washihgton, v.4, ed.3, p. 140, 2001.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M.T.; PACKER, L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem Pharmacol.*, v.49, p.1649-1655, 1995.

MAJOR, R.T. The Ginkgo, the most ancient living tree. The resistance of Ginkgo biloba L. to pests accounts in part for the longevity of this species. *Science*, Charlottesville, v. 157, n.3794, p. 1279-1273, 15 sept. 1967.

MAHADEVAN, S.; PARK, Y. Multifaceted Therapeutic Benefits of Ginkgo biloba L.: Chemistry, Efficacy, Safety and Uses. *J. Food Sci*, Amherst, v. 73, n.1, p. 14-19, 2008.

MANJABOSCO, C.A.W. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. In: MORATA, T.C.; ZUCKI, F. (org.). **Caminhos para a saúde auditiva: ambiental-ocupacional**. São Paulo: Plexus, 2005. p. 53-66.

MAUDONNET, E.N. Autoproteção contra ototoxicidade da gentamicina. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina, Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, 2005, 82p.

MELLO, A.P.; WAISMANN, W. Exposição ocupacional ao ruído e químicos industriais e seus efeitos no sistema auditivo: revisão de literatura. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 8, n. 3, p. 226-234, 2004.

MEYER, A.; CHRISMAN, J.; MOREIRA, J.C.; KOIFMAN, S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 93, n. 3, p. 264-271, 2003.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Liraria Varela, 2000.

MINAMI, S.B.; SHA, S.H.; SCHACHT, J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. **Hear. Res.** V.198, p.137-143,2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Gabinete do Ministro. Portaria n.º 157, de 19 de fevereiro de 1998. **Programa de agente Comunitário de Saúde – PACS e PSF**. Disponível em: [HTTP://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/prog\\_pacs\\_psf/GM\\_P157\\_98prog\\_pacs\\_psf.doc](http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/prog_pacs_psf/GM_P157_98prog_pacs_psf.doc). Acesso em: 15 mar. 2010.

MORATA, T.C.; NYLÉN, P.; JOHNSON, A-C. & DUNN, D.E. Auditory and Vestibular functions after single or combined exposure to toluene: a review. *Archives of Toxicology*, 69:431-443, 1995.

MORATA, T.C.; LITTLE, B. Suggested guidelines for studying the combined effect of occupational exposure to noise and chemicals on hearing. **Noise & Health**, London, v. 4, p. 73-87, 2002.

MORATA, T.C. Chemical exposure as a risk factor for hearing loss. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 45, p. 676-682, 2003.

MORGAN, M.K.; SHELDON, L.S.; CROGHAN, C.W.; JONES, P.A.; ROBERTSON, G.L.; CHUANG, J.C.; et al. Exposures of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in their everyday environments. **Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology**, v. 15, p. 297-309, 2005.

OLIVEIRA, J.A.A. **Audiovestibular toxicity of drugs**. V.I e v.II, Flórida, Boca Raton CRP Press, 1989.

OLIVEIRA, J.A.A.; CANEDO, D.M.; ROSSATO, M. Autodefesa contra a ototoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Otorringologia**, São Paulo, v. 68, n.1, p.7-13, 2002.



OLIVEIRA, J.A.A.; BERNAL, T.M.O. Ototoxicidade de aminoglicosídeos e otoproteção. In: CAMPOS, C.A.H.; COSTA, H.O.O. **Tratado de Otorrinolaringologia**. São Paulo: Roca, 2003. p. 148-167.

PELEGRINO, J.R.; CALORE, E.E.; SALDIVA, P.H.N.; ALMEIDA, V.F.; PERES, N.M.; VILELA-DE-ALMEIDA, L. Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 251-255, 2006.

PEREZ, N.M.; CALORE, E.E.; VILELA-DE-ALMEIDA, L.; NARCISO, E.S.; PUGA, F.R. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 50-53, 2006.

PINILLA M, RAMÍREZ-CAMACHO R, JORGE E, TRINIDAD A, VERGARA J. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 2001;124(5):515-7

PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA, M.C.P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na Microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 804-814, 2005.

