

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

**AUDIÇÃO E BIOMARCADORES DO METABOLISMO
OXIDATIVO EM ESCOLARES DE REGIÃO
FUMICULTORA DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Letícia Regina Kunst

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**AUDIÇÃO E BIOMARCADORES DO METABOLISMO
OXIDATIVO EM ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA
DO RIO GRANDE DO SUL**

Letícia Regina Kunst

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição e Equilíbrio: diagnóstico, habilitação, reabilitação, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana**

Orientador: Prof^o. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Michele Vargas Garcia

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Kunst, Leticia Regina

Audição e biomarcadores do metabolismo oxidativo em escolares de região fumicultora do Rio Grande do Sul / Leticia Regina Kunst.-2013.

99 p.; 30cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira

Coorientadora: Michele Vargas Garcia

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2013

1. Fumicultura 2. Escolares 3. Emissões otoacústicas
4. Sistema olivococlear medial 5. Biomarcadores do metabolismo oxidativo I. Ferreira da Silveira, Aron II. Vargas Garcia, Michele III. Título.

© 2013

Todos os direitos autorais reservados a Leticia Regina Kunst. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Av. Itaimbé, 655, apto 307, Centro, Santa Maria/RS.

Fone: (55) 9623-1801

End. Eletr: leticiakunst@yahoo.com.br

**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**

**AUDIÇÃO E BIOMARCADORES DO METABOLISMO OXIDATIVO EM
ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA DO RIO GRANDE DO SUL**

elaborada por
Letícia Regina Kunst

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Aron Ferreira da Silveira, Prof^o. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Michele Vargas Garcia, Prof^a. Dra. (UFSM)
(Co-orientadora)

Pricila Sleifer, Prof^a. Dra. (UFRGS)

Valdete Valetins dos Santos Filha, Prof^a, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 01 de Março de 2013

Dedicatória

A minha **Família**:

Aos meus pais **José e Miria**,
pelo amor incondicional, pelos valores
ensinados, pelo incentivo constante e
por sempre estarem ao meu lado
e me mostrarem que, apesar das dificuldades,
no final tudo vale a pena.

Ao meu irmão **Leonardo** (o Gordo),
pelo amor, amizade, conselhos e confiança.

A **Jea**, minha segunda mãe!
Não encontro palavras para agradecer
por tudo que fizeste por mim.
Com certeza sem você ao meu lado
tudo seria mais difícil. Obrigada pela acolhida,
paciência, amor, amizade, apoio e por sempre
acreditar em mim e me impulsionar
a buscar mais e mais.

A **Tita** e a **Vó Maria**,
por não medirem esforços para me verem
feliz e realizar meus sonhos!

A vocês eu dedico esta dissertação e todo meu amor!

AGRADECIMENTOS

Talvez eu não consiga expressar em palavras escritas a minha gratidão a todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho. A todos vocês, meu mais sincero OBRIGADA!

A Deus, por me dar a vida, luz para guiar o meu caminho e força para não desistir e realizar meus sonhos e objetivos.

Aos meus orientadores, Dr. Aron e Dra. Michele, por terem me acolhido e acreditado em mim. Obrigada pelos ensinamentos, incentivo, paciência, amizade e carinho.

A prof^a Dra. Tania, minha primeira orientadora, pelos ensinamentos transmitidos!

A Dra. Pricila Sleifer, Dra. Maria Fernanda e a Dra. Valdete Valentins pelas grandiosas contribuições a esta dissertação.

A Daya, por estar sempre ao meu lado. Pela amizade, companheirismo, aprendizados, disponibilidade e pelos inúmeros favores prestados.

Ao Alencar, meu Anjo da Guarda! Obrigada pela parceria, aprendizado, paciência, incentivo e amizade. Serei eternamente grata a você!

As minhas colegas e amigas: Enma, Ailime, Famy, Lari, Vane, Lu, Amanda e Licia pela amizade, apoio constante e pelos inúmeros momentos de alegria e descontração.

As minhas maninhas de projeto: Tai, Caci, Daila, Gra e Simi pela amizade, parceria, auxílio e carinho.

Ao Renato por todo auxílio prestado e por nos dar a Agatha - minha parceria fiel nas longas madrugadas de estudo.

Ao pessoal do laboratório Biogenômica, do CEREST, da Escola de Ensino Fundamental Três de Maio e da Prefeitura Municipal de Agudo por terem me recebido e tornado possível a realização deste trabalho.

As crianças que participaram deste estudo, seus pais, professores e escola, pelo apoio e carinho.

Aos meus professores do curso de Fonoaudiologia e do PPGDCH, aos colegas de mestrado e das ATFONs 2009, 2010 e 2011 pelos conhecimentos compartilhados.

A Todos que de alguma forma estiveram ao meu lado nesta longa trajetória: Obrigada!

***“Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às
pessoas, que a vida é bela sim e que eu sempre dei
o melhor de mim... e que VALEU A PENA.”***

Mário Quintana

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana
Universidade Federal de Santa Maria

Audição e biomarcadores do metabolismo oxidativo em escolares de região fumicultora do Rio Grande do Sul

Autora: Letícia Regina Kunst
Orientador: Aron Ferreira da Silveira
Co-orientadora: Michele Vargas Garcia

Objetivo: avaliar o sistema auditivo e o metabolismo oxidativo de escolares residentes de região fumicultora. **Material e método:** Participaram do grupo estudo (GE) 21 escolares normo-ouvintes residentes de região fumicultora e, do grupo controle (GC) 25 escolares normo-ouvintes que não residiam na zona rural. O sistema auditivo foi avaliado por meio das emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) e supressão das EOAPD. Os biomarcadores do metabolismo oxidativo foram: ensaio cometa, teste de micronúcleos (MN), Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) referente a taxa de radicais livres e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** os escolares de ambos os grupos apresentaram EOAPD presentes. Detectou-se diferença significativa, entre os grupos, na orelha direita (OD) na frequência de 4000 Hz e na orelha esquerda (OE) na frequência de 2000 Hz, sendo a média de amplitude das EOAPD do GE menor que a do GC. Quanto à média da amplitude das duas orelhas, a do GE apresentou-se inferior em todas as frequências, verificando-se diferença significativa nas frequências de 2000 e 4000 Hz. Na média geral da amplitude das EOAPD por orelha, não foi observada diferença significativa. Referente à ocorrência do efeito de supressão, os sujeitos de ambos os grupos apresentaram efeito de supressão das EOAPD presente. Ao comparar a ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos, não foi detectada associação estatística significativa. Quanto os biomarcadores do metabolismo oxidativo: no ensaio cometa, taxa de produção de radicais livres e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA a média do GE mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC. No teste de MN, verificou-se diferença significativa quanto ao somatório de células alteradas e a frequência de células binucleadas, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. Já, referente à frequência de células com MN não observou-se diferença significativa entre os grupos. Verificou-se associação entre amplitude das EOAPD e os biomarcadores do metabolismo oxidativo, porém quanto a supressão das EOAPD esta associação não foi observada. **Conclusão:** Ambos os grupos obtiveram EOAPD e efeito de supressão das EOAPD presentes, porém o GE apresentou uma diminuição na média da amplitude das EOAPD em todas as frequências. O GE apresentou índice significativamente mais elevado em todos os biomarcadores do metabolismo oxidativo. Foi verificada associação entre nível de resposta das EOAPD e os resultados dos testes de verificação do metabolismo oxidativo.

Palavras-chave: praguicidas, fumo, audição, estresse oxidativo e criança.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Program of Post-graduation in Human Communication Disorders
Federal University of Santa Maria

Hearing and biomarkers of oxidative metabolism in students of a tobacco-producing region of Rio Grande do Sul

Author: Leticia Regina Kunst
Advisor: Aron Ferreira da Silveira
Co-Advisor: Michele Vargas Garcia

Objective: to evaluate the auditory system and the oxidative metabolism of students who lived in a tobacco-producing region. **Methods:** 21 normal-hearing students from the tobacco-producing region, study group (SG), and 25 normal-hearing students who did not live in the countryside, control group (CG), participated of this research. The auditory system was evaluated by the distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE) and by the suppression of DPOAE. The biomarkers of oxidative metabolism were: comet assay, micronuclei test (MN), dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for the rate of free radicals and fluorimetric assay for the quantitation of DNA. The data were exposed to statistical analysis. **Results:** The students of both groups revealed DPOAE presented. A significant difference was detected between groups in relation to the right ear (RE) in the frequency of 4000 Hz and to the left ear (LE) in the frequency of 2000 Hz, with a mean of SG lower than the one found for the CG. Considering the mean of both ears, the SG presented lower mean among all the frequencies and it was found a significant difference in the frequencies of 2000 and 4000 Hz. Considering the overall mean of DPOAE by ear, it was observed no significant differences. In relation to the occurrence of suppression, the individuals of both groups showed suppression effect of DPOAE presented. By comparing the occurrence of suppression of DPOAEs, between groups, no statistically significant association was detected. Concerning the biomarkers of oxidative metabolism: the comet assay, the rate of production of free radicals and fluorimetric assay for quantitation of DNA; the mean of the SG was significantly higher than the one found in the CG. In the MN test, it was found a significant difference in the sum of abnormal cells and the frequency of binucleated cells, with the mean of the SG higher than the mean of the CG. And, in relation to the frequency of cells with MN, it was verified no significant difference between both groups. It was verified an association between amplitudes and biomarkers of oxidative metabolism, but as the suppression of DPOAE this association was not observed. **Conclusion:** Both groups revealed DPOAE and suppression effect of DPOAE presented, but the SG showed a decrease in mean amplitudes at all frequencies. The SG showed a significantly higher index in all biomarkers of oxidative metabolism. It was verified association between level response of DPOAE and the results of the oxidative metabolism verification tests.

Keywords: pesticides, tobacco, hearing, oxidative stress and child.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação do Dano ao DNA.....29

Figura 2 - Classificação das células do teste de MN.....31

Artigo 1

Figura 1 – Classificação das células do teste de MN.....41

Artigo 2

Figura 1 - Classificação do Dano ao DNA.....64

Figura 2 - Classificação das células do teste de MN.....65

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 – Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) da amplitude de resposta das EOAPD, por frequência e média geral da OD, OE e média da OD e OE, entre os grupos estudo e controle (n=46):..... 44

Tabela 2 – Análise comparativa dos valores médios (média, desvio padrão) da taxa de produção de radicais livres (DCFH-DA) e da frequência de células anormais no teste MN, entre o grupo estudo e grupo controle (n=36):..... 45

Artigo 2

Tabela 1 – Análise comparativa da ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos estudo e controle (n=46):..... 67

Tabela 2 – Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) do índice de dano do ensaio cometa e do ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, entre os grupos estudo e controle (n=36):..... 68

Tabela 3 – Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) das variáveis do teste de MN entre os grupos estudo e controle (n=36):..... 69

Tabela 4 - Associação entre efeito de supressão das EOAPD e índice de dano ao DNA em testes genotóxicos entre os grupos estudo e controle:..... 69

LISTA DE REDUÇÕES

ATL	Audiometria Tonal Liminar
BN	binucleada
CCE	Células Ciliadas Externas
dB	decibéis
dBNA	decibel nível de audição
dBNPS	decibel nível de pressão sonora
DCF	diclorofluoresceína
DCFH	dihidrocliclorofluoresceína
DCFH-DA	diclorofluoresceína diacetato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EO	Estresse oxidativo
EOA	Emissões Otoacústicas Evocadas
EOAPD	Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção
EROS	Espécies reativas de oxigênios
Hz	hertz
mA	microAmperes
mL	mililitro
MN	micronúcleo
Nm	nanômetro
NO●	Óxido nítrico
PEATE	Potenciais Evocados Auditivos de Tronco Encefálico
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
SOCM	Sistema Olivococlear Medial
V	Voltz
µL	microlitros

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	96
APÊNDICE B - Termo de Autorização Institucional.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	20
3 MATERIAL E MÉTODO.....	21
3.1 Delineamento.....	21
3.2 Aspectos éticos	21
3.3 Caracterização da amostra.....	21
3.4 Metodologia.....	23
3.5 Análise dos dados.....	32
4 ARTIGO 1 – EMISSÕES OTOACÚSTICAS E BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA.....	33
4.1 Resumo.....	33
4.2 Abstract.....	34
4.3 Introdução.....	35
4.4 Material e Método.....	38
4.5 Resultados.....	43
4.6 Discussão.....	46
4.7 Conclusão.....	51
4.8 Referências.....	52
5 ARTIGO 2 - SISTEMA OLIVOCOCLEAR MEDIAL E GENOTOXICIDADE EM ESCOLARE DE REGIÃO FUMICULTORA	55
5.1 Resumo.....	55
5.2 Abstract.....	56
5.3 Introdução.....	57
5.4 Material e Método.....	60
5.5 Resultados.....	67
5.6 Discussão.....	70
5.7 Conclusão.....	75
5.8 Referências.....	76
6 DISCUSSÃO GERAL	81
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
APÊNDICES.....	96

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de fumo do mundo. A cultura do fumo é desenvolvida em 704 municípios do Sul do país e envolve mais de 187 mil pequenos produtores rurais, sendo o estado do Rio Grande do Sul, o maior produtor brasileiro (SINDITABACO, 2011). No Rio Grande do Sul a fumicultura é uma atividade agrícola de pequeno porte, com uso massivo de agrotóxicos. Agricultores de pequeno porte têm sua atividade eminentemente familiar, em que adultos e crianças se ajudam mutuamente no trabalho. Isso faz com que crianças e jovens estejam sujeitos a elevado risco de contaminação.

Em razão do benefício do agrotóxico para o sucesso da produção agrícola, sua utilização ainda é amplamente disseminada e de forma irracional, não sendo considerados os malefícios à saúde a curto, médio e longo prazo (ARAÚJO et al., 2007; KÖRBES et al., 2010).

No meio rural, a exposição não se limita apenas ao trabalhador, mas a toda sua família que convive junto à plantação, inclusive aqueles que não ajudam no trabalho. Segundo Perry (2003) o contato também pode ocorrer por meio de resíduos nas roupas dos pais, no solo, na água e nos alimentos.

O efeito da exposição continuada a agrotóxicos, por crianças e jovens é pouco conhecido. Por estarem em desenvolvimento, os seus organismos são mais vulneráveis a ação dos produtos químicos. A diferença entre adultos e crianças não se limita apenas ao tamanho, observa-se relativa imaturidade das funções fisiológicas e bioquímicas dos sistemas, na proporção dos componentes corporais (água, proteínas, gordura e minerais) e na estrutura anatômica dos órgãos e, também, na capacidade de metabolizar e excretar substâncias tóxicas (PERRY, 2003). Além disso, apresentam certos hábitos como “levar a mão à boca”, que aumentam as chances de ingerir compostos tóxicos presentes na água, solo e poeira domiciliar (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010).

Na cultura do fumo, além dos riscos à saúde devido à exposição aos agrotóxicos, esta população está sujeita a problemas de saúde decorrentes da absorção transdérmica da nicotina. Em humanos, a nicotina é facilmente absorvida pela pele. Assim, quando os sujeitos entram em contato com a folha do fumo, alta quantidade de nicotina transdermal é absorvida (ARCURY et al., 2003), provocando

um quadro de intoxicação. Porém, ainda não se conhecem os efeitos crônicos à saúde devido à exposição dermal da nicotina, bem como sobre o sistema auditivo.

Na produção de fumo são utilizados diversos tipos de agrotóxicos, de classes e toxicidade variadas. Entre os agrotóxicos mais utilizados estão os organofosforados, altamente tóxicos (DA SILVA, 2011). Recentemente os agrotóxicos organofosforados foram introduzidos no grupo de alta prioridade para pesquisa de ototoxicidade devido à exposição ocupacional, da qual já faziam parte os solventes, metais e asfixiantes (AZEVEDO, 2004).

A ototoxicidade em decorrência do contato com os agrotóxicos provoca alteração vestibular e/ ou coclear. Além disso, tem sido evidenciado também seu potencial neurotóxico (HOSHINO et al., 2008). Atualmente, vários estudos têm demonstrado estreita relação entre perda auditiva e exposição a agrotóxicos (HOSHINO et al., 2008; CRAWFORD et al., 2008; FINKLER et al., 2012). Körbes et al. (2010) investigou o efeito agudo dos organofosforados sobre a audição de cobaias. Não foi observada alteração funcional da cóclea e nervo auditivo, porém, verificou alterações na citoarquitetura das células ciliadas externas (CCE) da cóclea.

São escassos na literatura compulsada estudos que relacionam apenas a nicotina à perda auditiva. Em geral, a discussão se atém aos efeitos ototóxicos da nicotina no fumo relacionado ao hábito de fumar. Segundo Cocchiorella, Sharp e Persky (1995 apud OLIVEIRA; LIMA, 2009), a nicotina pode ter efeito ototóxico direto e causar isquemia coclear.

O sistema auditivo constitui-se em sistema auditivo periférico e central. Na avaliação audiológica, pode-se realizar a avaliação do órgão periférico- a cóclea- e ainda avaliar a função auditiva central, podendo assim identificar o funcionamento da via auditiva aferente e\ou eferente.

A avaliação da função coclear pode ser realizada por meio das emissões otoacústicas evocadas (EOA) que, tem-se demonstrado um método eficaz de detecção precoce de alterações auditivas. A presença das EOA indica que a fisiologia coclear está normal (DURANTE et al., 2005). Segundo Kemp (1998), pode-se observar alterações nas respostas das EOA antes que sejam registradas alterações no limiar auditivo (mínimo som percebido pela orelha humana). Este tipo de avaliação é usado também para o monitoramento de perdas auditivas.

Com a descoberta das EOA foi possível observar fisiologicamente a função do sistema auditivo eferente por meio da análise da amplitude das EOA que pode ser reduzida com a aplicação de um estímulo acústico competitivo. O efeito denominado supressão das EOA, é determinado pela subtração dos valores da amplitude das EOA obtidos nas condições com e sem estimulação contralateral e, pode ser resultante da ação da via eferente olivococlear (WARR; GINAN, 1979).

O sistema olivococlear dividi-se em dois feixes: sistema olivococlear lateral (SOCL) e sistema olivococlear medial (SOCM). O SOCL é composto primordialmente por fibras não mielinizadas e não cruzadas, as quais inervam as células ciliadas internas (CCI). E, o SOCM é composto por fibras mielinizadas e principalmente cruzadas (75%), as quais vão se conectar diretamente às CCE (DURANTE, 2011). A presença da supressão ou redução das EOA evidencia o funcionamento normal do SOCM (MUÑIZ; VENTURA; ALGARRA, 2006). Havendo 0,5 a 1dB de redução já é considerado que o SOCM está com funcionamento normal (COLLET et al.,1992).

Bernardi (2000) refere que o registro das EOA e a análise do efeito de supressão podem servir como instrumento importante na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear respectivamente e para a elaboração de ações preventivas em audiologia.

O biomonitoramento individual é a forma mais eficiente de prevenir e diagnosticar precocemente episódios de intoxicação por agrotóxicos (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001), bem como identificar fatores de risco para o desenvolvimento de determinadas patologias (MUNIZ et al., 2008 apud DA SILVA, 2011). A monitorização biológica da exposição a agentes químicos é uma medida das substâncias ou seus metabólitos em vários meios biológicos como sangue, urina, saliva, ar exalado e outros. Estes parâmetros biológicos são denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIN, 2003).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo (EO) que é definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes (espécies reativas de oxigênio) e antioxidantes, em favor dos primeiros (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004), causando danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (FINDLAY; TAPIERO; TOLUNSEND, 2005). O EO pode ser causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Os agrotóxicos (LUZ; SANTOS;

MELO, 2003), bem como a nicotina (WETSCHER et al., 1995 apud DA SILVA 2011) são reconhecidos por gerar espécies reativas.

As EROs estão envolvidas em um número cada vez mais expressivo de patologias, incluindo, em menor frequência, a perda da audição. Estudos têm sugerido que o EO causado por diversos fatores de risco podem alterar a audição. (BJELLAND; SEEBERG, 2003; ARBOLEDA-MORENO et al., 2004). Na cóclea o EO provoca a perda de membranas celulares, que relacionadas ao nosso sistema auditivo corresponde à perda da membrana biológica das células ciliadas (HUANG et al., 2000).

As EROs produzidas pelo EO tem uma alta reatividade, e uma meia vida curta (VOSS; SIEMS, 2006). Por este motivo, sua determinação *in vivo* não é viável. Em contrapartida os lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (DNA), após serem modificados pelas espécies reativas, têm uma meia vida maior, o que os torna marcadores ideais do EO. Dentre estes marcadores encontramos o teste cometa, teste de micronúcleos (MN) (VASCONCELOS et al., 2007) e, atualmente, os testes que utilizam reagentes fluorescentes também vem sendo utilizados para esta finalidade.

O ensaio cometa pode ser utilizado para o biomonitoramento humano, genotoxicologia, monitoramento ecológico e como uma ferramenta para investigar danos ao DNA e reparo em diferentes tipos celulares, em resposta a uma série de agentes nocivos ao DNA, tais como radiações, químicos e drogas (MCKENNA; MECKOWN; MECKLVEY-MARTIN, 2008).

O teste de MN é um teste genotóxico usado com muita frequência para avaliar as consequências do meio ambiente e no monitoramento de populações ocupacionalmente expostas (MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009). MN são pequenos fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros deixados para trás durante a divisão celular mitótica e aparecem no citoplasma das células em interfase como um pequeno núcleo adicional (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008).

A utilização de sondas fluorescentes para a detecção e quantificação de pequenas quantidades de DNA desempenham um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, como técnicas de biologia molecular e de diagnóstico (DRAGAN et al., 2010). Devido a uma maior sensibilidade, os métodos fluorescentes têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de espécies reativas em células de diferentes tecidos. Outra grande vantagem

desses métodos está na sua alta sensibilidade de detecção dessas espécies, permitindo uma análise quantitativa (SILVEIRA, 2004).

A identificação de danos não perceptíveis (diagnóstico preditivo), com possíveis efeitos num futuro mais distante sobre a saúde é de suma importância. Identificar precocemente danos auditivos permite proporcionar melhores condições de vida a estes sujeitos, principalmente quando se sabe das interferências da perda auditiva na qualidade de vida das pessoas. Especialmente no caso de escolares, as consequências sobre seu desenvolvimento/aprendizado ou mesmo futuramente na vida adulta.

A partir do exposto, os objetivos deste estudo foram avaliar o sistema auditivo e o metabolismo oxidativo de escolares residentes de região fumicultora, considerando que estes sujeitos, mesmo que indiretamente, estão expostos a diversas substâncias tóxicas.

Esta dissertação foi constituída no modelo Alternativo e subdivide-se nos capítulos: Introdução, Material e Método, Artigo de Pesquisa 1, Artigo de Pesquisa 2, Discussão Geral e Conclusões.

Os artigos de pesquisa serão enviados a periódicos científicos da área.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o sistema auditivo e o metabolismo oxidativo de escolares residentes de região fumicultora.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a função coclear através da análise da amplitude das EOAPD em escolares residentes de região fumicultora.
- Avaliar a função do SOCM através do efeito de supressão das EOAPD em escolares residentes de região fumicultora.
- Traçar o perfil oxidativo de escolares residentes de região fumicultora.
- Correlacionar os achados audiológicos (EOAPD e supressão das EOAPD) com os resultados do perfil oxidativo de escolares residentes de região fumicultora.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo e transversal.

3.2 Aspectos éticos

O Projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, no dia 31 de outubro de 2011, sob o número: 0237.0.243.000-11.

Os pais e/ou responsáveis que mostraram interesse que o escolar participasse da pesquisa, bem como o assentimento do mesmo, foram informados sobre os procedimentos metodológicos da mesma e, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Os dados de identificação são sigilosos. Somente foram avaliados aqueles escolares que concordaram com a pesquisa e tiveram o TCLE assinado pelo responsável.

3.3 Caracterização da Amostra

Para a realização deste estudo foram selecionados escolares de dois municípios da região central do Rio Grande do Sul. O grupo estudo (GE) foi composto por escolares residentes na zona rural fumicultora de um município da região central do Rio Grande do Sul. E, para o grupo controle (GC), foram recrutados escolares residentes na zona urbana de outro município, não fumicultor, também da região central do estado. Optou-se por selecionar os escolares do GC da

zona urbana de um município distinto do GE, para garantir que estes sujeitos estivessem livres da exposição a agrotóxicos e nicotina derivada da folha do tabaco.

Os sujeitos foram selecionados em escolas da rede pública dos respectivos municípios.

A seleção dos sujeitos obedeceu aos seguintes critérios:

3.3.1 Critérios de inclusão

Os sujeitos que participaram do grupo estudo (GE) deveriam:

- Ter idade entre sete a 14 anos;
- Residir na zona rural fumicultora;
- Ser normo-ouvinte;
- Não estar exposto continuamente a ruídos intensos;
- Não conviver diariamente com fumantes;

Os sujeitos que participaram do grupo controle (GC) deveriam:

- Ter idade entre sete a 14 anos;
- Não residir na zona rural;
- Ser normo-ouvinte;
- Não estar exposto continuamente a ruídos intensos;
- Não conviver diariamente com fumantes;

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do GE, bem como do GC os sujeitos que:

- apresentaram alterações neurológicas evidentes;
- apresentaram histórico de alterações otológicas;
- apresentaram alterações audiológicas, segundo critério adotado para este estudo;

- apresentaram doenças crônicas e/ou fazem uso de medicação continuada.

A amostra de conveniência contou inicialmente com 48 voluntários. Destes dois apresentaram alterações na avaliação audiológica básica sendo excluídos da pesquisa e encaminhados aos atendimentos necessários.

A amostra final ficou constituída de 46 escolares com idade entre sete a 14 anos, que foram divididos em dois grupos:

Grupo estudo (GE): 21 escolares, 12 do gênero feminino e nove do gênero masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, residentes da zona rural fumicultora.

Grupo controle (GC): 25 escolares, 17 do gênero feminino e oito do gênero masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, não residentes da zona rural.

3.4 Metodologia

Este estudo foi desenvolvido em parceria com o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST) de Santa Maria/RS, com autorização prévia do Núcleo de Educação Permanente em Saúde (NEPS) da Secretaria Municipal de Saúde de Santa Maria. E ainda, contou com o apoio da Secretária Municipal de Saúde e de Educação do município de origem das crianças do GE.

3.4.1 Seleção do GE

Os sujeitos do GE foram selecionados em uma escola pública localizada na zona rural de um município fumicultor. Inicialmente foi realizada uma reunião com a direção da escola para explicar os objetivos do estudo e assinatura do Termo de Autorização Institucional (APÊNDICE B). Após a autorização, foi aplicado um breve questionário aos alunos para identificar os escolares que residiam na zona rural fumicultora, ou seja, que os pais são fumicultores.

Foi enviado um convite com informações sucintas da pesquisa aos pais de todos os sujeitos selecionados, para participarem de uma reunião na qual os pesquisadores expuseram de forma clara e detalhada a metodologia do estudo. Após a reunião, àqueles que manifestaram interesse receberam uma requisição de autorização, na qual constava detalhes da pesquisa, solicitação de autorização para coleta sanguínea e dados pessoais para contato. Foi elaborada esta autorização para o controle dos pesquisadores e da escola, pois, nem sempre era possível contatar diretamente com os pais. Posteriormente, os pais que autorizaram a participação do filho na pesquisa, entregaram a autorização na secretaria da escola para então serem agendadas as coletas.

Composição do GE: 160 sujeitos responderam ao questionário inicial, desses 103 foram selecionados e 57 não se enquadraram neste critério de inclusão (residir na zona rural fumicultora) sendo excluídos da pesquisa. Dos alunos selecionados, apenas os pais de 25 escolares consentiram a participação do filho (a) na pesquisa. Destes 25 escolares, três não puderam comparecer no dia da avaliação e um foi excluído segundo critério de exclusão deste estudo.

As avaliações do GE foram realizadas nos meses de novembro e dezembro de 2011, compreendendo o período de intervalo entre a colheita e o plantio do fumo, a fim de evitar predomínio de algum dos agentes, considerando que a exposição aos agrotóxicos é maior no período de plantio e da nicotina é maior na época da colheita.

Para facilitar o transporte dos sujeitos à cidade de Santa Maria, eles foram divididos em três grupos para as avaliações. O transporte dos escolares do GE, bem como de seus responsáveis, foi de responsabilidade da prefeitura municipal da cidade de origem das crianças. Todos os escolares compareceram acompanhados por algum responsável.

3.4.1 Seleção do GC

Quanto ao recrutamento dos sujeitos do GC foram visitadas três escolas públicas da cidade de Santa Maria. Primeiramente, foi realizada uma reunião com a direção de cada escola na qual foram expostos os objetivos da pesquisa e assinado

o Termo de Autorização Institucional (APÊNDICE B).

Após autorização das escolas, foram entregues convites aos alunos, somente àqueles dentro da faixa etária do estudo, contendo informações sucintas da pesquisa. Àqueles que tiveram interesse na participação do filho na pesquisa, completaram com seus dados pessoais e devolveram o convite a secretaria da escola, posteriormente entregue a pesquisadora responsável. Por meio dos dados informados, os sujeitos foram contatados para agendamento das avaliações.

Composição do GC: Foram convidados em média 250 alunos, desses somente 57 sujeitos demonstraram interesse em participar da pesquisa. Todos os sujeitos foram contatados, porém apenas 26 participaram da pesquisa, sendo um excluído segundo critério de exclusão deste estudo.

3.4.3 Procedimentos de coleta de dados

As avaliações audiológicas e as coletas dos materiais biológicos, de ambos os grupos, foram realizadas no CEREST, preferencialmente todas no mesmo dia.

Primeiramente os pais e/ou responsáveis e o próprio sujeito foram submetidos a anamnese, no qual foram pesquisadas informações referentes aos dados pessoais, histórico otológico e de saúde geral, queixa auditivas, alimentação, hábitos, desempenho escolar e aspectos socioambientais.

Todos os participantes foram submetidos às seguintes avaliações: inspeção visual do meato acústico externo, audiometria tonal liminar (ATL), imitanciometria, emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOAPD) com e sem ruído contralateral. Além das avaliações audiológicas foi realizada a pesquisa dos biomarcadores do metabolismo oxidativo.

3.4.3.1 Avaliações audiológicas

Inicialmente foi realizada uma triagem audiológica para atender os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Primeiramente foi executada a inspeção visual do

meato acústico externo utilizando o Otoscópio Clínico da marca *Klinic Welch-Allyn*, para então realizar a ATL.

A ATL foi realizada em cabina acusticamente tratada com o audiômetro da marca *Interacoustics*, modelo AC40 e fone de ouvido TDH-39. Por se tratar de uma triagem audiológica, na ATL foram pesquisados somente os limiares de via aérea nas frequências de 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. A técnica utilizada foi descendente-ascendente. Foram considerados indivíduos normo-ouvintes aqueles que apresentaram média tritonal (500, 1000 e 2000 Hz) menor ou igual a 25 dBNA (decibel Nível de Audição) (LLOYD II; KAPLAN, 1978).

As medidas de imitância acústica foram realizadas por meio do analisador de orelha média da marca *Interacoustics*, modelo AT 235 e tom-sonda 226 Hz, para pesquisa da curva timpanométrica e dos reflexos acústicos. Estes foram pesquisados nas frequências de 500 a 4000Hz bilateralmente, no modo contralateral. Foram incluídas na amostra somente os escolares com timpanograma tipo A e reflexos acústicos presentes (JERGER, 1970).

Posteriormente os sujeitos foram avaliados por meio das EOAPD em ambas as orelhas, primeiramente na ausência e, após, na presença de estimulação acústica contralateral. O registro das EOAPD foi realizado em local silencioso utilizando o analisador coclear da marca *Interacoustics* modelo *Otoread Screening*. Para obtenção das EOAPD (2F1-F2) foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde F1 é apresentada na intensidade de $L1 = 65\text{dBNPS}$ e F2 em $L2 = 55\text{dBNPS}$. Para medida das EOAPD foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz. Foi considerado EOAPD presentes, quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6dBNPS em pelo menos três frequências (WAGNER et al., 2008).

Neste estudo, foram pesquisadas as EOAPD, pois estas avaliam uma faixa mais ampla de frequências, incluindo as altas frequências, importantes na avaliação de sujeitos expostos a ruído e/ou substâncias tóxicas. Descritas por David Kemp (1978), as EOAPD são evocadas como resposta da intermodulação de dois tons puros simultâneos de frequências próximas (F1 e F2), denominados tons primários, e apresentam como diferencial a capacidade de comportamento por frequência.

A estimulação acústica contralateral foi um ruído branco, na intensidade de 60 dBNA (COLLET et al., 1992), gerado pelo audiômetro já citado (*Interacoustics* Modelo AC 40, via fone auricular TDH-39). A fim de evitar a manipulação da sonda

das EOAPDs, o fone foi acoplado na orelha contralateral à captação das EOAPDs antes do início do teste. Nesta pesquisa, obedeceu-se a seguinte ordem de testagem: EOAPD na orelha direita (OD) sem ruído, EOAPD na OD com ruído, EOAPD na orelha esquerda (OE) sem ruído, EOAPD na OE com ruído.

O cálculo da supressão contralateral das EOAPD foi feito pela subtração do nível de resposta das EOAPD sem estimulação acústica contralateral do nível de resposta das EOAPD com estimulação acústica contralateral. A análise do efeito de supressão foi por *response* (resposta geral). O *response* é calculado a partir da média geométrica das freqüências sob teste. Neste estudo, foi considerado efeito de supressão presente quando houve redução das amplitudes das EOAPD de pelo menos 0,5 dB e efeito de supressão ausente quando não ocorreu redução, ou seja, diferença menor que 0,5 ou negativa. De acordo com Collet et al. (1992), um efeito de supressão de 0,5 a 1,0 dB revela a integridade do SOCM.

Após as avaliações audiológicas os responsáveis receberam uma devolutiva sendo orientados quanto aos resultados de cada teste e os encaminhamentos necessários para aqueles que apresentaram alteração nos resultados.

3.4.3.2 Procedimentos de coleta do material biológico

Para a determinação do perfil oxidativo foi realizada uma coleta de material biológico (sangue e células epiteliais da mucosa oral).

A coleta sanguínea foi executada do seguinte modo: o material biológico foi obtido por meio de punção venosa, efetuada por uma técnica de enfermagem capacitada. Os lacres da seringa e agulha foram retirados na frente do voluntário e em seguida, foram conectadas. O sangue foi imediatamente armazenado em um tubo com anticoagulante de heparina sódica. Após a coleta, seringa e agulha foram descartadas em recipientes próprios para materiais perfurocortantes e infecto-contagiosos. Este material foi utilizado nas seguintes avaliações: ensaio cometa, Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) referente a taxa de produção de radicais livres e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA.

Logo em seguida foi efetuada a coleta das células epiteliais da mucosa oral. Este material foi utilizado apenas no teste de micronúcleos, o procedimento de coleta foi descrito abaixo, no detalhamento do respectivo teste.

Todo material biológico foi identificado e enviado ao laboratório de Biogenômica da UFSM do Departamento de Morfologia-CCS, onde foram realizadas as análises.

3.4.4 Avaliação de marcadores do metabolismo oxidativo

O perfil oxidativo foi constituído pelos seguintes indicadores de estresse ou dano oxidativo: ensaio cometa, teste de micronúcleos, Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) referente a taxa de produção de radicais livres e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA.

3.4.4.1 Ensaio cometa

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al., (1988) e modificado por Collins, Ma e Duthie, (1995). Para cada indivíduo foram confeccionadas lâminas em duplicata. Todos os passos foram conduzidos sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA. Para execução da técnica, foram misturados 5µL de amostra (leucócitos) com 90µL de 0,75% Agarose *low melting* (baixo ponto de fusão) em um microtubo. O material foi adicionado em uma lâmina pré-coberta com agarose 1,5%, e coberta por uma lamínula, ficando na geladeira por cinco minutos. Após, a lamínula foi retirada e a lâmina colocada em uma cuba com solução de lise por um dia, a 4°C. Em seguida, foi realizada a eletroforese das lâminas, utilizando tampão de eletroforese, de forma que as lâminas ficaram nessa solução por 25 minutos em repouso para permitir o desenovelamento do DNA, e posteriormente foi realizada a eletroforese por 25 minutos a 25 Voltz (V) e 300 microAmperes (mA). Então, as lâminas foram lavadas com solução neutralizadora por cinco minutos por três vezes e foram lavadas duas vezes com água destilada e

ficaram em temperatura ambiente para secagem até o dia seguinte. As lâminas foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução fixadora por dez minutos. A seguir, foram lavadas três vezes e postas para secar em temperatura ambiente. Foram novamente reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução corante por 25 minutos a 37°C. Depois da coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada e novamente colocadas para secar em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca *Olympus*®, modelo CX40, com aumento de 400 vezes. Foi feita uma contagem, para cada amostra, de 100 células (50 por lâmina). As lâminas foram analisadas por dois observadores independentes e, para o índice de dano (ID), foi considerada a média dos danos das duas lâminas analisadas. O cálculo do índice de dano (ID), foi feito a partir da fórmula proposta por Cavalcanti et al. (2008): $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n = número núcleos de cada classe analisada.

As cinco categorias que foram usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García et al. (2004) e mostradas na figura 1, a seguir:

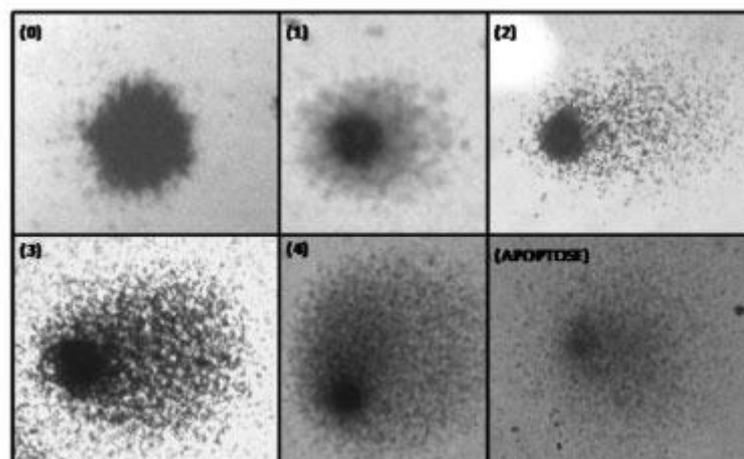


Figura 1. Classificação do Dano ao DNA. (Fronza et al., 2011).

3.4.4.2 Teste de Micronúcleos

Para o teste de MN foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço (raspagem) da mucosa da bochecha, em média de dez vezes de

cada lado, utilizando escova *Cytobrush* ou *Swab*, visando adquirir o máximo possível de células epiteliais, sem machucar o participante. Logo após a coleta, o material foi depositado em um tubo cônico tipo *Falcon*, contendo 2 mL de solução fisiológica ou solução PBS pH 7,4. Para o transporte do material até o laboratório este foi mantido refrigerado em caixa de isopor.

As amostras foram centrifugadas a 1000-1500 RPM por dez minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante usando pipetas *Pauster* individuais, com cuidado para não remover o *pellet* de células. Então foi adicionado 1,5 mL de solução fixadora e centrifugado novamente a 1000-1500 RPM durante 1-2 minutos. Novamente foi desprezado o sobrenadante, mantendo um pouco da solução fixadora no tubo, e então homogeneizado o conteúdo com pipetas *Pauster* para ressuspender as células. O conteúdo foi depositado em lâminas limpas e previamente identificadas, as quais foram colocadas para secar em temperatura ambiente por 10-15 minutos. Depois foi realizada a coloração utilizando corantes panóticos. Para finalizar as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas novamente para secar em temperatura ambiente durante a 20-25 minutos.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca *Olympus®*, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células sendo classificadas quanto: célula normal (sem alteração), célula com MN, célula binucleada (BN), célula com pontes nucleares (PNs) e células com Buds nucleares (BUD) ou “*Broken eggs*”, conforme a figura 2:

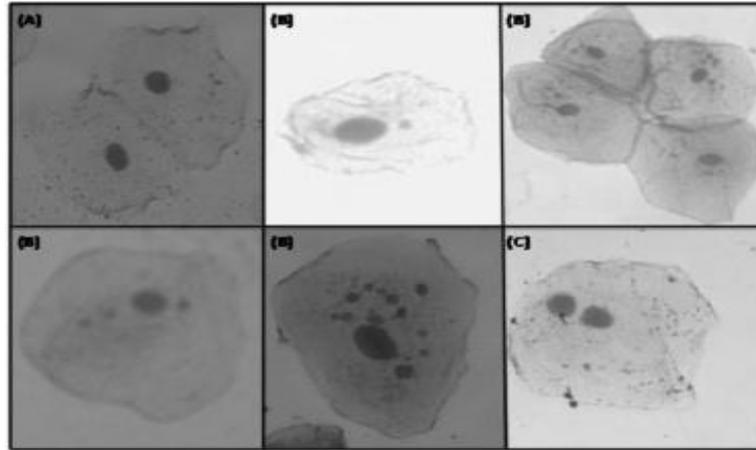


Figura 2. Classificação das células do teste de MN: A (célula sem alteração); B (célula com MN); C (célula BN). (FRONZA et al., 2011)

3.4.4.3 Taxa de produção de radicais livres

A potencial geração de EROs foi monitorada por meio do uso de uma sonda fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF). Este ensaio foi baseado no seguinte pressuposto químico: o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de se difundir através de membranas celulares. Dentro das células esta molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares (ROTA; CHIGNELL; MASON, 1999). Esta reação forma, por sua vez, um produto não-fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de EROs é oxidada (preferencialmente peróxidos, hidroperóxidos e Óxido nítrico - NO●) passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF). Assim, quanto maior a fluorescência detectada pela maior absorbância avaliada pelo fluorímetro, maior a ocorrência de compostos oxidantes. Esta avaliação foi realizada conforme Da Costa Krewer et al. (2011).

3.4.4.4 Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA.

No ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, inicialmente o sangue total foi centrifugado a 2000 RPM durante dez min. Para esta técnica foi utilizado o plasma sanguíneo.

Antes de iniciar o experimento fez-se a leitura da placa de Elisa vazia. Em seguida, pipetou-se 10 μ L do plasma em placa de Elisa preta em, no mínimo, quadruplicatas. Na sequência foi adicionado 10 μ L do reagente PicoGreen®. Após o término das pipetagens, a placa foi mantida em repouso (incubação) durante 5 minutos, em temperatura ambiente e de forma protegida da luz (pois o reagente PicoGreen® é fotossensível). Passado o período de incubação, realizou-se a leitura da placa em fluorescência, com 480nm de excitação e 520 nm de emissão. A interpretação dos valores obtidos é dada de forma que quanto maior o valor de fluorescência, mais DNA livre há no meio, indicando morte celular.

3.5 Análise dos dados

Os dados coletados foram dispostos em uma planilha eletrônica *Excel 2007*, para posterior análise estatística. Primeiramente realizou-se a análise descritiva das variáveis. Em seguida foi feita a análise inferencial.

As análises estatísticas foram executadas com o auxílio do *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0. Para verificar a normalidade das variáveis utilizou-se o teste *Kolmogorov-Smirnov*.

Para todas as análises comparativas, das variáveis numéricas, foi utilizado o teste *t-Student* para amostras independentes. Já, na comparação da variável categórica ocorrência do efeito de supressão das EOAPD foi utilizado o teste Exato de *Fisher*. Na comparação entre ocorrência de efeito de supressão e os testes genotóxicos foi utilizado o teste de *Mann Whitney*.

Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

4 ARTIGO 1 - EMISSÕES OTOACÚSTICAS E BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA

4.1 Resumo

Objetivo: verificar a associação entre a amplitude das Emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) e biomarcadores do estresse oxidativo (EO) em escolares residentes de região fumicultora. **Material e método:** Participaram do grupo estudo (GE) 21 escolares normo-ouvintes residentes de região fumicultora e, do grupo controle (GC) 25 escolares normo-ouvintes que não residiam na zona rural. O sistema auditivo foi avaliado por meio das EOAPD e os biomarcadores do EO foram: Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e teste de micronúcleos (MN). **Resultados:** Os dois grupos apresentaram EOAPD presentes em ambas as orelhas. Detectou-se diferença significativa, entre os grupos, na orelha direita (OD) na frequência de 4000 Hz e na orelha esquerda (OE) em 2000 Hz, sendo a média de amplitude das EOAPD do GE menor que a do GC. Quanto a média das duas orelhas, o GE apresentou média inferior em todas as frequências, verificando-se diferença significativa em 2000 e 4000 Hz. Na média geral das EOAPD por orelha, não foi observada diferença significativa. Na taxa de produção de radicais livres a média do GE mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC. Quanto a frequência de células alteradas no teste de MN a média do GE também apresentou-se significativamente mais elevada que a do GC. Na comparação entre a amplitude das EOAPD e os resultados dos biomarcadores do EO, verificou-se correlações importantes. **Conclusão:** O GE apresentou nível de resposta das EOAPD menor em todas as frequências e índices elevados dos biomarcadores do EO, sendo verificada associação entre as avaliações.

Palavras-chave: praguicidas, fumo, audição, estresse oxidativo, criança.

ARTICLE 1 - OTOACOUSTIC EMISSIONS AND BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN STUDENTS OF A TOBACCO-PRODUCING REGION

4.2 Abstract

Objective: To verify the association between the amplitude of distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE) and biomarkers of oxidative stress (OS) in resident students of the tobacco-producing region. **Methods:** 21 normal-hearing students from the tobacco-producing region, study group (SG), and 25 normal-hearing students who did not live in the countryside, control group (CG), participated of this research. The auditory system was assessed by DPOAE and the following biomarkers: dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), and micronucleus test (MN). **Results:** Both groups revealed DPOAE presented in both ears. Significant difference was detected between groups in the right ear (RE) in the frequency of 4000 Hz and in the left ear (LE) in the frequency of 2000 Hz, with the mean amplitude of the DPOAE of the SG lower than the one found in the CG. Considering the mean of both ears, the SG presented lower mean across all frequencies and it was found a significant difference in the frequencies of 2000 and 4000 Hz. The overall mean of DPOAE, by ear, no significant differences were observed. In relation to the rate of production of free radicals, the mean of the SG was significantly higher than that of the mean of the CG. For the frequency of abnormal cells in the MN test, the mean of the SG also was considerate significantly higher than the mean of the CG. Comparing the amplitudes and the results of biomarkers of EO, significant correlations were identified. **Conclusion:** The SG showed a lower response level of DPOAE at all frequencies and high levels of biomarkers of EO, being observed association between the assessments.

Keywords: pesticides, tobacco, hearing, oxidative stress, child.

4.3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação sobre as consequências e riscos para a saúde humana gerados pela exposição aos agrotóxicos. Devemos lembrar que não é apenas o trabalhador rural que está exposto, mas sim toda sua família. Os filhos dos agricultores podem estar expostos desde o período pré-natal e constituem um grupo especial de risco.

O efeito da exposição continuada a agrotóxicos, por crianças e jovens é pouco conhecido. Por estarem em desenvolvimento, os seus organismos são mais vulneráveis a ação dos produtos químicos. Além disso, apresentam certos hábitos mais frequentes, como “levar a mão à boca”, que aumentam as chances de ingerir compostos tóxicos presentes na água, solo e poeira domiciliar (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010).

No meio rural, o uso de agrotóxicos ainda é a principal estratégia dos agricultores para combater e prevenir as pragas agrícolas e, garantir maior produtividade e rendimento das culturas (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008). Porém, apesar de conhecer os danos dos mesmos, os agricultores fazem uso indiscriminado e sem devida proteção individual. Esta ação acarreta significativamente o aumento das intoxicações agudas e crônicas, por este tipo de produto (HOSHINO et al., 2009). Na fumicultura, além dos riscos à saúde devido à exposição aos agrotóxicos, esta população está sujeita a problemas de saúde decorrentes do contato com a folha do tabaco, podendo alta quantidade de nicotina ser absorvida pela pele (ARCURY et al., 2003), provocando um quadro de intoxicação. Porém, os efeitos crônicos à saúde devido à exposição dermal da nicotina, bem como sobre o sistema auditivo, ainda não são conhecidos.

Nos últimos anos os agrotóxicos organofosforados, mais utilizados na fumicultura, foram introduzidos no grupo de alta prioridade para pesquisa de ototoxicidade devido à exposição ocupacional (AZEVEDO, 2004). Ototoxicidade é definida como dano aos sistemas coclear e/ou vestibular resultante de exposição a substâncias químicas. Referente à ototoxicidade da nicotina são limitados os estudos que relacionam apenas a nicotina à perda auditiva. Em geral, a discussão se atém aos efeitos ototóxicos da nicotina no fumo relacionado ao hábito de fumar.

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo (EO) que é definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros. São geradas inúmeras espécies reativas oxigênio (EROs), dentre elas os radicais livres que, diferentemente das demais, apresentam um elétron desemparelhado na sua camada eletrônica, favorecendo a ocorrência de danos oxidativos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Essas EROs podem ser formadas a partir de fontes exógenas como fumo, radiações, luz ultravioleta, solventes, alguns fármacos (BIESALKI, 2002) e agrotóxicos (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008) ou de fontes endógenas. As EROs estão envolvidas em um número cada vez maior de patologias, dentre elas a perda da audição (alteração de funcionamento coclear).

Uma forma de prevenir precocemente os danos causados pela exposição à substâncias tóxicas é por meio do biomonitoramento humano. Este permite identificar fatores de risco para o desenvolvimento de determinadas patologias (MUNIZ et al., 2008 apud DA SILVA, 2011), podendo estar entre elas a perda auditiva. A monitorização biológica da exposição a agentes químicos é uma medida das substâncias ou seus metabólitos em vários meios biológicos como sangue, urina, saliva, ar exalado e outros. Estes parâmetros biológicos são denominados indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIN, 2003).

Os biomarcadores podem ser usados para indicar os danos às macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) causados pelo EO (HWANG; KIMB, 2007). Existem diferentes biomarcadores para avaliar o EO: alguns verificam os resultados do EO nos alvos especificamente como danos ao DNA que podem ser avaliados, por exemplo, pelo teste de micronúcleos (MN), ou, quantificar os níveis de produção de EROs no organismo utilizando os métodos fluorescentes.

O teste MN é utilizado no monitoramento de populações ocupacionalmente expostas há muitos anos (KOHATSU; SHIMABUKURO; GATTÁS, 2007). MN são fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros deixados para trás durante a divisão celular mitótica e aparecem no citoplasma das células em interfase como um pequeno núcleo adicional (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008). Atualmente, este teste em células da mucosa oral tem sido utilizado para avaliar múltiplos fatores, incluindo exposições ambientais e ocupacionais, como aos agrotóxicos, estilos de vida (alcoolismo, tabagismo, estresse etc) câncer e outras doenças (BORTOLI; AZEVEDO; SILVA, 2009).

Recentemente os métodos fluorescentes vêm se destacando devido a uma maior sensibilidade e, têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de EROs em células de diferentes tecidos. Outra grande vantagem desses métodos está na sua alta sensibilidade de detecção dessas espécies, permitindo uma análise quantitativa (SILVEIRA, 2004). Dentre estes métodos fluorescentes encontra-se a Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), referente a taxa de produção de radicais livres.

Ainda a avaliação da função coclear, pode ser realizada por meio das emissões otoacústicas evocadas (EOA). Esse exame é um método eficaz de detecção precoce de alterações auditivas. Segundo Kemp (1998), podem-se observar alterações nas respostas das EOA antes que sejam registradas alterações no limiar auditivo (mínimo som percebido pela orelha humano). Este tipo de avaliação é usado também para o monitoramento de perdas auditivas. As EOA possuem maior especificidade e sensibilidade para identificar alterações nas células ciliadas externas (CCE), pois, estas lesões provocam diminuição da amplitude das EOA e da relação sinal/ruído, podendo inclusive haver ausência de resposta na região de maior dano (SOUSA et al., 2008).

Como se sabe a audição é um dos sentidos mais importantes para o aprendizado e seu desenvolvimento está diretamente ligado ao da fala e ao aprendizado de leitura e escrita. Por isso, é importante identificar precocemente danos auditivos em escolares expostos à diversas substâncias tóxicas, e assim prevenir possíveis efeitos num futuro mais distante sobre a qualidade de vida destes jovens.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo verificar a associação entre a amplitude das EOAPD e biomarcadores do EO em escolares residentes de região fumicultora, com o intuito de alertar e prevenir danos futuros nesta população.

4.4 MATERIAL E MÉTODO

O presente foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da instituição de origem, registrada sob o protocolo 0237.0.243.000-11. Esta pesquisa foi realizada em parceria com Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST), de Santa Maria. Todos os sujeitos concordaram em participar da pesquisa, receberam cópia e apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) assinado pelos responsáveis. Trata-se de um estudo observacional, prospectivo e transversal.

Participaram deste estudo escolares residentes na zona rural fumicultora de um município da região central do Rio Grande do Sul, que compuseram o grupo estudo (GE). E, para o grupo controle (GC) foram recrutados escolares residentes da zona urbana de outro município, não fumicultor, da região central do estado. Optou-se por selecionar os escolares do GC de outro município, para garantir que estes sujeitos estivessem livres da exposição a agrotóxicos e nicotina derivada da folha do tabaco.

Os critérios de inclusão adotados neste estudo foram: idade entre sete e 14 anos, ser normo-ouvintes e não estar exposto continuamente a ruídos intensos e a fumaça de cigarro. E como critérios de exclusão os seguintes fatores: apresentar histórico de alterações otológicas, apresentar alterações audiológicas segundo critério adotado para este estudo e apresentar doenças crônicas e/ou fazer uso de medicação continuada.

Na seleção do GE 103 escolares residentes em região fumicultora foram convidados à participar da pesquisa, porém apenas 25 demonstraram interesse, sendo que 22 participaram da pesquisa. Para o recrutamento do GC foram visitadas três escolas públicas, sendo convidados em média 250 alunos, porém demonstraram interesse apenas 57 sujeitos e destes somente 26 escolares participaram da pesquisa. Todas as escolas permitiram a divulgação da pesquisa e assinaram o Termo de Autorização Institucional (APÊNDICE B).

A amostra de conveniência contou inicialmente com 48 voluntários. Destes, dois apresentaram alterações na avaliação audiológica básica sendo excluídos da pesquisa e encaminhados aos atendimentos necessários. A amostra final ficou constituída de 46 escolares com idade entre sete a 14 anos, que foram divididos em

dois grupos:

Grupo estudo (GE): 21 escolares, 12 do gênero feminino e nove do gênero masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, residentes da zona rural fumicultora.

Grupo controle (GC): 25 escolares, 17 do gênero feminino e oito do gênero masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, não residentes da zona rural.

Tanto as avaliações audiológicas como as coletas dos materiais biológicos, de ambos os grupos, foram realizadas no CEREST, preferencialmente todas no mesmo dia.

Inicialmente os pais e/ou responsáveis e o próprio sujeito foram submetidos a um questionário, no qual foram pesquisadas informações referentes aos dados pessoais, histórico otológico e de saúde geral, queixas auditivas e aspectos socioambientais.

Para verificar a condição auditiva os escolares foram submetidos a inspeção visual do meato acústico externo utilizando o Otoscópio Clínico da marca *Klinik Welch-Allyn*, para então realizar a audiometria tonal limiar (ATL).

A ATL foi realizada em cabina acusticamente tratada com o audiômetro da marca *Interacoustics*, modelo AC40 e fone de ouvido TDH-39. Por se tratar de apenas uma triagem audiológica, na ATL foram pesquisados somente os limiares de via aérea nas frequências de 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. A técnica utilizada foi descendente-ascendente. Foram considerados indivíduos normo-ouvintes aqueles que apresentaram média tritonal (500, 1000 e 2000 Hz) menor ou igual a 25 dBNA (decibel Nível de Audição) (LLOYD II e KAPLAN, 1978).

As medidas de imitância acústica foram realizadas por meio do analisador de orelha média da marca *Interacoustics*, modelo AT 235 e tom-sonda 226 Hz, para pesquisa da curva timpanométrica e dos reflexos acústicos. Estes foram pesquisados nas frequências de 500 a 4000Hz bilateralmente, no modo contralateral. Foram incluídas na amostra somente crianças com timpanograma tipo A e reflexos acústicos presentes (JERGER, 1970).

Posteriormente os sujeitos foram avaliados por meio das Emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) em ambas as orelhas. Foram pesquisadas as EOAPD, pois estas avaliam uma faixa mais ampla de frequências, incluindo as altas frequências, importantes na avaliação de sujeitos expostos a ruído

e/ou substâncias tóxicas. Descritas por David Kemp (1978), as EOAPD são evocadas como resposta da intermodulação de dois tons puros simultâneos de frequências próximas (F1 e F2), denominados tons primários, e apresentam como diferencial a capacidade de comportamento por frequência.

O registro das EOAPD foi realizado em local silencioso utilizando o analisador coclear da marca *Interacoustics*, modelo *Otoread Screening*. Para obtenção das EOAPD (2F1-F2) foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde F1 é apresentada na intensidade de $L1 = 65\text{dBNPS}$ e F2 em $L2 = 55\text{dBNPS}$. Para medida das EOAPD foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz. Foi considerado EOAPD presentes, quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6 dBNPS em pelo menos três frequências (WAGNER et al., 2008).

As EOAPD foram também avaliadas pela comparação dos valores médios da relação sinal/ruído por frequência entre o GE e GC.

Além disso, executou-se a coleta do material biológico, porém, apenas 18 sujeitos do GE e 18 sujeitos do GC realizaram este procedimento, diminuindo a amostra para estas avaliações.

A fim de avaliar parâmetros de EO, foram realizados os seguintes testes experimentais: Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), referente a taxa de radicais livres, e teste de micronúcleos (MN), para avaliação de possíveis alterações metanucleares.

Para determinar a taxa de produção de radicais livres foi realizada uma coleta sanguínea. O material biológico foi obtido por meio de punção venosa, efetuada por uma técnica de enfermagem capacitada. Os lacres da seringa e agulha foram retirados na frente do voluntário e em seguida, foram conectadas. O sangue foi imediatamente armazenado em um tubo com anticoagulante de heparina sódica. Após a coleta, seringa e agulha foram descartadas em recipientes próprios para materiais perfurocortantes e infecto-contagiosos.

A DCFH-DA é baseada no seguinte pressuposto químico: o diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é capaz de se difundir através de membranas celulares. Dentro das células esta molécula é deacetilada pela ação das enzimas esterases intracelulares (ROTA; CHIGNELL; MASON, 1999). Esta reação forma, por sua vez, um produto não-fluorescente, a dihidroclorofluoresceína (DCFH). A DCFH na presença de EROs, principalmente peróxido de hidrogênio, é oxidada passando para uma forma altamente fluorescente a diclorofluoresceína (DCF). Assim, quanto

maior a fluorescência emitida, maior a ocorrência de compostos oxidantes. Esta avaliação foi realizada conforme Da Costa Krewer et al. (2011).

Já para o teste de MN foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço (raspagem) da mucosa da bochecha. Logo após a coleta, o material foi depositado em um tubo cônico tipo *Falcon*, contendo 2 mL de solução fisiológica ou solução PBS pH 7,4, sendo mantido refrigerado em caixa de isopor até o processamento. As amostras foram centrifugadas a 1000-1500 RPM por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante usando pipetas *Pauster* individuais. Então foi adicionado 1,5 mL de solução fixadora e centrifugado novamente a 1000-1500 RPM durante 1-2 minutos. Novamente foi desprezado o sobrenadante, mantendo um pouco da solução fixadora no tubo, de forma a homogeneizar o conteúdo para ressuspender as células e dispô-las em lâminas limpas e previamente identificadas. Após a devida secagem, realizou-se coloração utilizando corantes panóticos. Para finalizar as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e mantidas em temperatura ambiente para secagem.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca *Olympus*®, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem das células presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células sendo classificadas quanto: célula normal (sem alteração), célula com MN, célula binucleada (BN), célula com pontes nucleares (PNs) e células com Buds nucleares (BUD) ou “*Broken eggs*”, conforme a figura abaixo:

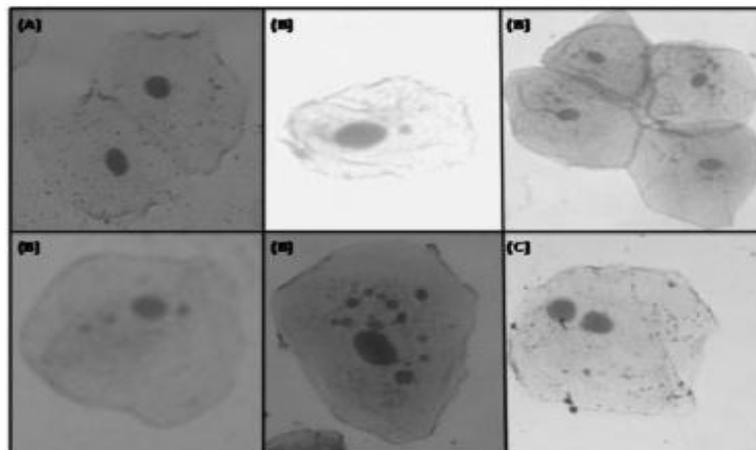


Figura 1. Classificação das células do teste de MN: A (célula sem alteração); B (célula com MN); C (célula BN). (FRONZA et al., 2011).

Para efeitos comparativos, foi utilizado o somatório de células anormais, de todos os tipos, no total das 1000 células avaliadas.

Os dados coletados foram dispostos em uma planilha eletrônica *Excel 2007*, para posterior análise estatística. As análises estatísticas foram executadas com o auxílio do *software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)*, versão 17.0. Para verificar a normalidade das variáveis utilizou-se o teste *Kolmogorov-Smirnov*.

Para todas as análises comparativas foi utilizado o teste *t-Student* para amostras independentes. Foi adotado nível de significância de 5%, em todas as análises.

4.5 RESULTADOS

Todos os sujeitos, tanto do GE quanto do GC, apresentaram EOAPD presentes em ambas as orelhas.

Ao comparar a amplitude de resposta das EOAPD entre os grupos por frequência, foi detectada diferença estatisticamente significativa na OD para a frequência de 4000 Hz ($p < 0,05$), indicando que a média do GE ($18,0 \pm 6,3$) mostrou-se menor que a do GC ($21,7 \pm 5,6$). Na OE a diferença significativa se configurou na frequência de 2000 Hz, onde, novamente a média do GE ($21,0 \pm 7,1$) mostrou-se menor que a do GC ($25,3 \pm 5,1$) (tabela 1).

Em relação a comparação de médias das demais frequências, tanto da OD quanto da OE, as diferenças observadas entre o GE e GC não se mostraram significativas ($p > 0,05$), embora tenha se observado que, de modo geral, as médias do GE mostraram-se menores que as do GC.

Considerando a média da OD e OE, o GE apresentou média inferior ao GC em todas as frequências. Observou-se que para a média na frequência de 2000 Hz foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$), de forma que, o GE ($21,2 \pm 6,7$) apresentou média menor que o GC ($25,4 \pm 4,4$). Outra diferença significativa ($p < 0,05$) foi evidenciada na média da frequência de 4000 Hz, onde, novamente a média do GE ($18,2 \pm 4,9$) se mostrou inferior que a do GC ($21,1 \pm 4,9$) (tabela 1).

Na média geral das EOAPD por orelha, não foi observada diferença estatisticamente significativa (tabela 1).

Tabela 1- Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) da amplitude de resposta das EOAPD, por frequência e média geral da OD, OE e média da OD e OE, entre os grupos estudo e controle (n=46):

EOAPD	Grupos						Valor-p
	Estudo (n=21)			Controle (n=25)			
	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	
OD							
1500 Hz	21,4	6,8	8 – 32	21,4	7,0	3 – 30	0,993¶
2000 Hz	21,4	7,6	10 – 37	25,4	5,9	11 – 35	0,051¶
3000 Hz	22,4	6,2	8 – 31	22,4	5,1	13 – 31	0,990¶
4000 Hz	18,0	6,3	0 – 27	21,7	5,6	11 – 32	0,043¶*
5000 Hz	21,8	9,7	0 – 34	22,3	7,0	9 – 34	0,837¶
6000 Hz	20,8	10,5	0 – 34	23,7	6,7	9 – 36	0,288§
Média geral OD	20,9	6,7	5,3 – 31,5	22,8	4,7	12,2 – 32,0	0,251¶
OE							
1500 Hz	20,1	6,2	6 – 28	20,6	7,7	-5 – 33	0,814¶
2000 Hz	21,0	7,1	6 – 34	25,3	5,1	17 – 36	0,020¶*
3000 Hz	21,0	7,9	1 – 33	22,9	3,6	16 – 34	0,322§
4000 Hz	18,3	6,4	0 – 27	20,4	5,5	4 – 29	0,224¶
5000 Hz	22,6	7,6	2 – 32	24,4	5,5	9 – 35	0,362¶
6000 Hz	24,0	8,3	0 – 35	25,2	5,9	12 – 36	0,584¶
Média geral OE	21,2	5,8	6,0 – 29,8	23,2	4,0	12,3 – 31,7	0,169¶
Média OE – OD							
Média 1500 Hz	20,8	5,8	7,5 – 29,0	21,0	6,7	1,0 – 30,0	0,891¶
Média 2000 Hz	21,2	6,7	8,0 – 34,5	25,4	4,4	17,5 – 35,0	0,019§*
Média 3000 Hz	21,7	6,4	4,5 – 31,0	22,6	3,7	14,5 – 31,0	0,561§
Média 4000 Hz	18,2	4,9	6,5 – 27,0	21,1	4,9	10,0 – 30,5	0,049¶*
Média 5000 Hz	22,2	7,6	1,0 – 32,5	23,3	5,3	9,0 – 34,5	0,563§
Média 6000 Hz	22,4	7,8	0,0 – 33,0	24,4	5,6	10,5 – 36,0	0,331§
Média geral	21,0	5,6	5,9 – 30,7	23,0	4,1	12,3 – 31,9	0,171¶

Legenda: EOAPD = emissões otoacústicas produto de distorção; OD = orelha direita; OE= orelha esquerda; Min-Max = mínimo e máximo;

¶: Teste t-Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; §: Teste t-Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias;

*p< 0,05;

Na comparação da taxa de produção de radicais livres (DCFH-DA), entre os grupos, observou-se que a média do GE (23.144,2±2726,5) mostrou-se significativamente (p<0,01) mais elevada que a média do GC (20.532,9±2447,1) (tabela 2). Estes resultados indicam que o grupo de escolares expostos apresenta um número maior de EROs.

Nos resultados referentes a comparação de médias da frequência de células anormais no teste de MN foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), de forma que, a média do GE ($24,9 \pm 9,8$) mostrou-se mais elevada que a média do GC ($14,9 \pm 7,8$) (tabela 2), isto nos mostra que o grupo de escolares expostos apresenta um índice de dano a nível nuclear (células alteradas) maior que o grupo não exposto.

Tabela 2 – Análise comparativa dos valores médios (média, desvio padrão) da taxa de produção de radicais livres (DCFH-DA) e da frequência de células anormais no teste MN, entre o grupo estudo e grupo controle (n=36):

Variável	Grupos						Valor-p
	Estudo (n=18)			Controle (n=18)			
	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	
Taxa de produção de radicais livres	23.144,2	2726,5	16899,5 – 27850,5	20.532,9	2447,1	16525,3 – 25236,6	0,005¶*
Frequência de células anormais – teste MN	24,9	9,8	3,0 – 42,0	14,9	7,8	7,0 – 40,0	0,002§*

Legenda: DCFH-DA = Diclorofluoresceína diacetato; Min-Max = mínimo e máximo;

¶: Teste t-Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; §: Teste t-Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias;

* $p < 0,05$;

4.6 DISCUSSÃO

Os filhos de fumicultores constituem um grupo especial de risco aos efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição continuada aos agrotóxicos e nicotina. Ao realizar-se este estudo acreditava-se que o grupo de escolares expostos aos agrotóxicos e nicotina apresentaria indicadores de possíveis alterações cocleares e de estresse oxidativo como: amplitude das EOAPD reduzida e, elevada taxa de produção de radicais livres bem como da frequência de células alteradas no teste de MN, respectivamente. Todos estes achados foram encontrados, alguns de modo estatisticamente significantes outros não, e a seguir serão cotejados com a literatura.

Tendo em vista a escassez de estudos sobre o efeito da exposição a agrotóxicos e nicotina (folha do tabaco) sobre o sistema auditivo e associação com biomarcadores de EO, nossos resultados foram comparados sempre que possível com pesquisas semelhantes. Na ausência destes, os mesmos foram relacionados a estudos com sujeitos expostos a ruídos, medicação ototóxica, cigarro, que apresentam alguma possível correlação.

As EOA captam o funcionamento da cóclea por meio das respostas das CCE, o teste pode revelar a integridade ou a alteração dessas estruturas, antes das mesmas apontarem irregularidades no exame de audiometria tonal liminar (COELHO et al., 2010).

A perda auditiva devido a exposição a agrotóxicos apresenta uma configuração semelhante à decorrente de medicação ototóxica e ruído, ou seja, caracteriza-se por ser uma alteração neurosensorial, que acomete inicialmente as altas frequências (HOSHINO et al., 2008). Vários autores têm demonstrado a importância das EOA no monitoramento audiológico de sujeitos ocupacionalmente expostos, sendo útil no diagnóstico precoce dos danos auditivos em estágios iniciais. Dentre os tipos de EOA encontram-se as Emissões otoacústicas transientes (EOAT) e a EOAPD. Estas duas técnicas têm-se demonstrado eficazes para avaliar alterações precoces no funcionamento coclear de populações ocupacionalmente expostas (ruídos e/ou químicos). A desvantagem das EOAT é que esta técnica não alcança as frequências acima de 4000 Hz, diferentemente das EOAPD que são mais eficazes para detectar frequências mais agudas, importantes na avaliação de sujeitos ocupacionalmente expostos a ruído, pesticidas e/ou solventes pelo fato

destes atingirem inicialmente as frequências altas (COELHO et al., 2010). Por este motivo, nesta pesquisa optou-se por realizar as EOAPD para abranger um número maior de altas frequências. Com isso pode-se ter deixado de captar alterações que já podem estar na cóclea (CCE), pois as EOAT são mais sensíveis para captar alterações de CCE que as EOAPD.

Como referido anteriormente, as alterações audiológicas causadas pela exposição a agrotóxicos tem configuração semelhante às causadas pelo ruído. Segundo Frota e Iorio (2002), alterações cocleares decorrentes da exposição a níveis elevados de pressão sonora devem provocar mudanças precoces na amplitude das EOA. Assim, acreditasse que as alterações cocleares causadas pelos agrotóxicos bem como da nicotina também podem gerar precocemente alterações na amplitude das EOA. Nesta pesquisa, os escolares expostos aos agrotóxicos e nicotina apresentaram alterações na amplitude das EOA precocemente, ou seja, a média da amplitude de resposta das EOAPD foi inferior no GE em todas as frequências, com diferença significativa nas frequências de 2000 e 4000 Hz (Tabela 1). Estes achados concordam com a hipótese anteriormente referida.

As EOA possuem maior especificidade e sensibilidade para identificar alterações nas CCE, pois, estas lesões provocam diminuição da amplitude das EOA (SOUSA et al., 2008) Os resultados do presente estudo concordam com os autores supracitados, pois, verificou-se que o GE apresentou média da amplitude das EOAPD menor que a do GC em todas as frequências, sendo detectada diferença significativa nas frequências de 2000 e 4000 Hz. Estes resultados sugerem que a exposição aos agrotóxicos e nicotina pode estar causando uma diminuição funcional precoce das CCE da cóclea no grupo de crianças expostas, já evidenciado pelas EOAPD.

Körbes et al. (2010) investigaram o efeito dos organofosforados sobre a audição de cobaias. Os autores não observaram alteração funcional da cóclea evidenciada pela presença das EOAPD, apenas verificaram que os dois grupos que receberam agrotóxicos apresentaram alterações na citoarquitetura das CCE, com maior prejuízo das cobaias que receberam alta dosagem. Os resultados do estudo corrente se assemelham aos achados dos autores anteriormente citados, apesar de se tratar de estudo com cobaias, também não encontrou-se alteração funcional da cóclea, destacada pela presença das EOAPD. Porém, foi verificada uma diferença na média da amplitude de resposta das EOAPD entre os grupos, que pode

caracterizar indícios de diminuição funcional precoce das CCE da cóclea no grupo de escolares expostos (Tabela 1).

Quanto à ação da nicotina sobre o sistema auditivo, os estudos encontrados na literatura são relativamente limitados, a maioria se atém aos efeitos do cigarro sobre a audição, onde a nicotina é uma das suas principais substâncias. Um estudo que avaliou o efeito do cigarro sobre o sistema auditivo comparou os resultados das EOAT, dentre outros testes, entre fumantes e não fumantes. Estes autores verificaram que o grupo de fumantes apresentou nível de resposta das EOAT menor nas frequências de 1000 Hz em ambas orelhas e 4000Hz na OE e concluíram que o cigarro tem um efeito nocivo ao sistema auditivo (PASCHOAL; AZEVEDO, 2009). Os resultados deste estudo vão ao encontro dos achados dos autores anteriormente citados, apesar da utilização das EOAPD. Observou-se que o GE apresentou nível de resposta das EOAPD menor ou igual ao GC em todas as frequências em ambas as orelhas, apresentando diferença significativa na frequência de 4000 Hz na OD e na frequência de 2000 Hz na OE. Considerando a média das duas orelhas, o GE apresentou nível de resposta das EOAPD menor em todas as frequências, com diferença significativa nas frequências de 2000 e 4000 Hz (Tabela 1).

Na literatura encontram-se diversos estudos de biomonitoramento humano em populações expostas a agrotóxicos, inclusive de crianças expostas (MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010; DA SILVA et al., 2012). Estes estudos são uma ferramenta importante para estimar os riscos, prevenir e diagnosticar precocemente futuras alterações, decorrentes da exposição a diversas substâncias tóxicas, como agrotóxico e nicotina.

No estudo corrente, no teste de MN, foi detectada diferença estatisticamente significativa ao comparar o somatório de células anormais entre os grupos, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. Estes achados concordam com os resultados de outros estudos que também encontraram diferença significativa em todos os tipos de células anormais ao compararem o grupo exposto com o GC (MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; DA SILVA et al., 2012). Outros autores estudaram especificamente crianças expostas a agrotóxicos e também observaram aumento significativo na frequência de células com MN no grupo exposto (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010). Diferentemente dos demais autores Pastor et al. (2003) não encontraram diferença entre sujeitos expostos e não expostos a agrotóxicos quanto a frequência de MN.

Outro biomarcador utilizado neste estudo foi a taxa de produção de radicais livres, este é um método fluorescente que permite a detecção de EROs. Este método é baseado na oxidação da sonda não fluorescente dihidroclorofluoresceína (DCFH) para formar um produto altamente fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF) (CHEN et al., 2010). Sabe-se que quando a diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é adicionado às células, ele se difunde através da membrana e é hidrolisado por esterases citosólicas para libertar $DCF^{\cdot-}$ que, após a reação com espécies oxidantes, forma um composto altamente fluorescente a DCF, sendo que a base deste ensaio é atribuída a emissão de fluorescência que está diretamente proporcional a presença de EROs (ROTA; CHIGNELL; MASON, 1999).

Os efeitos biológicos e toxicológicos atribuídos as EROs são cada vez mais objeto de interesse de pesquisadores de diferentes áreas, principalmente por serem associadas a várias condições patológicas. No entanto, as EROs apresentam algumas características que dificultam sua detecção como uma alta reatividade e uma meia vida curta (VOSS; SIEMS, 2006), fato que dificulta sua determinação *in vivo*. Por este motivo, as sondas fluorescentes para a detecção de EROs são ferramentas promissoras. As sondas fluorescentes são excelentes sensores de EROs, devido à sua alta sensibilidade e simplicidade na coleta de dados (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005).

Apesar disso, conforme observado na literatura, esta técnica ainda não vem sendo muito empregada nos estudos de biomonitoramento humano. Neste estudo esta técnica mostrou-se altamente sensível para detecção EROs e um bom biomarcador de EO na população estudada. Os resultados desta pesquisa mostram que, na comparação da taxa de produção de radicais livres, a média do GE apresentou-se significativamente ($p < 0,01$) mais elevada que a média do GC.

Neste estudo, buscou-se verificar se há associação entre a amplitude das EOAPD e os biomarcadores do EO em escolares expostos a agrotóxicos e nicotina. Para que se tenha um significado clínico o resultado desta associação deve apresentar-se de modo inverso, ou seja, a redução da amplitude das EOAPD deve estar relacionada ao aumento dos índices dos biomarcadores do EO, e vice-versa. Na presente pesquisa, esta associação inversa foi observada e do modo esperado, em ambos os grupos. Os resultados deste estudo revelam que o GE apresentou nível reduzido da amplitude das EOAPD e índice elevado de células alteradas no teste de MN e na taxa de produção de radicais livres, ao comparar com o GC. Estes

achados indicam uma associação entre amplitude das EOAPD e os biomarcadores do EO.

4.7 CONCLUSÃO

Neste estudo os escolares de ambos os grupos apresentaram EOAPD presentes. Porém, o GE apresentou média da amplitude de resposta das EOAPD menor em todas as frequências. Estes resultados sugerem que a exposição aos agrotóxicos, assim como a nicotina, pode estar causando uma diminuição funcional coclear (CCE) precoce no grupo de escolares expostos.

O GE apresentou índice significativamente mais elevado na taxa de produção de radicais livres e presença elevada de células alteradas no teste de MN. Estes índices elevados dos biomarcadores do EO, também, podem estar associados à exposição destes sujeitos aos agrotóxicos e nicotina.

Portanto, estes resultados apontam uma associação entre a amplitude das EOAPD e índices dos biomarcadores do EO em escolares residentes de região fumicultora.

4.8 REFERÊNCIAS

Benítez-Leite S, Machi ML, Fernandez V, Franco D, Ferro EA, Mojoli A et al. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr* . (Asunción). 2010; 37(2):97-106.

Kumar LP, Panneerselvam N. Toxic Effects Of Pesticides: A Review On Cytogenetic Biomonitoring Studies. *Facta Universitatis Series: Medicine and Biology*. 2008;15(2):46-50.

Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. A auto-percepção da saúde auditiva e vestibular de trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev CEFAC*. 2009;11(4):681-687.

Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D, Wang J. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res*. 2003; 5(3): 315-21.

Azevedo APM. Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional [Dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-44.

Biesalki HK. Free radicals theory of aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2002;5():5-10.

Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW et al. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 227:97-107. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. [Tese]. Porto Alegre: Doutorado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.

Amorin LLA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação dos agentes químicos ambientais. *Rev Brasileira de Epidemiologia*. 2003; 6(11):1-13.

Hwang ES, Kimb GH. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. 2007;229():1–10.

Kohatsu AGS, Shimabukuro F, Gattás GJF. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. *Saúde, Ética e Justiça*. 2007;12(1):15-21.

Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res*. 2009;675(1-2):1-4.

Silveira LR. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2004;48(6): 812-822.

Kemp DT. Development in cochlear mechanics and techniques for noninvasive evaluation. *Advanced Audiology*. 1998;27-45.

Lloyd IL, Kaplan H. Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry. Baltimore: University Park Press, 1978.

Jerger J. Clinical experience with impedance audiometry. *Arch. Otolaryng*. 1970; 92():311-324.

Wagner W, Heppelmann G, Vonthein R, Zenner HP. Test-retest repeatability of distortion product otoacoustic emissions. *Ear Hear*. 2008;29(3):378-91.

Rota C, Chignell CF, Mason RP. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(7-8):873–881.

Da Costa Krewer C, Ribeiro EE, Ribeiro EA, Moresco RN, Ugalde Marques da Rocha MI, Santos Montagner GF, et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. *Phytother Res*. 2011;22(10):1002-3437.

Fronza AB, Barreto DCM, Tochetto TM, Cruz IBMC, Silveira AF. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. *Braz J Otorhinolaryngol. (Impr.)*. 2011;77(1):107-14.

Coelho MSB, Ferraz JRS, Almeida EOC, Filho NA. As emissões otoacústicas no diagnóstico diferencial das perdas auditivas induzidas por ruído. *Rev CEFAC*. 2010;12(6):1050-1058.

Frota S, Iorio MCM. Emissões otoacústicas por produto de distorção e audiometria tonal liminar: estudo da mudança temporária do limiar. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002; 68(1):15-20.

Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010; 76(2):238-44.

Paschoal CP, Azevedo MF. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(6):893-902.

Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*. 2009.35():1155–1159.

Da Silva FR, Da Silva J, Dias JF, dos Santos CEI, Kahl V, Rohr P et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure of early biological effects and of susceptibility. *Journal of Hazardous Materials*. 2012. 225–226():81–90.

Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S et al. Biomonitoring of four european populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*. 2003;18():249–58.

Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7' -Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radical Research*. 2010;44(6):587–604.

Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radical Research*. 2006; 40():1339-1349.

Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65(2-3):45-80.

5 Artigo 2 – SISTEMA OLIVOCLEAR MEDIAL E GENOTOXICIDADE EM ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA

5.1 Resumo

Objetivo: avaliar a associação entre a função do sistema olivoclear medial (SOCM) e biomarcadores genotóxicos em escolares residentes de região fumicultora. **Material e método:** Participaram deste estudo 21 escolares normo-ouvintes residentes de região fumicultora que compuseram o grupo estudo (GE) e, 25 escolares normo-ouvintes que não residiam na zona rural que constituíram o grupo controle (GC). O SOCM foi avaliado através da supressão das Emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) e os biomarcadores genotóxicos foram: ensaio cometa, teste de micronúcleos (MN) e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** Ao comparar a ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos, não foi detectada associação significativa. Tanto no ensaio cometa como no ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA a média do GE mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC. No teste de MN, verificou-se diferença significativa quanto ao somatório de células alteradas e a frequência de células binucleadas, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. Já, referente à frequência de células com MN não observou-se diferença significativa entre os grupos. Não foi detectada associação entre ocorrência do efeito de supressão e os resultados dos biomarcadores genotóxicos. **Conclusão:** O GE não apresentou alterações no SOCM, evidenciado pela presença de supressão das EOAPD, porém apresentou índices de dano significativamente mais elevados dos biomarcadores genotóxicos. Entretanto, não verificou-se associação entre supressão das EOAPD e genotoxicidade.

Palavras-chave: praguicidas, fumo, audição, via eferente, genotoxicidade, crianças.

ARTICLE 2 - MEDIAL OLIVOCOCHLEAR SYSTEM AND GENOTOXICITY IN STUDENTS OF THE TOBACCO-PRODUCING REGION

5.2 Abstract

Objective: To evaluate the association between the function of the medial olivocochlear system (MOS) and the biomarkers of genotoxicity in resident students from the tobacco-producing region. **Methods:** This research included 21 normal-hearing students from the tobacco-producing region, study group (SG), and 25 normal-hearing students who did not live in the countryside, control group (CG). The MOS was assessed by the of distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) and genotoxic biomarkers, such as: comet assay, micronucleus test (MN) and fluorimetric assay for the quantification of DNA. The data were subjected to statistical analysis. **Results:** By comparing the occurrence of suppression of DPOAEs between the groups, no significant association was detected. Considering the comet assay and the fluorimetric assay for quantitation of DNA, the mean of the SG was considerate significantly higher than the mean of the CG. In the MN test, it was found a significant difference in the sum of abnormal cells and in the frequency of binucleated cells, with the mean of the SG higher than the one found in the CG. And, in relation to the frequency of cells with MN, it showed no significant difference between both groups. No association was found between the occurrence of suppression and the results of genotoxicity biomarkers. **Conclusion:** The SG had no change in MOS, which was evidenced by the presence of DPOAE suppression, but it presented injury rates considerate significantly higher in relation to the genotoxic biomarkers. However, there was no association between DPOAE suppression and genotoxicity.

Keywords: pesticides, tobacco, hearing, efferent pathway, genotoxicity, children.

5.3 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de fumo do mundo, sendo a fumicultura uma atividade de grande importância social e econômica no país. Geralmente, é realizada por pequenos agricultores (agricultura familiar), onde toda família trabalha e vive próxima a plantação, estando expostos a diversas substâncias tóxicas.

Na fumicultura, diversos tipos de agrotóxicos, de classes e toxicidades variadas, são amplamente utilizados, principalmente os organofosforados. A aplicação de agrotóxicos é ainda o meio mais eficaz para combater e prevenir as pragas agrícolas. O uso indiscriminado destas substâncias químicas garante maior produtividade e reduz as perdas da safra, porém os malefícios à saúde a curto, médio e longo prazo são desconsiderados (ARAÚJO et al., 2007; KÖRBES et al., 2010). Contudo, na fumicultura, além dos agrotóxicos, os fumicultores estão expostos a outros compostos orgânicos altamente tóxicos presentes nas folhas do fumo, dentre eles destaca-se a nicotina.

A exposição a toxinas ambientais pode ocorrer por várias rotas de absorção: inalação, ingestão ou dérmica, e pode ocorrer desde o período pré-natal (NERI et al., 2006). As crianças estão expostas aos agrotóxicos tanto por vias ambientais (em suas casas, escolas, jardins, alimentos e água contaminadas), como por vias ocupacionais, durante sua participação nas atividades laborais da família e através do contato por meio de resíduos nas roupas dos pais (SARCINELLI, 2003; PERRY, 2003).

As crianças constituem um grupo com características particulares de exposição e especial vulnerabilidade à tóxicos ambientais. Além de estarem em fase de desenvolvimento, diferem dos adultos por apresentarem relativa imaturidade das funções fisiológicas e bioquímicas dos sistemas, na proporção dos componentes corporais (água, proteínas, gordura e minérios), na estrutura anatômica dos órgãos, na capacidade de metabolizar e excretar substâncias tóxicas (PERRY, 2003). Além disso, apresentam certos hábitos mais frequentemente, como “levar a mão à boca”, que aumentam as chances de ingerir compostos tóxicos presentes na água, solo e poeira domiciliar (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010).

A gama de efeitos adversos à saúde, decorrentes dos agrotóxicos, incluem danos agudos e crônicos (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010). Atualmente, vários estudos têm demonstrado estreita relação entre perda auditiva e exposição a agrotóxicos (HOSHINO et al., 2008; CRAWFORD et al., 2008; FINKLER et al., 2012). Os agrotóxicos organofosforados induzem a alterações do sistema auditivo e vestibular, tendo sido evidenciado também seu potencial neurotóxico (HOSHINO et al., 2008), podendo afetar inclusive o sistema auditivo central.

Ainda não há muitas informações a respeito dos efeitos crônicos à saúde decorrente da exposição dermal a nicotina da folha do tabaco. A principal discussão a cerca dos efeitos ototóxicos da nicotina no fumo está relacionada ao hábito de fumar. Alguns estudos reportam que a nicotina pode ter efeito ototóxico direto e causar isquemia coclear (COCCHIORELLA; SHARP; PERSKY, 1995 apud OLIVEIRA; LIMA, 2009), bem como, interfere na transmissão neural da informação auditiva (HARKRIDER, CHAMPLIN, MCFADDEN, 2001).

O sistema auditivo central é constituído por vias auditivas aferentes e eferentes. A via auditiva eferente dividi-se em dois feixes: sistema olivococlear lateral e sistema olivococlear medial (SOCM). O SOCM é constituído por fibras mielinizadas e predominantemente cruzadas, que vão inervar as células ciliadas externas (CCE) (DURANTE, 2011). O funcionamento normal do SOCM pode ser evidenciado pela supressão ou redução das EOA com a aplicação de um ruído competitivo ipsilateral ou contralateralmente (MUÑIZ; VENTURA; ALGARRA, 2006). O registro das EOA e a análise do efeito de supressão podem ser utilizados na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear e para a elaboração de ações preventivas em audiologia (BERNARDI, 2000).

O biomonitoramento humano é a forma mais eficiente de prevenir e diagnosticar precocemente danos decorrentes da exposição humana a agentes químicos, com potencial genotóxico (ANGERER et al., 2007 apud DA SILVA, 2011). O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo que é definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes (espécies reativas de oxigênio) e antioxidantes, em favor dos primeiros (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004), causando danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA (FINDLAY; TAPIERO; TOLUNSEND, 2005).

Vários agrotóxicos foram submetidos a testes e revelaram possuir potencial genotóxico (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008). O fumo também vem sendo

reportado como fator causal de aumento dos índices de genotoxicidade (FRONZA et al., 2011). Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético (DNA) de organismos a elas expostos (KOHATSU; SHIMABUKURO; GATTÁS, 2007), esta alteração é considerada um fator de risco primário para efeitos de longo prazo.

Embora exista uma variedade de biomarcadores disponíveis para avaliar os danos genotóxicos, tanto transitórios como permanentes, a maioria dos estudos de biomonitoramento tem utilizado os testes de micronúcleos (MN) e ensaio cometa. Estas duas técnicas têm sido amplamente utilizadas para investigar danos ao DNA em populações ocupacionalmente expostas e tem-se demonstrado serem testes rápidos e sensíveis (GROVER et al., 2009 apud DA SILVA 2011; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010).

Atualmente o uso de sondas fluorescentes, como no Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA com a utilização do reagente Picogreen, vem se destacando. Esta é uma técnica objetiva e altamente sensível, a qual detecta pequenas quantidades de DNA em solução. Esta técnica desempenha um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, sendo bastante empregada na biologia molecular (DRAGAN et al., 2010), mas, também pode ser usada para analisar o efeito genotóxico ou genoprotetor de um determinado composto.

A partir do exposto, o objetivo deste trabalho foi verificar a associação entre a função da via auditiva eferente e biomarcadores genotóxicos em escolares residentes de região fumicultora, com o intuito de alertar e prevenir danos futuros nesta população.

5.4 MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo e transversal. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da instituição de origem, registrada sob o protocolo 0237.0.243.000-11 e contou com o apoio do Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST), de Santa Maria. Todos os sujeitos concordaram em participar da pesquisa e apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) assinado pelos responsáveis.

Os sujeitos deste estudo foram selecionados em escolas da rede pública de dois municípios da região central do Rio Grande do Sul. Todas as escolas permitiram a divulgação da pesquisa e assinaram o Termo de Autorização Institucional (APÊNDICE B).

Os escolares para participar da presente pesquisa apresentaram como critérios de inclusão: idade entre sete e 14 anos, ser normo-ouvintes, presença de EOAPD, não estarem expostos continuamente a ruídos intensos e a fumaça de cigarro. E como critérios de exclusão os seguintes fatores: apresentar histórico de alterações otológicas, apresentar alterações audiológicas, segundo critério adotado para este estudo e apresentar doenças crônicas e/ou fazer uso de medicação continuada.

No grupo estudo (GE), participaram escolares residentes de zona rural fumicultora. E, do grupo controle (GC) os escolares eram residentes de zona urbana de outro município, não fumicultor. Os escolares do GC foram selecionados em um município diferente do GE, com o objetivo de garantir que estes sujeitos estivessem livres da exposição a agrotóxicos e nicotina derivada da folha do tabaco.

Na seleção do GE 103 escolares se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo, porém apenas 25 demonstraram interesse em participar da pesquisa, e desses 22 participaram da pesquisa. Para o recrutamento do GC foram visitadas três escolas públicas, sendo convidados em média 250 alunos, porém demonstraram interesse apenas 57 sujeitos e destes somente 26 escolares participaram da pesquisa.

A amostra de conveniência deste estudo contou inicialmente com 48 voluntários. Destes, dois apresentaram alterações na avaliação audiológica básica

sendo excluídos da pesquisa e encaminhados aos atendimentos necessários. A amostra final ficou constituída de 46 escolares, sendo 21 pertencentes ao GE e 25 pertencentes ao GC.

As avaliações audiológicas e as coletas dos materiais biológicos, de ambos os grupos, foram realizadas no CEREST, preferencialmente todas no mesmo dia.

Inicialmente os pais e/ou responsáveis e o próprio sujeito foram submetidos a um questionário, para identificação dos critérios de inclusão e exclusão. Todos os escolares foram submetidos a inspeção visual do meato acústico externo utilizando o Otoscópio Clínico da marca *Klinik Welch-Allyn*, para verificação de quaisquer alterações que pudessem dificultar a realização dos testes, e avaliação audiológica básica, composta por: audiometria tonal liminar (ATL) e imitanciometria.

A ATL foi realizada em cabina acusticamente tratada com o audiômetro da marca *Interacoustics* modelo AC40 e fone de ouvido TDH-39. Na ATL foram pesquisados os limiares de via aérea nas frequências de 500, 1000, 2000 e 4000 Hz. A técnica utilizada foi descendente-ascendente. Foram considerados indivíduos normo-ouvintes aqueles que apresentaram média tritonal (500, 1000 e 2000 Hz) menor ou igual a 25 dBNA (decibel Nível de Audição) (LLOYD II e KAPLAN, 1978).

As medidas de imitância acústica foram realizadas com o equipamento AT 235, da marca *Interacoustics* e tom-sonda 226 Hz, para pesquisa da curva timpanométrica e dos reflexos acústicos. Estes foram pesquisados nas frequências de 500 a 4000Hz bilateralmente, no modo contralateral. Foram incluídas na amostra somente crianças com timpanograma tipo A e reflexos acústicos presentes (JERGER, 1970).

Posteriormente os sujeitos foram avaliados por meio das EOAPD em ambas as orelhas, primeiramente na ausência e, após, na presença da estimulação acústica contralateral. O registro das EOAPD foi realizado em local silencioso utilizando o equipamento portátil *Otoread Screening* da marca *Interacoustics*. Para obtenção das EOAPD (2F1-F2) foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, onde F1 é apresentada na intensidade de $L1 = 65\text{dBNPS}$ e F2 em $L2 = 55\text{dBNPS}$. Para a medida das EOAPD foram testadas as frequências de 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000Hz. Foi considerado EOAPD presentes, quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6 dBNPS em pelo menos três frequências (WAGNER et al., 2008).

A estimulação acústica contralateral foi um ruído branco, na intensidade de 60 dBNA (COLLET et al., 1992), gerado pelo audiômetro já citado (*Interacoustics*, modelo AC 40, via fone auricular TDH-39). A fim de evitar a manipulação da sonda das EOAPDs, o fone foi acoplado na orelha contralateral à captação das EOAPDs antes do início do teste. Nesta pesquisa, obedeceu-se a seguinte ordem de testagem: EOAPD na orelha direita (OD) sem ruído, EOAPD na OD com ruído, EOAPD na orelha esquerda (OE) sem ruído, EOAPD na OE com ruído.

O cálculo da supressão das EOAPD foi feito pela subtração do nível de resposta das EOAPD sem estimulação acústica contralateral do nível de resposta das EOAPD com estimulação acústica contralateral. A análise do efeito de supressão foi por *response* (resposta geral). O *response* é calculado a partir da média geométrica das freqüências sob teste. Neste estudo, foi considerado efeito de supressão presente quando houve redução das amplitudes das EOAPD de pelo menos 0,5 dB e efeito de supressão ausente quando diferença foi menor que 0,5 ou negativa. De acordo com Collet et al. (1992), um efeito de supressão de 0,5 a 1,0 dB revela a integridade do SOCM.

Por último foi executada a coleta do material biológico para realizar os testes genotóxicos, porém, apenas 18 sujeitos do GE e 18 sujeitos do GC realizaram este procedimento, diminuindo a amostra para estas avaliações.

Os testes de genotoxicidade realizados neste estudo foram: ensaio cometa, teste de micronúcleos (MN) e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. A coleta do material biológico (sangue e células epiteliais da mucosa oral), para a execução desses testes, foi efetuada por uma técnica de enfermagem capacitada. Após a coleta, o sangue foi imediatamente armazenado em um tubo com anticoagulante de heparina sódica e, utilizado no ensaio cometa e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. As células epiteliais, para o teste de MN, foram depositadas em um tubo cônico tipo *Falcon*, contendo 2 mL de solução fisiológica ou solução PBS pH 7,4.

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al., (1988) e modificado por Collins Ma e Duthie, (1995). Para cada indivíduo foram confeccionadas lâminas em duplicata. Todos os passos foram conduzidos sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA. Para execução da técnica, foram misturados 5 μ L de amostra (leucócitos) com 90 μ L de 0,75% Agarose em um *eppendorf*. A solução foi adicionada em uma lâmina pré-coberta com 1% de agarose normal, e coberta por uma lamínula, ficando na geladeira por cinco minutos. Após, a

lamínula foi retirada e a lâmina colocada em uma cuba com solução de lise por um dia, a 4°C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com água destilada. Em seguida, foram colocadas em uma cuba horizontal contendo solução de eletroforese. As lâminas ficaram nessa solução por 20 minutos em repouso para permitir o desenovelamento do DNA, e posteriormente foi realizada a eletroforese por 20 minutos a 25 Voltz (V) e 300 microAmperes (mA). Então, as lâminas foram colocadas em uma cuba com solução neutralizadora por cinco 45 minutos, foram lavadas três vezes com água destilada e ficaram secando até o outro dia em temperatura ambiente. As lâminas foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução fixadora por dez minutos. A seguir, foram lavadas três vezes e postas para secar em temperatura ambiente. Foram novamente reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução corante por 25 minutos a 37°C. Depois da coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada e novamente colocadas para secar em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca *Olympus®*, modelo CX40, com aumento de 400 vezes. Foi feita uma contagem, para cada amostra, de 100 células (50 por lâmina). As lâminas foram analisadas por dois observadores independentes e, para o índice de dano (ID), foi considerada a média dos danos das duas lâminas analisadas. O cálculo do índice de dano (ID), foi feito a partir da fórmula proposta por Cavalcanti et al. (2008): $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n = número núcleos de cada classe analisada.

As cinco categorias que foram usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García et al. (2004) e mostradas na figura 1, a seguir:

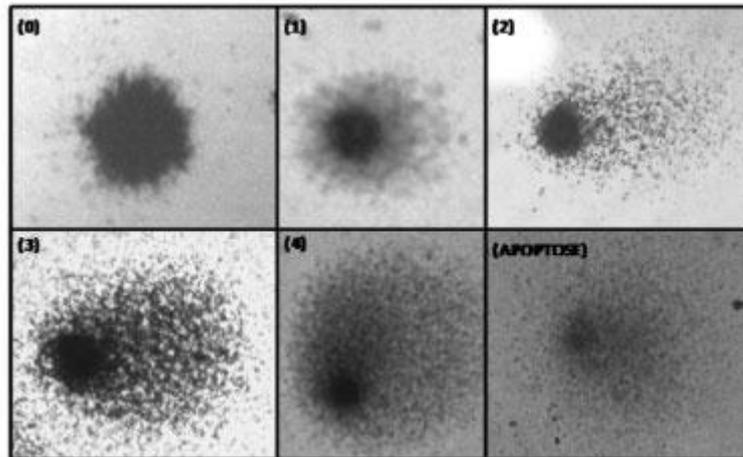


Figura 1. Classificação do Dano ao DNA. (Fronza et al., 2011).

No teste de MN, as amostras de células epiteliais da mucosa oral foram centrifugadas a 1000-1500 RPM por dez minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante usando pipetas *Pauster* individuais, com cuidado para não remover o *pellet* de células. Então foi adicionado 1,5 mL de solução fixadora e centrifugado novamente a 1000-1500 RPM durante 1-2 minutos. Novamente foi desprezado o sobrenadante, mantendo um pouco da solução fixadora no tubo, e então homogeneizado o conteúdo com pipetas *Pauster* para ressuspender as células. O conteúdo foi depositado em lâminas limpas e previamente identificadas, as quais foram colocadas para secar em temperatura ambiente por 10-15 min. Depois foi realizada a coloração utilizando coloração panótica. Para finalizar as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas novamente para secar em temperatura ambiente durante a 20-25 min.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca *Olympus*®, modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem dos micronúcleos presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1000 células sendo classificadas quanto: célula normal (sem alteração), célula com MN, célula binucleada (BN), célula com pontes nucleares (PNs) e células com Buds nucleares (BUD) ou “*Broken eggs*”, conforme a figura abaixo:

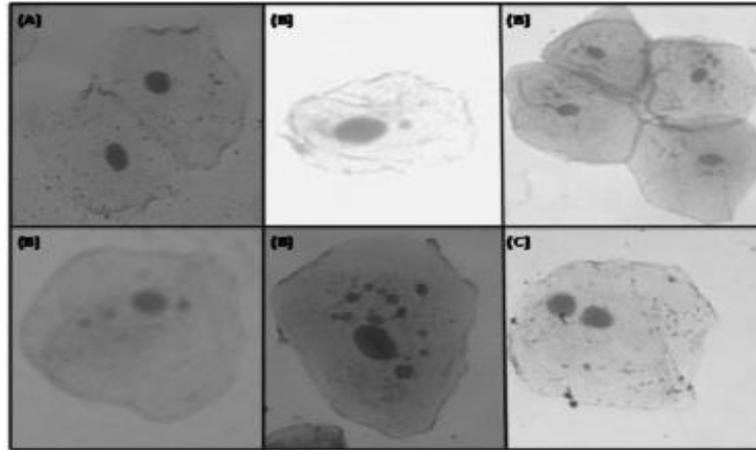


Figura 2. Classificação das células do teste de MN: A (célula sem alteração); B (célula com MN); C (célula BN). (FRONZA et al., 2011)

Para efeito comparativo, foram utilizados somente os resultados de índice de dano ao DNA no Ensaio Cometa. E, para o teste de MN, considerou-se o somatório de células anormais, o total de células com MN e o total de células binucleadas.

No ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, inicialmente o sangue total foi centrifugado a 2000 RPM durante dez min. Para esta técnica foi utilizado o plasma sanguíneo.

Antes de iniciar o experimento fez-se a leitura da placa de Elisa vazia. Em seguida, pipetou-se 10 μ L do plasma em placa de Elisa preta em, no mínimo, quadruplicatas. Na sequência foi adicionado 10 μ L do reagente PicoGreen®. Após o término das pipetagens, a placa foi mantida em repouso (incubação) durante 5 min, em temperatura ambiente e de forma protegida da luz (pois o reagente Picogreen é fotossensível). Passado o período de incubação, realizou-se a leitura da placa em fluorescência, com 480nm de excitação e 520 nm de emissão. A interpretação dos valores obtidos é dada de forma que quanto maior o valor de fluorescência, mais DNA livre há no meio, indicando morte celular.

As análises estatísticas foram executadas com o auxílio do *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0. Para verificar a normalidade das variáveis utilizou-se o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Em todas as análises foi adotado nível de significância de 5%.

Para a análise da ocorrência do efeito de supressão das EOAPD foi utilizado o teste Exato de Fisher. Na comparação dos resultados do Ensaio Cometa, ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA e teste de micronúcleos (MN) utilizou-se o

teste t-Student para amostras independentes. E, para comparação entre ocorrência de efeito de supressão e os testes genotóxicos foi utilizado o teste de Mann Whitney.

5.5 RESULTADOS

Todos os sujeitos, de ambos os grupos, apresentaram EOAPD em ambas as orelhas.

Na comparação da ocorrência do efeito de supressão entre OD e OE, tanto no GE como GC, não verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$). Em função disto, passou-se a considerar a presença ou ausência do efeito de supressão das EOAPD da OD e da OE simultaneamente, levando-se em consideração somente o grupo ao qual os escolares pertenciam. Considerou-se ausência de supressão da EOAPD quando este esteve ausente em ambas as orelhas.

Ao comparar a ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos, não foi detectada associação estatística significativa ($p > ,05$), apontando para uma relação de independência entre grupos e ocorrência de supressão das EOAPD (tabela 1).

Tabela 1- Análise comparativa da ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos estudo e controle (n=46):

Supressão	Grupos		Valor-p ^f
	Estudo (n=21)	Controle (n=25)	
Presente	19 (90,5%)	25 (100,0%)	0,203
Ausente	2 (9,5%)	0 (0,0%)	

f: Teste Exato de Fisher; * $p < 0,05$

Na comparação da média do índice de dano no Ensaio Cometa os resultados apontaram que a média do GE ($48,4 \pm 3,2$) mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC ($37,1 \pm 17,2$). A diferença significativa também se configurou na comparação do escore do teste Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, onde a média no GE foi mais elevada que no GC ($46,1 \pm 18,9$ vs. $24,5 \pm 4,9$; $p < 0,001$) (tabela 2).

Tabela 2 - Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) do índice de dano do ensaio cometa e do ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, entre os grupos estudo e controle (n=36):

	Grupos						Valor-p
	Estudo (n=18)			Controle (n=18)			
	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	Média	Desvio padrão	Amplitude (Min-Max)	
Ensaio Cometa	48,4	3,2	28,5 – 70,5	37,1	17,2	11,0 – 74,0	0,033¶
Ensaio fluorimétrico quantificação de DNA	46,1	18,9	25,7 – 84,8	24,5	4,9	19,1 – 38,4	<0,001§

Legenda: Min-Max = mínimo e máximo;

¶: Teste t-Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; §: Teste t-Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias;

*p< 0,05;

No teste de MN, ao comparar o somatório de células anormais entre os grupos, foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p<0,01$), de forma que, a média do GE ($24,9\pm 9,8$) mostrou-se mais elevada que a média do GC ($14,9\pm 7,8$) (tabela 2). Nos resultados referentes a comparação entre grupos da frequência de células binucleadas, foi detectada diferença estatística significativa ($p<0,01$), de forma que, o grupo estudo ($12,2\pm 6,5$) apresentou média mais elevada que o grupo controle ($6,3\pm 2,2$). Na comparação da frequência de células com MN o GE também apresentou a taxa de células com MN maior que o GC, porém a diferença significativa não se configurou ($p>0,05$), apontando que, as variações das médias entre os GE e GC se devem ao acaso (tabela 3).

Tabela 3 - Análise comparativa dos valores médios (média e desvio padrão) das variáveis do teste de MN entre os grupos estudo e controle (n=36):

Variáveis	Grupos						Valor-p
	Estudo (n=18)			Controle (n=18)			
	Média	Desvio padrão	Amplitude	Média	Desvio padrão	Amplitude	
Células anormais	24,9	9,8	3,0 – 42,0	14,9	7,8	7,0 – 40,0	0,002§*
Binucleadas	12,2	6,5	2,0 – 27,0	6,3	2,2	3,0 – 11,0	0,002§
Micronúcleos	11,6	7,2	0,0 – 24,0	8,2	7,2	1,0 – 32,0	0,168¶

Legenda: MN = micronúcleos

¶: Teste t-Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; §: Teste t-Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias;

*p < 0,05;

Tomando como base de comparação a presença e ausência do efeito de supressão das EOAPD, foi comparado, em cada grupo, o índice de dano do Ensaio cometa e Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, bem como, a frequência de células anormais do teste de MN. Conforme os resultados da tabela 4, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), indicando que as médias das variáveis comparadas independem da supressão no GE. Nas informações referentes ao GC não foram registrados caso de ausência de supressão das EOAPD, o que impediu a realização da análise comparativa.

Tabela 4 - Associação entre efeito de supressão das EOAPD e índice de dano ao DNA em testes genotóxicos entre os grupos estudo e controle:

Variáveis	Grupos					
	Estudo			Controle		
	Supressão		p ϵ	Supressão		
	Presente (n=16)	Ausente (n=2)		Presente (n=18)	Ausente (n=0)	
Ensaio Cometa	48,2 \pm 13,7	50,2 \pm 10,2	0,844	37,1 \pm 17,2	±	
Ensaio fluorimétrico quantificação de DNA	45,1 \pm 18,6	53,2 \pm 27,2	0,569	24,5 \pm 4,9	±	
Células anormais – teste de MN	24,9 \pm 10,3	25,0 \pm 7,1	0,994	14,9 \pm 7,8	±	

ϵ : Teste de Mann Whitney; *p < 0,05;

5.6 DISCUSSÃO

Os potenciais efeitos na saúde associados com a exposição de crianças a agrotóxicos são objeto de preocupação constante. Porém, os efeitos crônicos da exposição continuada a agrotóxicos, bem como a nicotina (folha do tabaco), sobre o corpo humano em desenvolvimento ainda são pouco conhecidos.

Como referido anteriormente os agrotóxicos podem afetar o sistema auditivo periférico e central. Na presente pesquisa, foi estudado o efeito dos agrotóxicos e nicotina sobre o SOCM por meio da supressão das EOAPD. Ao comparar a ocorrência do efeito de supressão das EOAPD entre os grupos, não foi detectada associação estatística significativa ($p > 0,05$), apontando para uma relação de independência entre grupos e ocorrência de supressão das EOAPD. Estes resultados sugerem que a exposição a substâncias tóxicas (agrotóxicos e nicotina) não afetou as funções do SOCM na população estudada.

Ressalta-se que, devido à escassez de estudos relacionando o SOCM com exposição aos agrotóxicos e nicotina, os resultados desta pesquisa foram comparados sempre que possível com estudos semelhantes. Na ausência desses, os mesmos foram relacionados a estudos com sujeitos expostos a ruído e/ou outras substâncias ototóxicas e também com estudos que avaliaram o sistema auditivo central por meio de potenciais evocados auditivos.

Os agrotóxicos organofosforados, mais utilizados na lavoura de fumo, apresentam um mecanismo de ação, baseado na inibição da acetilcolinesterase, que consequentemente aumenta o nível do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001). Segundo Harkrider, Champlin, McFadden (2001) a nicotina também apresenta efeito sobre o neurotransmissor acetilcolina. Os mesmos pesquisadores avaliaram os resultados das EOA e PEATE de dez sujeitos normo-ouvintes e não fumantes, após a administração da nicotina, e perceberam que a mesma interfere na transmissão neural da informação auditiva. O efeito da nicotina nos centros neurais altos pode ter efeito inibitório eferente sobre as CCE. Isto se deve à aceleração da acetilcolina, que é o neurotransmissor da eferência do sistema auditivo, o que implicaria no aumento do efeito da supressão das EOA.

Outra pesquisa avaliou o efeito do cigarro sobre o sistema auditivo comparando os resultados da audiometria convencional e de alta frequência, das

EOAT e do efeito supressão entre fumantes e não fumantes e concluíram que o cigarro tem um efeito nocivo sobre a audição. Especificamente sobre a avaliação do SOCM os estudiosos observaram uma redução no nível de resposta das emissões otoacústicas (supressão) em 100% dos casos em ambos os grupos, sendo que o grupo de fumantes apresentou valores maiores de supressão quando comparado ao grupo não fumante (PASCHOAL; AZEVEDO, 2009). Os resultados desta pesquisa discordam dos dois estudos anteriormente referidos, pois, não verificou-se aumento no efeito de supressão das EOAPD dos escolares expostos a agrotóxicos e nicotina.

Um estudo, que avaliou a condição do SOCM de sujeitos expostos a solventes orgânicos por meio do efeito de supressão das EOAT, observou que a presença do efeito supressor das EOAT foi maior no grupo controle (72%) em comparação ao grupo estudo (58%), mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (QUEVEDO; TOCHETTO; AMARAL, 2012). Na presente pesquisa a presença do efeito supressor também foi maior no GC (100%) quando comparado ao GE (90%), mas esta diferença foi ainda menos expressiva.

Körbes et al. (2010) investigaram o efeito dos organofosforados sobre a audição de cobaias. Foi realizado EOAPD, PEATE e análise histológica da cóclea de três grupos de cobaias (controle, submetidos a baixa e alta dosagem de agrotóxicos). Os autores não observaram alteração funcional da cóclea e nervo auditivo, apenas verificaram que os dois grupos que receberam agrotóxicos apresentaram alterações na citoarquitetura das CCE, com maior prejuízo das cobaias que receberam alta dosagem. Nesta pesquisa, também não foi observado alteração funcional do SOCM.

Manjabosco, Morata e Marques (2004) referem que a perda auditiva pode ser uma manifestação precoce da intoxicação a agrotóxicos, lesionando tanto o componente periférico, quanto a audição central. O registro das EOA e a análise do efeito de supressão podem ser utilizados na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear (BERNARDI, 2000). O presente estudo, não demonstrou alteração no sistema auditivo, evidenciado pela presença das EOAPD e efeito de supressão.

Outra forma de prever riscos de desenvolvimento de diversas doenças decorrente da exposição a substâncias tóxicas é por meio do biomonitoramento. Esta é uma ferramenta útil para estimar o risco genético a partir de uma exposição integrada a uma complexa mistura de produtos químicos (KUMAR;

PANNEERSELVAM, 2008). Neste estudo, os biomarcadores genotóxicos utilizados foram: ensaio cometa, ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA e teste de MN.

No ensaio cometa o grupo de escolares expostos apresentou índice de dano significativamente mais elevado que o grupo não exposto. Estes achados vão ao encontro dos resultados de outros autores (JUFFO et al., 2009), que ao estudarem os efeitos genotóxicos em fumicultores por meio do teste cometa, também demonstraram que o grupo exposto apresentou um aumento significativo de danos ao DNA quando comparados ao GC. Da Silva et al. (2012) também observou aumento de dano ao DNA pelo ensaio cometa três vezes maior em fumicultores comparado ao grupo não exposto.

Segundo Da Silva (2011) os possíveis danos genotóxicos ocasionados pela nicotina são ainda desconhecidos. Alguns estudos (KLEINASSER et al., 2005 apud DA SILVA, 2011; SOBKOWIAK; LESICKI, 2009 apud DA SILVA, 2011) observaram efeito genotóxico da nicotina por meio do ensaio cometa.

No ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA o grupo de escolares expostos também apresentou média mais elevada que o GC, esta diferença foi altamente significante ($p < 0,001$). O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA é um teste que utiliza o reagente fluorescente ultrasensível Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen), o qual detecta pequenas quantidades de fita dupla de DNA em solução (AHN et al., 1996). O PicoGreen (PG) se liga ao DNA e ao ligar-se aumenta sua fluorescência > 1000 vezes e esta é proporcional a quantidade de DNA presente (circulante) (IKEDA, IWAKIRI, YOSHIMORI, 2009; DRAGAN; BISHOP; GEDDES, 2010).

Na literatura consultada, os estudos que utilizam o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA como biomarcador de exposição a pesticidas são limitados. Porém, é uma técnica que desempenha um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, como técnicas de biologia molecular e de diagnóstico (DRAGAN et al., 2010); como biomarcador para doenças severas como a Dengue Hemorrágica (HA et al., 2011).

No presente estudo o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, utilizando o reagente PicoGreen, mostrou-se ser uma técnica eficaz e altamente sensível para analisar o efeito genotóxico dos pesticidas sobre a população exposta. Estes resultados vão ao encontro dos achados de Parra, Sánchez-Fortún e Castanõ (2010), apesar das análises terem sido feitas em diferentes tipos de células

(linfócitos e células teciduais). Eles estudaram a aplicabilidade do reagente Picogreen na quantificação de DNA para determinar o efeito genotóxico induzido por agrotóxicos organofosforados em células teciduais de peixes. Eles concluíram que esta metodologia foi capaz de colocar em evidência o grau de danos ao DNA induzidos por estes agrotóxicos, e, portanto, pode ser utilizada para prever a genotoxicidade de pesticidas, neste tipo de células. E ressaltam que a quantidade de produtos químicos necessários, o custo e o tempo requerido para o teste é drasticamente reduzido, podendo substituir outros testes de genotoxicidade.

Já o teste de MN é uma técnica amplamente utilizada nos estudos de biomonitoramento de populações expostas a diversas substâncias tóxicas. No estudo corrente, no teste de MN, foi detectada diferença estatisticamente significativa ao comparar o somatório de células anormais e a freqüência de células binucleadas entre os grupos, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. No entanto, na comparação da freqüência de células com MN a diferença significativa não se configurou, apesar da média do GE ser maior que a do GC. Estes achados concordam parcialmente com os resultados de outros estudiosos que encontraram diferença significativa em todos os tipos de células anormais ao compararem o grupo exposto com o GC (MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010; DA SILVA et al., 2012).

A maioria dos estudos analisa apenas a freqüência de células com MN, diferentemente deste estudo. Diversos estudos relataram aumento significativo na freqüência de MN em sujeitos expostos a agrotóxicos, quando comparadas com um grupo controle (SAILAJA et al., 2006; MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; BORTOLI; AZEVEDO; SILVA, 2009). Outros autores estudaram especificamente crianças expostas a agrotóxicos e também observaram aumento significativo na freqüência de células com MN no grupo exposto (NERI, 2006; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010). Os resultados deste estudo discordam dos achados dos referidos autores. No entanto, estes resultados vão ao encontro dos achados de Pastor et al. (2003) que também não encontraram diferença entre sujeitos expostos e não expostos a agrotóxicos quanto a freqüência de MN.

Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo causado por diversos fatores de risco podem alterar a audição (BJELLAND; SEEBERG, 2003; ARBOLEDA-MORENO et al., 2004). No presente estudo, buscou-se analisar a associação entre as funções do SOCM (presença e ausência da supressão das EOAPD) e os danos

genotóxicos. Nossos resultados apontam que o índice de dano encontrado nos testes genotóxicos independe da supressão das EOAPD no GE, ou seja, não há associação positiva entre as variáveis. Fronza et al. (2011) verificaram que indivíduos tabagistas apresentam índices elevados de genotoxicidade, evidenciado pelo ensaio Cometa, porém, não observaram associações significativas entre a ausência de efeito de supressão das EOAPD e genotoxicidade.

5.7 CONCLUSÃO

Neste estudo não foram observadas alterações no SOCM, evidenciada pela presença de supressão das EOAPD, nos escolares residentes de região fumicultora. Porém, já foram observados índices de dano significativamente elevados dos biomarcadores genotóxicos, nos escolares expostos. Entretanto, não verificou-se associação entre supressão das EOAPD e genotoxicidade.

Estes achados mostram que não há alteração da função auditiva (SOCM), porém, os resultados dos biomarcadores genotóxicos indicam a presença de um perfil genético suscetível para o desenvolvimento de futuras patologias decorrentes da exposição a estes pesticidas, podendo estar entre elas a perda auditiva.

5.8 REFERÊNCIAS

Araújo AJ, de Lima JS; Moreira JC; Jacob SC; Soares MO; Monteiro MCM et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos a saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2007;12(1):115-30.

Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(2):238-44.

Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D et al. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res*. 2006;612(1):1-13.

Sarcinelli PN. A exposição de crianças e adolescentes a agrotóxicos. In: PERES F, MOREIRA J C (eds). *É veneno ou é remédio? Agrotóxico, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, pp.43-58. Disponível em PDF: <<http://www.fiocruz.br/editora/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inoid=175&sid=5>>

Perry MJ. Children's agricultural health traumatic injuries and hazardous inorganic exposures. *Rural health practice applications*. 2003;19(3):269-278.

Benítez-Leite S, Machi ML, Fernandez V, Franco D, Ferro EA, Mojoli A et al. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr* . (Asunción). 2010; 37(2):97-106.

Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(6): 912-918.

Crawford JM, Alavanja MC, Blair A, Sandler DP, Kamel F. Hearing Loss Among Licensed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. *J Occup Environ Med*. 2008;50(7):817-26.

Finkler AD, Silveira AS, Munaro G, Zanrosso CD. Otoprotection in guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(3):122-8.

Cocchiorella LA, Sharp DS, Persky VW. Hearing threshold shifts white-cell count and smoking status in working men. *Occup Med*. 1995; 45(4):179-85. In: Oliveira DCCM;

Lima MAMT. Da audiometria tonal laminar em baixa e alta freqüência: comparação dos limiões auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(5):738-44.

Harkrider AW, Champlin CA, Mcfadden D. Acute effect of nicotine on non-smokers: OAEs and ABRs. *Hear Res.* 2011;160():73-88.

Durante AS. Emissões otoacústicas. In: Bevilacqua MC, Martinez MAN, Balen AS, Pupo AC, Reis ACMB, Frota S (eds). *Tratado de Audiologia.* São Paulo: Santos; 2011, pp. 145-158.

Muñiz JF, Ventura AM, Algarra JM. Estudio de la correlación existente entre el efecto supresor contralateral y la fatiga auditiva mediante otoemisiones acústicas transitórias. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2006;57(5):199-203.

Bernardi APA. Trabalhadores expostos simultaneamente a ruído e tolueno: estudo das emissões otoacústicas evocadas e efeito de supressão. São Paulo, 2000, 141 f. (Dissertação de Mestrado em Saúde Pública - Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública);

Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ – Health.* 2007;210(3-4):201-28. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004.142(2):231-244.

Findlay VJ, Tapiero H, Tolunsend DM. Sulfiridoxin: a potential therapeutic agent? *Biomedicine e Pharmacotherapy.* 2005;59(7):374-79.

Kumar LP, Panneerselvam N. Toxic Effects Of Pesticides: A Review On Cytogenetic Biomonitoring Studies. *Facta Universitatis Series: Medicine and Biology.* 2008;15(2):46-50.

Fronza AB, Barreto DCM, Tochetto TM, Cruz IBMC, Silveira AF. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. *Braz J Otorhinolaryngol. (Impr.).* 2011;77(1):107-14.

Kohatsu AGS, Shimabukuro F, Gattás GJF. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. *Saúde, Ética e Justiça*. 2007.12(1):15-21.

Grover P, Singh SP, Prabhakar PV, Reddy UA, Balasubramanyam A, Mahboob M et al. In vivo assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* and seed extract in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47(8):1964-71. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associada à suscetibilidade genética. Porto Alegre, 2011, 171 f, Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul);

Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophysical Journal*. 2010; 99(9):3010–3019.

Lloyd IL, Kaplan H. Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry. Baltimore: University Park Press, 1978.

Collet L, Veuillet E, Bene J, Morgon A. Effects of contralateral white noise on click evoked emissions in normal and sensorineural ears: towards an exploration of the olivocochlear system. *Audiology*.1992;31():1-7.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175:184-191.

Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, *Mutat Res (DNA Repair)*. 1995; 336:69-77.

Cavalcanti BC, Sombra CML, Oliveira JHHL, Berlinck RGS, Moraes MO, Pessoa C. Cytotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comp Biochem Physiol A*. 2008;147(4):409-15.

Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res*. 2004;556:25-34.

Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits. Molecular Probes Invitrogen detection technologies. 2008.

Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RCOC et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil Rev Saúde Pública.2001; 35(2):130-35.

Paschoal CP, Azevedo MF. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. Braz J Otorhinolaryngol. 2009;75(6):893-902.

Quevedo LS, Tochetto TM, Siqueira MA. Condição coclear e do sistema olivococlear medial de frentistas de postos de gasolina expostos a solventes orgânicos. Arquivos Int. Otorrinolaringol. 2012;16(1): 50-56.

Manjabosco CAW, Morata TC, Marques SJM. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. Arq Int Otorrinolaringol. 2004;8(4):284-95.

Juffo DD, Silva FR, Rohr P, Kvitko K, Da Silva J. Avaliação do dano causado ao DNA de trabalhadores da lavoura de fumo do município de Venâncio Aires RS. In: V Jornada de Iniciação Científica- Meio Ambiente- FZB-RS e FEPAM, 2009, Porto Alegre. Anais da V Jornada de Iniciação Científica-Meio Ambiente-FZB-RS e FEPAM, 2009. p. 1-1.

Da Silva FR, Da Silva J, Dias JF, dos Santos CEI, Kahl V, Rohr P et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure of early biological effects and of susceptibility. Journal of Hazardous Materials. 2012. 225–226():81–90.

Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. Porto Alegre, 2011, 171 f, Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul);

Kleinasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Haneus UA, Lich AK, Richter E. The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. Toxicol Sci. 2005;86(2):309-17. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. Porto Alegre, 2011, 171 f, Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sobkowiak R, Lesicki A. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. Drug Chem Toxicol. 2009;32(3):252-57. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. Porto Alegre, 2011, 171 f, Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul);

Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1996;24(13):2623–2625.

Ikeda Y, Iwakiri S, Yoshimori T. Development and characterization of a novel host cell DNA assay using ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain “PicoGreen”. *J Pharm Biomed. Anal*. 2009;49(4):997–1002.

Ha TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PLoS ONE*. 2011;6(10).

Dragan AI, Bishop ES, Geddes CD. Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification. *Anal Biochem*. 2010;396(1):8–12.

Parra JM, Sánchez-Fortún S, Castañó A. Assessment of Genotoxic Effects Induced by Selected Pesticides on RTG-2 Fish Cells by Means of a Modified Fast Micromethod Assay. *Environ Toxicol*. 2010; 27(4):238-243.

Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International*. 2009.35():1155–1159.

Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, Mahboob M, Rahman MF, Vuyyuri SB, et-al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res*. 2006;609(1):74-80.

Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res*. 2009;675(1-2):1-4.

Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S et al. Biomonitoring of four european populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*. 2003;18():249–58.

Bjelland S, Seeberg E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*. 2003;29(1-2):37-80.

Arboleda-Moreno Y, Hoyos LS, Carvajal S, Sierra-Torres CH. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15(6):367-72.

6 DISCUSSÃO GERAL

Os efeitos na saúde em consequência da exposição de crianças a agrotóxicos são objeto de preocupação constante. No caso da fumicultura os riscos a saúde são agravados pelo contato com a nicotina contida na folha do tabaco. As crianças constituem um grupo especial de risco, pois, seu organismo em desenvolvimento está mais vulnerável as ações destas substâncias tóxicas. Dentre os efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição aos agrotóxicos, bem como a nicotina, pode-se citar as alterações no sistema auditivo.

O principal propósito desta pesquisa foi identificar precocemente possíveis danos não perceptíveis, como danos auditivos, causados pela exposição aos agrotóxicos e nicotina. O diagnóstico precoce permite proporcionar melhores condições de vida a estes sujeitos, principalmente quando se sabe das interferências da perda auditiva na qualidade de vida das pessoas. Especialmente no caso de escolares, as consequências sobre seu desenvolvimento/aprendizado ou mesmo futuramente na vida adulta.

A gama de efeitos adversos à saúde, decorrentes dos agrotóxicos, incluem danos agudos e crônicos (BENÍTEZ-LEITE et al., 2010). Os agrotóxicos organofosforados induzem a alterações do sistema auditivo e vestibular, tendo sido evidenciado também seu potencial neurotóxico (HOSHINO et al., 2008), podendo afetar inclusive o sistema auditivo central.

Referente à ação da nicotina sobre o sistema auditivo são escassos os estudos na literatura. Algumas pesquisas reportam que a nicotina pode ter efeito ototóxico direto e causar isquemia coclear (COCCHIORELLA; SHARP; PERSKY, 1995 apud OLIVEIRA; LIMA, 2009), bem como, interfere na transmissão neural da informação auditiva (HARKRIDER, CHAMPLIN, MCFADDEN, 2001).

Neste estudo todos os sujeitos apresentaram EOAPD presentes, evidenciando bom funcionamento coclear (CCE). Porém, no grupo de escolares expostos já verificou-se uma diminuição na média da amplitude das EOAPD em todas as frequências em comparação com o GC, sendo detectada diferença significativa nas frequências de 2000 e 4000 Hz. Estes achados sugerem que a exposição aos agrotóxicos e nicotina pode estar causando uma diminuição funcional

das CCE (cóclea) precoce no grupo de escolares expostos, evidenciado pelas EOAPD. Os resultados deste estudo vão ao encontro do proposto por Sousa et al., (2008), os quais referem que as alterações na CCE provocam uma diminuição da amplitude das EOA.

Dentre os tipos de EOA encontram-se as Emissões otoacústicas transientes (EOAT) e a EOAPD. Estas duas técnicas têm-se demonstrado eficazes para avaliar alterações precoces no funcionamento coclear de populações ocupacionalmente expostas (ruídos e/ou químicos). A desvantagem das EOAT é que esta técnica não alcança as frequências acima de 4000 Hz, diferentemente das EOAPD que são mais eficazes para detectar frequências mais agudas, importantes na avaliação de sujeitos ocupacionalmente expostos a ruído, pesticidas e/ou solventes pelo fato destes atingirem inicialmente as frequências altas (COELHO et al., 2010). Por este motivo, nesta pesquisa optou-se por realizar as EOAPD para abranger um número maior de altas frequências. Com isso pode-se ter deixado de captar alterações que já podem estar na cóclea (CCE), pois as EOAT são mais sensíveis para captar alterações de CCE que as EOAPD.

Como citado anteriormente estas substâncias tóxicas (agrotóxicos e nicotina) podem também ter efeito neurotóxico, inclusive afetar o sistema auditivo central. A supressão das EOA é uma técnica que permite avaliar a funcionalidade do SOCM. Nesta pesquisa, não observou-se diferença significativa quanto a ocorrência do efeito de supressão, sugerindo que a exposição aos agrotóxicos e nicotina não afetou as funções do SOCM na população estudada.

Segundo Bernardi (2000) o registro das EOA bem como a análise do efeito de supressão podem ser utilizados na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear. No estudo corrente, não verificou-se alteração no SOCM evidenciado pela presença da supressão das EOAPD, porém, no registro das EOAPD já verificou-se uma diminuição na amplitude das EOAPD no GE, o que pode ser um indício de diminuição da função coclear (CCE) precoce.

Atualmente existe uma crescente de estudos sobre o estresse oxidativo e suas consequências na saúde humana. Este é definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes (EROs) e antioxidantes, em favor dos primeiros. As EROs estão associadas a um número cada vez maior de patologias, incluindo, em menor frequência, a perda da audição (alteração de funcionamento coclear).

Com isso tem-se outra forma de prevenir precocemente os danos causados pela exposição a substâncias tóxicas, como agrotóxicos e nicotina, por meio do biomonitoramento humano, o qual é realizado utilizando parâmetros biológicos chamados biomarcadores. Esse permite identificar fatores de risco para o desenvolvimento de determinadas patologias (MUNIZ et al., 2008 apud DA SILVA, 2011), podendo estar entre elas a perda auditiva.

Existe uma grande variedade de biomarcadores disponíveis para avaliar os efeitos do estresse oxidativo, alguns verificam os resultados da exposição nos alvos especificamente como danos ao DNA (teste de MN e ensaio cometa) ou, quantificam os níveis de produção de EROs no organismo utilizando os métodos fluorescentes.

A capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético (DNA) de organismos a elas expostos é chamada genotoxicidade (KOHATSU; SHIMABUKURO; GATTÁS, 2007). Pesquisas já demonstraram que tanto os agrotóxicos (KUMAR; PANNEERSELVAM, 2008) como a nicotina (FRONZA et al., 2011) possuem este efeito genotóxico. A genotoxicidade pode ser avaliada por meio do ensaio cometa, teste de MN e/ou ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA.

No ensaio cometa o grupo de escolares expostos (GE) apresentou índice de dano significativamente mais elevado que o grupo não exposto (GC). Estes achados vão ao encontro dos resultados de outros autores que também encontraram aumento significativo do índice de dano a DNA no grupo exposto (fumicultores) quando comparado ao GC (JUFFO et al., 2009; DA SILVA et al. 2012).

No teste de MN, observou-se diferença significativa ao comparar o somatório de células anormais e a frequência de células binucleadas entre os grupos, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. Estes achados concordam com os resultados de outros pesquisadores que encontraram diferença significativa em todos os tipos de células anormais ao compararem o grupo exposto com o GC (MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010; DA SILVA et al., 2012).

No entanto, na comparação da frequência de células com MN a diferença significativa não se configurou. Estes resultados discordam dos achados de diversos estudos os quais relataram um aumento significativo na frequência de MN em sujeitos expostos a agrotóxicos, quando comparadas com um GC (SAILAJA et al., 2006; MARTÍNEZ-VALENZUELA et al., 2009; BORTOLI; AZEVEDO; SILVA, 2009),

inclusive naqueles que estudaram especificamente crianças expostas a agrotóxicos (NERI, 2006; BENÍTEZ-LEITE et al., 2010). Porém, nossos resultados corroboram os achados de Pastor et al. (2003) que também não verificaram diferença entre sujeitos expostos e não expostos a agrotóxicos quanto a frequência de MN.

Recentemente a utilização de sondas fluorescentes vem se destacando por serem métodos altamente sensíveis e que permitem uma análise quantitativa. Dentre estas técnicas pode-se destacar: o Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, com a utilização do reagente Picogreen, o qual detecta pequenas quantidades de DNA em solução (DRAGAN et al., 2010); e a Taxa de produção de radicais livres que permite a detecção de EROs, baseado na oxidação da sonda não fluorescente dihidroclorofluoresceína (DCFH) para formar um produto altamente fluorescente, a 2,7'- diclorofluoresceína (DCF) (CHEN et al., 2010).

No ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA o grupo de escolares expostos também apresentou média mais elevada que o GC, esta diferença foi altamente significativa ($p < 0,001$). São escassos na literatura, estudos que utilizam o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA como biomarcador de exposição a pesticidas. Porém, é uma técnica que desempenha um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, como técnicas de biologia molecular e de diagnóstico (DRAGAN et al., 2010); como biomarcador para doenças severas como a Dengue Hemorrágica (HA et al., 2011). Contudo, nesta pesquisa esta técnica mostrou-se ser eficaz e altamente sensível para analisar o efeito genotóxico das substâncias tóxicas estudadas, sobre a população exposta. Estes resultados vão ao encontro dos achados de Parra, Sánchez-Fortún e Castanõ (2010) que, apesar das análises terem sido realizadas em diferentes tipos de células (linfócitos e células teciduais), concluíram que esta metodologia foi capaz de colocar em evidência o grau de danos ao DNA induzidos por agrotóxicos, e, portanto, pode ser utilizada para prever a genotoxicidade de pesticidas, neste tipo de células.

A taxa de produção de radicais livres (DCFH-DA) também não é uma técnica muito empregada nos estudos de biomonitoramento humano. No presente estudo esta técnica mostrou-se altamente sensível para detecção EROs e um bom biomarcador na população estudada. Os resultados desta pesquisa mostram que, na comparação da taxa de produção de radicais livres, a média do GE apresentou-se significativamente ($p < 0,01$) mais elevada que a média do GC.

Ao correlacionar os achados das avaliações audiológicas e os biomarcadores do metabolismo oxidativo, verificou-se associação entre a amplitude das EOAPD e os índices dos biomarcadores do metabolismo oxidativo. Entretanto, esta associação não foi observada entre ocorrência do efeito de supressão das EOAPD e os resultados dos biomarcadores do metabolismo oxidativo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa evidenciaram que:

- Os escolares de ambos os grupos apresentaram EOAPD e efeito de supressão presentes, evidenciando função coclear e retrococlear (SOCM) normais, respectivamente.

- O GE apresentou índices significativamente mais elevados em todos os testes de verificação do metabolismo oxidativo, em comparação ao GC, sendo verificada diferença significativa entre os grupos;

- Observou-se associação entre a amplitude das EOAPD (nível reduzido) e os resultados dos biomarcadores do metabolismo oxidativo (índices elevados);

- Não foi verificada associação entre ocorrência de supressão das EOAPD e os resultados dos biomarcadores do metabolismo oxidativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As avaliações audiológicas ainda não demonstraram alterações permanentes do sistema auditivo, evidenciado pela presença das EOAPD e do efeito de supressão. Porém, no grupo de escolares expostos já verificou-se uma diminuição na média da amplitude das EOAPD em todas as frequências em comparação com o grupo controle. Estes resultados indicam que a exposição aos agrotóxicos, assim como a nicotina, pode estar causando uma diminuição funcional coclear (CCE) precoce no grupo de escolares expostos.

- Referente aos biomarcadores do metabolismo oxidativo, em todos os testes foi observada diferença significativa entre os grupos. O nível mais elevado de EROs no GE, evidenciado pelo índice elevado na taxa de radicais livres (DCFH-DA), pode ser o motivo da presença elevada de células alteradas a nível nuclear, visualizadas através do teste de MN, bem como do índice superior de dano ao DNA pelo ensaio cometa, quando comparado ao GC.

- A média inferior da amplitude das EOAPD e os índices elevados dos biomarcadores do metabolismo oxidativo encontrados no GE, associam-se à exposição destes sujeitos aos agrotóxicos e a nicotina da folha do tabaco.

- Os resultados desta dissertação indicam que já existe a necessidade do biomonitoramento individual, bem como do monitoramento audiológico nesta população. A detecção precoce de uma exposição perigosa pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos a saúde, por isso, além de investigar a saúde dos escolares expostos, é necessário investir na educação e implantar medidas de prevenção e controle da exposição.

- Sugere-se que novas pesquisas, com um número maior de sujeitos, sejam realizadas nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, S.J.; COSTA, J.; EMANUEL, J.R. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research.*, v. 24, n. 13, p. 2623–2625. 1996.

AMORIN, L. L. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação dos agentes químicos ambientais. *Rev. Brasileira de Epidemiologia.*, v. 6, n.11, p. 1-13, 2003.

ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ – Health.*, v. 210, n. 3-4, p. 201-28, 2007. In: Da Silva FR. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética**. 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ARAÚJO, A. J. et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos a saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. *Ciência & Saúde Coletiva.*, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.

ARBOLEDA-MORENO, Y. et al. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Rev Panam Salud Publica.*, v.15, n.6, p.367-72, 2004.

ARCURY, T. A. et al. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res.*, v. 5, p. 315-21, 2003.

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

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova.*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006 .

BENÍTEZ-LEITE, S. et al. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr . (Asunción)*, v. 37, n. 2, p.97-106, 2010.

BERNARDI, A. P. A. **Trabalhadores expostos simultaneamente a ruído e tolueno: estudo das emissões otoacústicas evocadas e efeito de supressão.** 2000. 141 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. São Paulo, 2000.

BIESALKI, H. K. Free radicals theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.**, v. 5, p. 5-10, 2002.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutat Res.**, v. 29, p. 37-80, 2003.

BORTOLI, G. M.; AZEVEDO, M. B.; SILVA, L. B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. **Mutat Res.**, v. 675, n. 1-2, p. 1-4, 2009.

CAVALCANTI, B. C. et al. Citotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. **Comp Biochem Physiol A.**, v. 147, n. 4, p. 409-15, 2008.;

CHEN, X. et al. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. **Free Radical Research.**, v. 44, n. 6, p. 587-604, 2010.

COCCHIORELLA, L. A.; SHARP, D. S.; PERSKY, V. W. Hearing threshold shifts white-cell count and smoking status in working men. **Occup. Med.**, v. 45, n. 4, p. 179-85, 1995. In: OLIVEIRA, D. C. C. M.; LIMA, M. A. M. T. Da audiometria tonal liminar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. **Braz. J. Otorhinolaryngol.** v. 75, n. 5, p. 738-44. 2009.

COELHO, M. S. B. et al. As emissões otoacústicas no diagnóstico diferencial das perdas auditivas induzidas por ruído. **Rev. CEFAC.** v. 12, n. 6, p. 1050-1058, 2010.

COLLET, L. et al. Effects of contralateral white noise on click evoked emissions in normal and sensorineural ears: towards an exploration of the olivocochlear system. **Audiology.**, v. 31, p 1-7, 1992.

COLLINS, A. R.; MA, A. G.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research (DNA Repair).**, v. 336, p. 69-77, 1995.

CRAWFORD, J.M. et al. Hearing Loss Among Licensed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **J Occup Environ Med.**, v. 5, p. 817-26, 2008.

DA COSTA KREWER, C. et al. Habitual Intake of Guaraná and Metabolic Morbidities: An Epidemiological Study of an Elderly Amazonian Population. **Phytother Res.**, v. 22., 2011.

DA SILVA, F. R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética.** 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

DA SILVA, F. R. et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure of early biological effects and of susceptibility. **Journal of Hazardous Materials.**, v. 225–226, p. 81-90, 2012.

DRAGAN, A. I. et al. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. **Biophysical Journal.**, v. 99, p. 3010–3019, 2010.

DRAGAN, A.I.; BISHOP, E.S.; GEDDES, C.D.; Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification. **Anal Biochem.**, v. 396, n. 1, p. 8–12, 2010.

DURANTE, A. Características das emissões otoacústicas por transientes em programa de triagem auditiva neonatal. **Pró-Fono Revista de Atualização Científica.** v. 17, n. 2, p. 133-140, 2005.

DURANTE, A.S. Emissões otoacústicas. In: BEVILACQUA, M.C. et al. (Org). **Tratado de Audiologia.** São Paulo: Santos, 2011. cap. 10, pp. 145-158.

FINDLAY, V. J; TAPIERO, H.; TOLUNSEND, D. M. Sulfiridoxin: a potential therapeutic agent? **Biomedicine e Pharmacotherapy.**, v. 59, p. 374-79, 2005.

FINKLER, A.D. et al. Otoprotection in guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 78, n. 3, p. 122-8, 2012.

FRONZA, A. B. et al . Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. **Braz. j. otorhinolaryngol. (Impr.)**, v. 77, n. 1, p. 107-14, 2011.

FROTA, S.; IORIO, M.C.M. Emissões otoacústicas por produto de distorção e audiometria tonal liminar: estudo da mudança temporária do limiar. **Rev Bras Otorrinolaringol.**, v. 68, n. 1, p. 15-20, 2002.

GARCIA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat Res.**, v. 556, p. 25-34, 2004.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **J Biochem Biophys Methods.** v. 65, n. 2-3, p.45-80, 2005.

GROVER, P. et al. In vivo assessment of genotoxic effects of Annona squamosa and seed extract in rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, n. 8, p. 1964-71, 2009. In: DA SILVA, F.R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética.** Porto Alegre, 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

HA, T.T.N. et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. **PLoS ONE.**, v. 6, n. 10, 2011.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231-244, 2004.

HARKRIDER, A. W.; CHAMPLIN, C. A.; MCFADDEN, D. Acute effect of nicotine on non-smokers: OAEs and ABRs. **Hear Res.**, v. 160, p. 73-88, 2001.

HOSHINO, A. C. H. et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev Bras Otorrinolaringol.**, v. 74, n. 6, p. 912-918, 2008.

HOSHINO, A.C.H. et al. A auto-percepção da saúde auditiva e vestibular de trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev CEFAC.**, v. 11, n. 4, p. 681-687, 2009.

HUANG, T. et al. Oxidative stress-induced apoptosis of cochlear sensory cells: otoprotective strategies. **Int J Dev Neurosci.**, v. 18, p. 259-70. 2000.

HWANG, E.S.; KIMB, G.H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology.**, v. 229, p. 1–10, 2007.

IKEDA, Y.; IWAKIRI, S.; YOSHIMORI, T. Development and characterization of a novel host cell DNA assay using ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain "PicoGreen". **J Pharm Biomed. Anal.**, v. 49, n. 4, p. 997-1002, 2009.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch. Otolaryng.**, v. 92, p. 311-324, 1970.

JUFFO, D. D. et al. Avaliação do dano causado ao DNA de trabalhadores da lavoura de fumo do município de Venâncio Aires – RS. In: V JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA- MEIO AMBIENTE-FZB-RS e FEPAM, 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: V Jornada de Iniciação Científica-Meio Ambiente-FZB-RS e FEPAM: 2009.

KEMP, D. T. Stimulated acoustic emissions from within the human auditory system. **J Acoust Soc Am.**, v.64, p.1386-91,1978.

KEMP, D.T. Development in cochlear mechanics and techniques for noninvasive evaluation. **Advanced Audiology.**, p.27-45. 1998.

KLEINASSER, N.H. The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. **Toxicol Sci.**, v. 86, n. 2, p. 309-17, 2005. In: DA SILVA, F. R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética.** 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

KOHATSU, A. G. S.; SHIMABUKURO, F.; GATTÁS, G.J.F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. **Saúde, Ética e Justiça.**, v. 12, n. 1, p. 15-21, 2007.

KÖRBES, D. et al. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 76, n. 2, p. 238-44, 2010.

KUMAR, L. P.; PANNEERSELVAM, N. Toxic Effects Of Pesticides: A Review On Cytogenetic Biomonitoring Studies. **Facta Universitatis Series: Medicine and Biology.**, v. 15, n.2, p. 46-50, 2008.

LLOYD, L.L.; KAPLAN, H. **Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry.** Baltimore: University Park Press, 1978.

LUZ, N. B.; SANTOS, H. P.; MELO, G. W. Avaliação da Resposta Espectral de Folhas de Aveia Preta (*Avena Strigosa*) Cultivadas em Diferentes Solos da Serra Gaúcha, com Adição de Cobre e Matéria Orgânica. In: ANAIS DO SBSR, 11, 2003, Belo Horizontes. **Anais...** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2003. p. 2343-2349.

MANJABOSCO, C.A.W.; MORATA, T.C.; MARQUES, S.J.M. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. **Arq Int Otorrinolaringol.**, v. 8, n. 4, p. 284-95, 2004.

MARTÍNEZ-VALENZUELA, C. et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. **Environment International.**, v. 35, p. 1155–1159, 2009.

MCKENNA, D.J.; MCKEOWN, S.R.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis.** v. 23, n.3, p. 183-90, 2008.

MUNIZ J. F. et al. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 227, p. 97-107, 2008. In: DA SILVA, F. R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética.** 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MUÑIZ, J. F.; VENTURA, A. M.; ALGARRA, J. M. Estudio de la correlación existente entre el efecto supresor contralateral y la fatiga auditiva mediante otoemisiones acústicas transitorias. **Acta Otorrinolaringol Esp.**, v. 57, p.199-203, 2006.

NERI, M. et al. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. **Mutat Res.**, v. 612, n. 1, p. 1-13, 2006.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al . Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos. **Rev Saúde Pública.**, v. 35, n. 2, 2001.

PARRA, J.M.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S.; CASTANÕ, A. Assessment of Genotoxic Effects Induced by Selected Pesticides on RTG-2 Fish Cells by Means of a Modified Fast Micromethod Assay. **Environmental Toxicology.**, v. 27, n. 4, p. 238-243, 2010.

PASCHOAL, C.P.; AZEVEDO, M.F. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 6, p. 893-902, 2009.

PASTOR, S. et al. Biomonitoring of four european populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis.**, v. 18, p. 249–58, 2003.

PERRY, M. J. Children's agricultural health traumatic injuries and hazardous inorganic exposures. **Rural health practice applications.**, v. 19, n. 3, p. 269-278. 2003.

QUANT-IT™ PICOGREEN® DSDNA REAGENT AND KITS. Molecular Probes Invitrogen detection technologies. 2008.

QUEVEDO, L.S.; TOCHETTO, T.M; SIQUEIRA, M. A. Condição coclear e do sistema olivococlear medial de frentistas de postos de gasolina expostos a solventes orgânicos. **Arquivos Int. Otorrinolaringol.**, v. 16, n. 1, p. 50-56, 2012.

ROTA, C.; CHIGNELL, C. F.; MASON, R. P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radic Biol Med.**, v. 27, n.7-8, p. 873–881, 1999.

SAILAJA, N. et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. **Mutat Res.**, v. 609, n. 1, p. 74-80, 2006.

SARCINELLI, P. N. A exposição de crianças e adolescentes a agrotóxicos. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. (Ed). **É veneno ou é remédio? Agrotóxico, saúde e ambiente.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2003, pp.43-58. Disponível em PDF: <<http://www.fiocruz.br/editora/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=175&sid=5>>

SILVEIRA, J.A.M. et al. Avaliação da alteração auditiva provocada pelo uso do walkman, por meio da audiometria tonal e das emissões otoacústicas (produto de distorção) estudo de 40 orelhas. **Rev Bras Otorrinolaringol.** v. 67, n. 5, p. 650-4, 2001.

SILVEIRA, L. R.; Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq Bras Endocrinol Metab [online].**, v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.

SINDITABACO Sindicato da Indústria do Tabaco da Região Sul do Brasil. Estatísticas e Infográficos. Santa Cruz do Sul, 2011. Disponível em: <<http://sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/estatisticas-e-infograficos/>>. Acesso em: Set. 2012.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOBKOWIAK, R.; LESICKI, A. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. **Drug Chem Toxicol.**, v. 32, n. 3, p. 252-57, 2009. In: DA SILVA, F.R. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética. Porto Alegre, 2011, 171 f, Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SOUSA, L. C. A. et al. **Emissões Otoacústicas (EOA)**. In:____. Eletrofisiologia da audição e Emissões Otoacústicas: Princípios e aplicações Clínicas. São Paulo: Tecmedd, 2008. p.109-131.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidante e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova.**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VOSS, P.; SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research.**, v. 40; p. 1339-1349, 2006.

WAGNER, W. et al. Test-retest repeatability of distortion product otoacoustic emissions. **Ear Hear.**, v. 29, n. 3, p. 378-91, 2008.

WARR, W. B.; GUINAN, J. J. Efferent innervation of the organ of Corti, two separate systems. **Brain Res.**, v. 173, n. 1, p. 152-155, 1979.

WETSCHER, G. J. et al. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med.*, v. 18, p. 877-882, 1995. In: DA SILVA, F. R. **Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética**. 2011, 171 f. Tese. (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

APÊNCICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Ministério da Educação
Universidade Federal de Santa Maria/RS
Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana

Pesquisadores responsáveis: Professor Doutor Aron Ferreira da Silveira

Aluna: Fonoaudióloga Letícia Regina Kunst CREFONO7 9513 RS/P

Telefone: (55) 91819526 / (55) 3307-6409

E-mail : leticiakunst@yahoo.com.br

O seu filho (a) está sendo convidado a participar da pesquisa “**Audição e biomarcadores do metabolismo oxidativo em escolares de região fumicultora do Rio Grande do Sul**”, que tem por objetivo avaliar a audição e o metabolismo oxidativo (saúde geral) de escolares de sete a 14 anos da região central fumicultora do RS.

Para realização deste estudo contamos com a sua colaboração, permitindo que seu filho se submeta a algumas avaliações.

Primeiramente será realizada uma entrevista sobre a saúde geral e auditiva, aspectos escolares de seu filho e socioambientais.

Em seguida serão executados os testes para avaliar a audição da criança. A avaliação da audição é composta por cinco testes. No primeiro, o participante ouvirá alguns sons (“apitos”) através de fones de ouvido, e deverá levantar a mão toda vez que ouvir o apito.

Para outros três exames será colocada uma rolha de borracha na entrada de uma orelha e um fone de ouvido na outra orelha. Nestas avaliações o participante também ouvirá alguns sons. Em todos os exames o participante não precisará responder nada, os aparelhos darão as respostas.

Na última avaliação serão colocados adesivos metálicos na testa e na orelha do participante, que irão captar a resposta auditiva. O participante deverá apenas contar o número de apitos, quando a pesquisadora solicitar.

Além dessas avaliações, serão feitos exames de sangue e de saliva para ver a saúde geral das crianças. Os exames serão para verificar o nível de colesterol, glicose e outros testes. Um farmacêutico e/ou biomédico capacitado coletará, do braço da criança, uma amostra de sangue. Os lacres da seringa e agulha serão retirados na frente do paciente e em seguida o sangue será coletado. Também será feita uma raspagem na bochecha da criança com uma escova adequada para a coleta.

Benefícios: os indivíduos que participarem desta pesquisa serão beneficiados, pois receberão avaliação audiológica gratuita e, se apresentarem algum problema de audição, receberão as devidas orientações e encaminhamentos. Ainda estarão fazendo uma checagem geral da saúde. Além disso, a participação da criança poderá ajudar muitas pessoas no futuro que se beneficiarão direta ou indiretamente com os resultados deste estudo. E, no final do estudo, toda família poderá participar de palestras e receber material informativo sobre a importância do uso de equipamentos de proteção individual.

Potenciais de riscos e possíveis desconfortos: A colocação da rolha de borracha na entrada da orelha poderá causar sensação de leve pressão e causar um leve desconforto. A criança pode sentir um pouco de cansaço durante as avaliações audiológicas, porém

sempre será respeitada a tolerância dela quanto à disposição em realizar os exames. Um leve incômodo poderá ser referido quando for feita a coleta da saliva, pela raspagem da bochecha, mas sem risco de dor. Na coleta de sangue sentirá uma leve “picadinha” no braço, podendo doer um pouco e a pele ficar arroxeadada no local da coleta, o que melhora em pouco tempo.

Considero-me igualmente informado:

- ✓ Há liberdade de deixar de participar do estudo e de solicitar explicações sobre a pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo ou custo para a criança e familiares;
- ✓ Os dados de identificação serão sigilosos e as crianças não terão seus nomes expostos/divulgados em nenhum momento;
- ✓ Avaliações realizadas serão usadas para obter informações relacionadas à pesquisa e, após, serão arquivadas pelos pesquisadores para posteriores trabalhos nas áreas de fonoaudiologia, saúde pública e áreas afins; utilizadas única e exclusivamente para fins de pesquisa, publicações em revistas e eventos científicos
- ✓ De que não terei gastos nesta pesquisa e não receberei pagamento para participação nesta pesquisa.

Observação: O presente documento é baseado nas Diretrizes e Normas Regulamentadoras para a Pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), sendo assinado em duas vias iguais, ficando uma via para o participante e a outra para a pesquisadora responsável.

Mediante os esclarecimentos recebidos dos pesquisadores, eu _____ portador do documento de identidade número _____, responsável por _____, concordo com participação do mesmo (a) na pesquisa acima referida. Afirmando que estou ciente de que os dados deste estudo serão divulgados em meio científico, sem a identificação dos participantes.

Data: ___/___/___

Assinatura do responsável

Assinatura da pesquisadora

Eu _____ concordo em participar desta pesquisa.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:
Comitê de Ética em Pesquisa – CEO- UFSM
Av. Roraima, 10 000, Prédio da Reitoria – 7º andar – Campus Universitário – 97105-900 – Santa Maria/RS Tel: (55) 3220-9362

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Institucional



Termo de Consentimento Institucional
 Universidade Federal de Santa Maria/RS
 Centro de Ciências da Saúde



Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana

TERMO DE CONSENTIMENTO INSTITUCIONAL

Esta pesquisa intitulada ***Audição e biomarcadores do metabolismo oxidativo em escolares de região fumicultora do Rio Grande do Sul***, está sendo realizada pela fonoaudióloga Letícia Regina Kunst, CREFONO7 9513 RS/P, sob orientação do professor Dr. Aron Ferreira da Silveira, e tem como objetivo avaliar o sistema auditivo e o metabolismo oxidativo de escolares de sete a 14 anos da região central fumicultora do RS. Esta pesquisa foi analisada e aprovada pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria/RS em 31 de outubro de 2011, sob o número: 0237.0.243.000-11.

Na escola será realizada uma triagem, através de um breve questionário, para identificar as crianças que se enquadram nos critérios de inclusão do estudo. Àquelas que se enquadrarem nos critérios serão entregues convites aos pais, para participação dos filhos no estudo, nos quais constarão explicações sucintas sobre a pesquisa. Em um segundo momento, os pais e/ou responsáveis que manifestarem interesse serão convidados para uma reunião, na qual a pesquisadora irá expor com mais detalhes a metodologia da pesquisa e seus benefícios, então serão agendadas as avaliações.

Para as crianças que participarem da pesquisa, será entregue aos pais/responsáveis um termo de consentimento livre e esclarecido fornecido pela pesquisadora. Nesse termo constarão informações detalhadas sobre os procedimentos da pesquisa, riscos e benefícios, além da garantia do sigilo sobre os dados coletados e da liberdade de desistência da participação a qualquer momento. Ressalta-se que a participação da criança dependerá da assinatura desse documento, além do assentimento da própria criança em participar do estudo.

As crianças que os pais/responsáveis consentirem a participação passarão por diversas avaliações.

Serão realizados testes para avaliar a audição da criança. As avaliações realizadas serão as seguintes: inspeção visual do meato acústico externo, audiometria tonal liminar, imitanciometria, emissões otoacústicas evocadas produto de distorção com e sem ruído contralateral. Além das avaliações audiológicas, serão feitos exames laboratoriais para análise do metabolismo da criança. Para esses testes será coletada uma amostra de sangue e de saliva.

As avaliações da audição bem como a coleta do material biológico serão realizadas no Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST) de Santa Maria/RS. Estes procedimentos não causarão danos ou risco à saúde da criança. Todas as avaliações serão realizadas por profissionais especializados.

A participação da instituição será assegurada, e todos os dados obtidos serão mantidos em sigilo. Esses serão analisados estatisticamente, com posterior publicação dos resultados. A participação de seu aluno nesta pesquisa poderá ser suspensa a qualquer momento, sem prejuízo ou custo para a criança ou para a instituição.

A pesquisadora estará disponível para qualquer dúvida, nos telefones (55) 91819526 ou (55) 3307-6409 ou por e-mail leticiakunst@yahoo.com.br.

Eu, _____ responsável legal pela instituição _____ autorizo a participação das crianças na presente pesquisa. Estou ciente da finalidade deste estudo, e por isso dou consentimento à pesquisa, contribuindo, assim, para melhor qualidade de vidas das crianças.

Assinatura do responsável pela instituição

Assinatura da pesquisadora

Santa Maria, ___/___/___

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:
Comitê de Ética em Pesquisa – CEO- UFSM
Av. Roraima, 10 000, Prédio da Reitoria – 7º andar – Campus Universitário – 97105-900 – Santa Maria/RS
Tel: (55) 3220-9362