RAMOS, G.E. **Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola**. São Paulo: Andrei, 1999. 672 p.

RENN, P. Treatment of acute cochlear deafness with Ginkgo biloba extrais (EGb 761) and hyperbaric oxygen therapy. **Revue Otoneuroophthalmol**. 1993; 26:29-33.

RYBAK LP, RADHIKA R, SOMANI SM. Mechanism of Protection by Diethyldithiocarbamate against Cisplatin Ototoxicity: Antioxidant System. **Fundamental and Applied Toxicology**, 26:293-300, 1995.

SALLES JUNIOR, C.G.; FARO, L.R.F. Efeitos comportamentais produzidos pela exposição aguda a pesticidas organofosforados. Artigos de Iniciação Científica. **Revista Científica da UFPA**, Pará. Disponível em: 05/02/2010.

<http://www.cultura.ufpa.br/rcientifica/cabecalho.php?conteudo=8.155>. Acesso em: 13 fev. 2010.

SANTOS P.F. Achados otomicroscópicos e histológicos da miringoesclerose induzida em ratos: estudo crítico de um modelo experimental. **Rev Bras Otorrinolaringol**. 2005;71(5):668-74.

SCHANAIDER A, SILVA P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir Bras**. 2004;19(4): 441-7;

SHOLTYSSEK, H.; DAMERAU, W.; WESSEL, R.; SCHIMKE, I. Antioxidative activity of ginkgolides against superoxide in an aprotic environment. **Chem Biol Interact.**, v. 106, n.3, p.183-190, 1997.

SOARES, W.; ALMEIDA, R.M.V.R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1117-1127, 2003.

SOBREIRA, A. E. G.; ALMEIDA, C. V.; ADISSI, P. J.; ARAÚJO, R. M. **Riscos e desgastes no trabalho com agrotóxicos: o caso de Maravilha/Boqueirão** – PB. 1998. Disponível em: <<http://www.alast.org/PDF/benencia/MyTR-Adissi.DPF>>. Acesso em: 10 fev. 2010.

SOCKALINGAM R, FREEMAN S, CHERNY TL, SOHMER H. Effect of high-dose cisplatin on auditory brainstem responses and otoacoustic emissions in laboratory animals. **Am J Otol**, 21(4):521-7, 2000.

STEFANI, E.; MATUSUYAMA, C.; MELO, R.R. Otoxidade por inseticida doméstico: relato de um caso. **Anais do 33º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia e 4º Congresso Norte Nordeste de Otorrinolaringologia**, Recife, 1996.

STENGES CHM, KLIS SFL, HUIZING EH, SMOORENBURG GF. Protective Effects of a Neurotrophic ACTH (4-9) Analog on Cisplatin Ototoxicity in Relation to the Cisplatin Dose: An Electrocochleographic Study in Albino Guine Pigs. **Hearing Res**, 124:108-17, 1998.

TEIXEIRA, C.F.; BRANDÃO, M. F.A. Efeitos dos agrotóxicos no sistema auditivo dos trabalhadores rurais. **Caderno Informativo de Prevenção de Acidentes**, Brasil, v. 19, p. 46-52, 1998.

VAN BEEK, T.A. Chemical analysis of Ginkgo biloba leaves and extracts, **Journal Chromatogr A**, v. 967, p. 21-55, 2002.

## **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA. PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA. Estrutura e apresentação de monografias, dissertações e teses-MDT/UFSM.PRPGP-6.ed. ver. E ampl. – Santa Maria: Ed da UFSM, 2006.

## ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 175/2009, sobre o projeto intitulado “*Estudo anatômico e eletrofisiológico da otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas no uso de agrotóxicos*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Miguel Ângelo Hyppolito** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 27 de outubro de 2009.

(We certify that the protocol nº 175/2009, about “*Otoprotection to occupational exposure to chemicals on hearing using Ginkgo Biloba: anatomic and electrophysiologic studies*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 10/27/2009 meeting.

Ribeirão Preto, 27 de outubro de 2009.

**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal