

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

**A INFLUÊNCIA DO ORGANOFOSFORADO
CLORPIRIFÓS NO SISTEMA VESTIBULAR DE
COBAIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lícia Assunção Cogo

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**A INFLUÊNCIA DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS NO SISTEMA
VESTIBULAR DE COBAIAS**

por

Lícia Assunção Cogo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição e Equilíbrio, 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. Dr. Aron Ferreira da Silveira (UFSM)
Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito (USP- Ribeirão Preto)

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).

Assunção Cogo, Lícia

A INFLUÊNCIA DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS NO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS / Lícia Assunção Cogo.-2013.

71 p.; 30cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira

Coorientador: Miguel Ângelo Hyppolito

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

1. Equilíbrio Postural 2. Sistema Vestibular 3. Inseticida Organofosforado 4. Praguicida 5. Toxicidade
I. Ferreira da Silveira, Aron II. Ângelo Hyppolito, Miguel III. Título.

© 2013

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

Endereço: Av. Monsenhor Pascoal Gomes Libreloto, n. 199, Bairro Parque Dom Antônio Reis, Santa Maria, RS, 97065-290

Fone (55) 32119183; Cel (055) 99484920

End. Eletr: liciacogo@hotmail.com

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

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

**A INFLUÊNCIA DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS NO
SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS**

elaborada por

Lícia Assunção Cogo

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

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Maristela Julio Costa (UFSM)
(Presidente)

Prof. Dra. Valdete Alves Valentis dos Santos Filha (UFSM)

Prof. Dra. Pricila Sleifer (UFRGS)

Santa Maria, 01 de março de 2013.

*Dedico este trabalho á minha família,
que sempre me apoiou
para que eu realizasse os meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Cláudio e Mara pela oportunidade de continuar me aperfeiçoando, apoio, amor e dedicação de sempre.

Ao meu irmão João Vitor pela paciência.

Ao meu namorado Guilherme e sua família pelo apoio e por estar sempre ao meu lado nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Aron, pelos ensinamentos e pelo incentivo de sempre continuar buscando aprimoramento.

Ao co-orientador, Prof. Miguel, pela acolhida em Ribeirão Preto e a oportunidade de realizar a coleta de dados em um centro de excelência em pesquisa.

Aos técnicos que me auxiliaram na coleta, Maria, Adriana, Dani, Chico.

Às equipes do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela colaboração nesta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria.

Às minhas colegas de pós-graduação Carolina Veloso, Letícia Kunst, Samantha Marques, Maiara Gonçalves, Enma Ortiz e Dayane Didonet pelo apoio e acolhida na área da audição e equilíbrio.

Aos alunos que por mim passaram nas disciplinas de docência.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana pela acolhida.

*“A gente sempre deve sair à rua como quem foge de casa,
Como se estivessem abertos diante de nós todos os caminhos do mundo.
Não importa que os compromissos, as obrigações estejam ali...
Chegamos de longe, de alma aberta e coração cantando!”*

RESUMO

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

A INFLUÊNCIA DO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS NO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS

AUTORA: LÍCIA ASSUNÇÃO COGO
ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
CO-ORIENTADOR: MIGUEL ÂNGELO HYPPOLITO

Algumas substâncias químicas têm causado muitos danos ao ser humano e ao meio ambiente. Dentre estas substâncias encontram-se os compostos químicos do tipo agrotóxicos, frequentemente considerados como responsáveis por intoxicações a trabalhadores, tornando isto um problema de saúde pública. O objetivo geral deste estudo consistiu em verificar se o organofosforado clorpirifós teve influência no sistema vestibular de cobaias em exposição aguda. Tratou-se de uma pesquisa experimental. A pesquisa utilizou 18 cobaias albinas da espécie *Cavia porcellus*, divididas em três grupos; sendo o grupo I o controle dos demais, utilizando água destilada e contendo cinco animais. No grupo II, com seis animais, foi administrada a dose de 0,5mg/kg/dia de agrotóxico clorpirifós e no grupo III, com sete animais a dose de 1mg/kg/dia do mesmo agrotóxico. Os três grupos estiveram sob experimento durante 10 dias. Para análise dos resultados foi realizada a análise funcional do sistema vestibular através da eletronistagmografia (prova calórica – com água gelada) e a análise histopatológica através da microscopia eletrônica de varredura. Os resultados não demonstraram diferença estatística significativa para as variáveis frequência de aparecimento de nistagmo e velocidade angular da componente lenta na eletronistagmografia; e no número de tufo ciliares na análise histopatológica por microscopia eletrônica de varredura. Concluiu-se que o organofosforado clorpirifós não ocasionou dano ao sistema vestibular das cobaias nas doses testadas em exposição aguda.

Palavras-chave: Equilíbrio Postural. Sistema Vestibular. Inseticida Organofosforado. Praguicida. Toxicidade.

ABSTRACT

Master's Thesis
Post Graduation Program in Human Communication Disturbance
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

THE INFLUENCE OF ORGANOPHOSPHATE CHLORPYRIFOS VESTIBULAR SYSTEM OF GUINEA PIGS

AUTHOR: LÍCIA ASSUNÇÃO COGO
ADVISOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
CO-ADVISOR: MIGUEL ANGELO HYPPOLITO

Some chemicals have caused much damage to humans and the environment. Among these substances are chemical compounds like pesticides, often considered responsible for poisoning the workers, making it a public health problem. The aim of this study was to verify whether the organophosphate chlorpyrifos was influential in the vestibular system of guinea pigs in acute exposure. This was an experimental research. The research used 18 albino guinea pigs of the species *Cavia porcellus*, divided into three groups, with group I control the other, using distilled water and containing five animals. In Group II, six animals were administered 0.5 mg / kg / day of pesticide chlorpyrifos and group III, with seven animals at a dose of 1mg/kg/day of the same pesticide. The three groups were under experiment for 10 days. For analysis of the results was performed functional analysis of the vestibular system by electronystagmography (caloric test - with ice water) and histopathological analysis by scanning electron microscopy. The results showed no statistically significant difference for the variable frequency of appearance of nystagmus and angular velocity of the slow component in electronystagmography, and the number of ciliary tufts histologically by scanning electron microscopy. It was concluded that the organophosphate chlorpyrifos did not cause damage to the vestibular system of the guinea pigs at the doses tested in acute exposure.

Key-words: Postural Balance. Vestibular System. Insecticide Organophosphate. Pesticides. Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 – Fotografia dos equipamentos e registro da Eletronistagmografia.....	37
Figura 2 – Fotografia do registro dos nistagmos de cobaia do grupo controle.....	37

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Comparação dos valores médios das frequências do aparecimento de nistagmos (u/s) entre o pré e pós- experimento nos Grupos I, II, III..... 39

Tabela 2 - Comparação dos valores médios das velocidades angulares da componente lenta (°/s) de nistagmos (u/s) entre o pré e pós- experimento nos Grupos I, II, III..... 39

ARTIGO 2

Tabela 1 – Comparação dos valores médios do número de tufo ciliares do sáculo e utrículo entre os Grupos I, II, III..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ache	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias
ENG	Eletronistagmografia
et al.	E colaboradores
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Ltda	Limitada
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OD	Orelha Direita
OE	Orelha Esquerda
OF	Organofosforado
PVC	Policloreto de Vinila
RVE	Reflexo vestibulo-espinhal
RVO	Reflexo vestibulo-ocular
S/A	Sociedade Anônima
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas
SNC	Sistema Nervoso Central
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
USP	Universidade de São Paulo
VACL	Velocidade Angular da Componente Lenta
VENG	Vectoeletronistagmografia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
CO₂	Dióxido de Carbono
DL 50	Dose Letal 50
Fn	Frequência de nistagmos
g	Gramma
Kg	Kilogramma
M	Molar
mg	Miligramma
ml	Mililitros
®	Marca Registrada
%	Por cento
pH	Potencial de Hidrogênio
u/s	Unidade por segundo
°/s	Graus por segundo
°	Grau
+	Positivo
-	Negativo

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Comprovante de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	66
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Sistema vestibular e equilíbrio.....	19
2.2 Agrotóxicos organofosforados.....	22
2.3 Eletronistagmografia.....	24
3 ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS INTOXICADAS POR ORGANOFOSFORADO POR MEIO DA PROVA CALÓRICA.....	27
Resumo.....	29
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Materiais e métodos.....	33
Resultados.....	37
Discussão.....	39
Conclusão.....	41
Referências bibliográficas.....	42
4 ARTIGO 2 – ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS INTOXICADAS POR ORGANOFOSFORADO.....	46
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	50
Materiais e métodos.....	51
Resultados.....	54
Discussão.....	55
Conclusão.....	57
Referências bibliográficas.....	57
5 DISCUSSÃO GERAL.....	60
6 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
ANEXOS.....	70

**Anexo A – Comprovante de aprovação da Comissão de Ética em
Experimentação Animal..... 71**

1 INTRODUÇÃO

Existem substâncias químicas que causam danos aos seres humanos e ao meio ambiente. A degradação do meio ambiente e o impacto na saúde humana têm se dado devido ao contato excessivo, de forma aguda ou gradativa, com tais substâncias (HOSHINO et al., 2008).

Dentre estas substâncias encontram-se os compostos químicos do tipo agrotóxicos. Alguns, por suas propriedades neurotóxicas, são frequentemente considerados como responsáveis por intoxicações à trabalhadores que entram em contato com estes compostos, principalmente nos países em desenvolvimento (TEIXEIRA,AUGUSTO, MORATA, 2003; HOSHINO et al., 2008).

De acordo com Silva et al. (2005) os agrotóxicos representam um dos mais importantes fatores de risco para a saúde humana. Estes produtos são utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário.

No Brasil, foram registrados 101.086 casos de intoxicação humana em 2009. Dentre estes as intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola totalizaram 5.253 casos, 1.058 só no Sul do país, região de forte produção agrícola (Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas – SINITOX, 2009).

O difícil acesso às informações e à educação por parte dos usuários desses produtos, bem como o baixo controle sobre sua produção, distribuição e utilização são alguns dos principais determinantes na constituição dessa situação como um desafio de saúde pública.

No ano de 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de venenos agrícolas, superando os 700 milhões de toneladas; ultrapassando os Estados Unidos (646 milhões de toneladas). Nesse ano as vendas com agrotóxicos no Brasil significaram 7,125 bilhões de dólares. Deste montante, os inseticidas representaram 29% do consumo (GUAZZELLI, 2009).

No grupo dos inseticidas, encontramos os agrotóxicos organofosforados (OF), amplamente utilizados. Os OF são compostos anticolinesterásicos que causam variado grau de toxicidade para o ser humano. Em razão do benefício do agrotóxico para o sucesso do plantio, o trabalhador tem a tendência de subestimar seus efeitos na saúde para quem entra em contato com o produto (KÖRBES, 2009).

Diversas vezes, essa exposição causa alterações clínicas que não são detectadas pelos marcadores biológicos e que, silenciosamente, alteram a vida do trabalhador. Sabe-se que a exposição em grandes doses por um curto período causa os chamados efeitos agudos. Este quadro agudo varia de intensidade, podendo ser caracterizado por náusea, vômito, cefaleia, tontura, desorientação, hiperexcitabilidade, parestesias, irritação de pele e mucosas, fasciculação muscular, dificuldade respiratória, hemorragia, convulsões, coma e morte (SILVA et al., 2005; HOSHINO et al., 2008).

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

O sistema vestibular é responsável por informar sobre a posição e o movimento da cabeça, provendo-nos do sentido de equilíbrio, auxiliando na coordenação dos movimentos da cabeça e dos olhos, e nos ajustes da postura corporal. Quando sua função é perturbada, surgem sensações desagradáveis como vertigem, náusea e uma sensação de desequilíbrio acompanhada de movimentos incontroláveis dos olhos (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2002; AFIFI e BERGMAN, 2008).

Faz-se importante ressaltar que a população exposta ao agrotóxico não se limita somente ao trabalhador, mas também a sua família, que convive próxima a plantação. Este fato evidencia a necessidade de pesquisas que aprofundem metodologias para avaliação da exposição aos agentes tóxicos e os riscos associados a estes produtos, tanto nos casos de intoxicação aguda como na exposição em longo prazo ao agrotóxico (KÖRBES, 2009).

Um aspecto relevante no trabalho rural brasileiro é a participação de crianças e adolescentes nas atividades de trabalho agropecuário, principalmente na faixa etária abaixo de 14 anos. Essa faixa da população é especialmente afetada, tanto pelos aspectos técnicos dos processos de trabalho (exposição aos agrotóxicos, às radiações solares, ao ruído, à vibração etc.), como também aqueles ligados à organização do trabalho (jornada, ritmo, conteúdo das tarefas etc.). Além disso, é preciso considerar o comprometimento do processo de socialização infantil e da escolarização (SILVA et al., 2005).

No que diz respeito às crianças, uma variável importante a ser considerada são os distúrbios de aprendizagem que podem estar relacionados aos distúrbios do sistema áudio-vestibular. Zeiglboim e colaboradores (2006) avaliaram crianças com distúrbios de aprendizagem e distúrbios vestibulares; e sugeriam existir relação entre estas duas condições. Este fato reforça a relevância de pesquisas com substâncias que causam sintomas áudio-vestibulares, já que no Brasil o trabalho infantil ainda está fortemente relacionado à agricultura familiar.

Körbes et al. (2010) afirma ser necessário outras pesquisas para que se possa melhor entender a associação entre a exposição a agrotóxicos e a ocorrência de alterações em vias auditivas e vestibulares. Moraes (1999) ressalta a importância das pesquisas para que se possam sensibilizar as autoridades de saúde, com relação aos riscos causados por estes produtos. Silva et al. (2005) também fomenta a importância de pesquisar os efeitos agudos relacionados aos piretróides, fungicidas e herbicidas.

O agrotóxico pode trazer prejuízos não só ao agricultor, que aplica o produto, mas a população vizinha em torno à lavoura e às pessoas, que mantêm um contato direto com ele, ou com seus pertences contaminados, tornando assim a intoxicação por agrotóxico um tema mais abrangente, que envolve uma questão de saúde pública. Os estudos sugerem a relação entre a intoxicação por agrotóxico e sintomas vestibulares, porém não esclarecem onde ocorre o dano.

Diante do exposto, justifica-se a realização de pesquisas que venham a esclarecer a relação entre os distúrbios ocasionados no sistema vestibular e a intoxicação por agrotóxicos, principalmente os organofosforados.

Focando o tema como uma questão de saúde pública, cabe a atuação de uma equipe multiprofissional para assistir o sujeito intoxicado, ou que mantêm contato com o agrotóxico. Dentro da equipe encontra-se, dentre outros profissionais, o profissional de fisioterapia, trabalhando desde a prevenção dos problemas de saúde, a utilização dos equipamentos de proteção individual, bem como a reabilitação deste indivíduo pós-intoxicação, caso necessário.

O objetivo do presente estudo foi identificar se o organofosforado clorpirifós tem influência no sistema vestibular de cobaias em exposição aguda, analisando sua ação de forma funcional e morfológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema vestibular e equilíbrio

A orelha compreende três compartimentos: orelha externa, média e interna. Na porção petrosa do osso temporal, aloja-se a orelha interna, formada por espaços denominados vestíbulo (sáculo e utrículo) e canais semicirculares, também denominados aparelho vestibular (ENDERLE, 2004).

O sistema vestibular nos seres humanos é composto por três componentes fundamentais: um sistema sensorial periférico, um processador central e um mecanismo de resposta motora. O sistema periférico é constituído de um conjunto de sensores do movimento, os quais enviam informações ao sistema nervoso central (SNC), especificamente ao complexo nuclear vestibular e ao cerebelo, sobre a velocidade angular da cabeça, a aceleração linear e a orientação cefálica em relação ao eixo gravitacional (HERDMAN, 2002).

Este sistema detecta as sensações de equilíbrio. Contêm uma rede de tubos, ossos e câmaras chamado labirinto ósseo, e dentro dele, uma rede de tubos membranosos chamado labirinto membranoso, a parte funcional do sistema vestibular (GUYTON, 1992).

O labirinto membranoso é uma estrutura complexa localizada no interior do labirinto ósseo. Esta estrutura consiste do ducto coclear, que é o órgão sensorial auditivo, bem como de três canais semicirculares, sáculo e utrículo, constituindo os órgãos sensoriais vestibulares. A maior parte do labirinto membranoso é preenchida com endolinfa, um fluido extracelular, que em sua constituição iônica é semelhante ao fluido intracelular. A perilinfa é um fluido semelhante ao fluido extracelular e ao líquido e preenche o espaço existente entre o labirinto membranoso e o labirinto ósseo (MARTIN, 1998).

As doenças que acometem o utrículo e o sáculo produzem uma sensação de inclinação e levitação (AFIFI e BERGMAN, 2008). Segundo Bear, Connors e Paradiso (2002) a mácula do sáculo está orientada verticalmente e a do utrículo horizontalmente.

As células receptoras vestibulares estão localizadas em regiões dos canais semicirculares (denominadas ampolas), no sáculo e no utrículo (denominadas

máculas), estas células são sensores biológicos, que convertem o deslocamento provocado pelo movimento cefálico em uma descarga neural (HERDMAN, 2002). Os receptores vestibulares (células sensoriais) são ativados pelo deslocamento dos estereocílios localizados nas suas superfícies apicais. Contudo, estas propriedades mecânicas do labirinto vestibular conferem aos receptores a sensação de movimento. As células ciliadas dos canais semicirculares registram o movimento angular da cabeça, ao passo que aquelas do utrículo e do sáculo registram o movimento linear (MARTIN, 1998).

O mecanismo que ativa os receptores vestibulares é diferente daquele dos receptores auditivos. As células ciliadas dos canais semicirculares são cobertas por uma massa gelatinosa (denominada cúpula), na qual os estereocílios estão embebidos. Movimentos angulares da cabeça induzem a endolinfa do interior dos canais a fluir, deslocando a massa gelatinosa, que por sua vez, desvia os estereocílios das células sensoriais. O utrículo e o sáculo também possuem um revestimento gelatinoso sobre as células sensoriais nas suas máculas. Cristais de carbonato de cálcio embebidos num material gelatinoso repousam sobre os estereocílios das células sensoriais. Esta gelatina sofre uma deformação causada pelos movimentos da cabeça, que acabam desviando os estereocílios. O sáculo e o utrículo são chamados de órgãos de otólitos, porque o termo otólito é usado para denominar os cristais de carbonato de cálcio. Os canais semicirculares, utrículo e sáculo possuem, cada um deles, uma orientação espacial diferente em relação à cabeça, conferindo assim uma sensibilidade seletiva a movimentação nas diferentes direções (MARTIN, 1998).

As terminações nervosas que chegam as células ciliadas das máculas e das cristas são aferências dos neurônios sensoriais bipolares, que se situam no gânglio de Scarpa, os axônios destes neurônios formam o ramo vestibular do VIII par craniano (BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002; NISHIDA, 2012). A partir deste local seguem pelo conduto auditivo interno junto com o ramo coclear e o nervo facial. Ao sair do conduto, o ramo vestibular atravessa a área do ângulo ponto-cerebelar e chega ao bulbo, terminando nos núcleos vestibulares localizados no assoalho do IV ventrículo. Os núcleos vestibulares já fazem parte do sistema vestibular central (MARTIN, 1998).

Bear, Connors e Paradiso (2002) explicam, que pelo fato dos canais de ambos os lados da cabeça serem aproximadamente paralelos uns aos outros eles

funcionam juntos de forma recíproca. Os dois canais horizontais trabalham juntos, enquanto cada um dos anteriores é emparelhado. Quando o movimento cefálico ocorre em um plano específico para um par de canais, um canal é excitado e o canal emparelhado oposto é hiperpolarizado.

A vascularização do sistema vestibular se dá pela artéria cerebelar ântero-inferior, ramo da artéria basilar, que supre o sistema vestibular periférico, através da artéria labiríntica (LOPES et al., 2008).

Os sensores de movimento do sistema vestibular periférico enviam informações ao SNC. Este processa os sinais e combina-os com outras informações sensoriais para estimar a orientação cefálica. O sistema vestibular central produz uma resposta à movimentação cefálica, que é transmitida aos músculos extraoculares e a medula espinhal para preparar os reflexos vestibulo-ocular (RVO) e vestibulo-espinhal (RVE). O RVO gera os movimentos dos olhos, que mantém a visão estável durante o movimento cefálico. O RVE gera um movimento corpóreo de compensação com o objetivo de manter a estabilidade cefálica e postural, ele consiste em uma montagem de vários reflexos. O desempenho do RVO e do RVE é monitorizado pelo SNC e quando necessário, é reajustado (HERDMAN, 2002)

Os neurônios de resposta motora para o RVO são os neurônios dos núcleos motores oculares, que orientam os músculos extraoculares. Estes músculos são dispostos em pares e orientados em planos próximos aos dos canais semicirculares. Esta disposição permite que um único par de canais seja ligado principalmente a um único par de músculos extraoculares. O resultado é um movimento conjugado dos olhos, no mesmo plano que o movimento da cabeça. Os neurônios de resposta motora para o RVE são as células do corno anterior da substância cinzenta da medula espinhal, que comandam os músculos esqueléticos (HERDMAN, 2002).

O equilíbrio corporal, pelo qual o sistema vestibular é um dos responsáveis, é uma complexa interação entre o sensorial e o motor que nos previne de quedas, por exemplo. Quando ocorre uma alteração visual, proprioceptiva ou vestibular surgem alterações, que caracterizam o desequilíbrio. Se a alteração é de origem vestibular, ocorrem sintomas, que entre outros, a tontura é o mais comum e o que mais afeta a qualidade de vida do indivíduo (POPPER, 2001).

O mesmo autor afirma que em decorrência das alterações, que a afecção labiríntica provoca, os pacientes podem se sentir inseguros e depressivos, levando-os ao isolamento e limitações nas atividades diárias e sociais.

Além de tontura, as lesões vestibulares, centrais ou periféricas, provocam também o nistagmo, um movimento involuntário oscilante dos olhos, seguindo um padrão horizontal, vertical ou rotatório. Os nistagmos periférico e central são diferentes um do outro, as seguintes características podem diferenciá-los: fixação dos olhos suprime o nistagmo periférico, mas não o central; o nistagmo vertical puro é geralmente central (AFIFI e BERGMAN, 2008).

A posição do corpo, o movimento dos olhos e a percepção espacial são controlados pelo sistema vestibular, com o objetivo de manter o equilíbrio corporal. O sistema proprioceptivo-vestibular constitui o ponto inicial de contato do ser humano com o ambiente (GANANÇA et al., 1998).

Gança et al. (2000) concluem que o equilíbrio corporal é fundamental para que os seres humanos possam adotar posturas e realizar movimentos com harmonia e conforto físico e mental.

2.2 Agrotóxicos organofosforados

Segundo a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002, os agrotóxicos são substâncias ou misturas, de natureza química, destinadas a prevenir, destruir ou repelir, direta ou indiretamente, qualquer forma de agente patogênico, ou de vida animal, ou vegetal, que seja nociva às plantas e animais, seus produtos e subprodutos e ao homem.

A utilização de agrotóxicos na agricultura teve seu início na década de 1920, tendo sua aplicação se expandido por ocasião da 2ª Guerra Mundial, quando foram utilizados como arma química.

Os inseticidas do grupo químico dos OF são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico e apresentam uma meia-vida curta, variando entre minutos a 72 horas (GONÇALVES, 2008). São inseticidas amplamente utilizados na agricultura, pecuária e no controle de vetores; sendo comercializados em formulações com diferentes apresentações como: pó, líquido, grânulo e soluções concentradas, etc. (MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO EM ACIDENTES COM AGROTÓXICOS, 2000).

A forma de absorção dos OF pode ser pela pele, ingestão e inalação. Estes são substâncias lipossolúveis, distribuem-se e armazenam-se principalmente no tecido adiposo, atravessam a barreira hematoencefálica e placentária. A elevação da

temperatura atmosférica é um fator de influência na absorção desses produtos, ou seja, esses se tornam mais voláteis, determinando uma elevação da pressão de vapor. Com isso, se elevam a capacidade de inalação e a velocidade de circulação sanguínea (GONÇALVES, 2008).

O mesmo autor afirma que os OF são inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE) no SNC, nos glóbulos vermelhos, no plasma e em outros órgãos, e provocam um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e consequentes efeitos parassimpaticomiméticos. Não se acumulam no organismo, mas são responsáveis por efeitos retardados.

A AChE é a enzima responsável pela degradação da acetilcolina em ácido acético e colina, substâncias inertes. A acetilcolina é o mais importante neurotransmissor do impulso nervoso nas junções sinápticas. Os OF ao inibirem a ação da AChE, provocam um excesso de acetilcolina nas terminações nervosas, o que inicialmente excitará e depois paralisará a transmissão nas sinapses colinérgicas, que incluem o SNC, terminações nervosas parassimpáticas e umas poucas terminações simpáticas, como glândulas sudoríparas (efeitos muscarínicos), nervos somáticos e sinapses ganglionares (efeitos nicotínicos). A reação entre o OF e o sítio ativo da AChE resulta na formação de uma enzima estável, fosforilada e não reativa, o que a torna “irreversivelmente inibida” (MANUAL DE DIAG. E TRAT. EM ACIDENTES COM AGROT., 2000).

Além do efeito de neurotoxicidade em animais expostos a OF, o mesmo pode provocar geração de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e consequente dano celular (QIAO et al., 2002; AZEVEDO, 2009).

A principal via de eliminação deste composto do organismo é a urinária. A vida média do OF e de seus produtos é relativamente curta, porém seu efeito tóxico é prolongado (MANUAL DE DIAG. E TRAT. EM ACIDENTES COM AGROT., 2000).

De acordo com a classificação da EMBRAPA (2006), estes produtos são classificados toxicologicamente em quatro classes:

- Classe I: Extremamente tóxicos
- Classe II: Altamente tóxicos
- Classe III: Medianamente tóxicos
- Classe IV: Pouco ou muito pouco tóxicos

Incluso na classificação toxicológica I, encontra-se o agrotóxico inseticida organofosforado Clorpirifós. Sua composição química é O, O – diethyl O-3, 5,6 –

trichloro -2- pyridylphosphorothioate, com fórmula bruta $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. É utilizado como inseticida nas lavouras de algodão, batata, café, citros, feijão, maçã, milho, soja, tomate. O produto pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal e em menor extensão por via dérmica e inalatória, é rapidamente metabolizado e excretado pela urina e fezes. Este OF causa efeitos agudos como sintomas de sonolência, cefaleia, tontura, tremores, náuseas, sudorese, visão turva, dificuldade respiratória, incontinência e convulsões; bem como efeitos crônicos que através de exposições repetidas ou prolongadas podem resultar em prejuízo de memória e concentração, depressão severa, irritabilidade, cefaleia, sonambulismo ou insônia (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2010).

Os equipamentos de proteção individual recomendados para uso do produto em aplicação na lavoura são máscaras com filtro de carvão ativado cobrindo nariz e boca, luvas de borracha ou material impermeável cobrindo as mãos, óculos de segurança para produtos químicos, macacão de mangas compridas impermeáveis, botas de PVC e chapéu de aba larga (VIDE BULA PYRINEX 480 EC).

Também de acordo com a bula do produto, o intervalo de reentrada na lavoura onde foi aplicado o produto é de no mínimo 24 horas após a aplicação.

2.3 Eletronistagmografia

A avaliação funcional selecionada para este estudo foi a prova calórica dentro do espectro do exame de eletronistagmografia (ENG). A ENG, em suas diferentes modalidades, é a maneira mais adequada de avaliar os achados oculares e/ou vestibulares. Esta consiste no registro da movimentação ocular, estes movimentos fisiológicos ou induzidos por estimulações visuais representam o elemento principal na investigação e na avaliação dos distúrbios vestibulares (GANANÇA et al., 1998; MUNARO, SLEIFER, PEDROSO, 2009).

A ENG é um método de inscrição dos movimentos oculares baseados na captação, por meio de eletrodos de superfície, da variação do potencial elétrico entre a córnea (+) e a retina (-) que ocorre quando os olhos se movimentam. Destina-se ao registro do nistagmo (GANANÇA et al., 1998).

A resposta padrão para o exame é o nistagmo, pois toda vez que se estimula o sistema vestibular, ele aparece como resposta. Isso se deve a um desequilíbrio entre as forças antagônicas vestibulares, o que contribui para manter a orientação

dos globos oculares. Da mesma maneira uma patologia no sistema periférico ou em suas conexões centrais pode determinar o aparecimento do nistagmo (PESSÔA, 1999).

O nistagmo constitui-se no elemento fundamental de análise do RVO na ENG. As anormalidades do RVO podem ser encontradas na pesquisa da prova calórica (em que a estimulação labiríntica dos canais semicirculares laterais é efetuada em cada ouvido independentemente). Esta prova permite classificar as disfunções em periféricas e centrais. Além disso, as disfunções vestibulares podem ainda ser classificadas como irritativas (quando a prova calórica mostrar preponderância direcional do nistagmo ou hiperreflexia) ou deficitárias (quando a prova calórica revelar hiporreflexia ou arreflexia) (GANANÇA et al., 1998).

A exploração semiológica do RVO exige uma calibração prévia dos movimentos oculares (GANANÇA et al., 1998).

O mecanismo de ação do labirinto a estimulação é complexo, mas se admite que a teoria hidrodinâmica desenvolvida por Barany, ainda é correta. De acordo com o autor, a irrigação fria do conduto auditivo externo irá produzir um resfriamento da parede do canal semicircular lateral que, na posição vertical (paciente deitado em decúbito dorsal com a cabeça fletida para frente de 25 a 30°), determinará um movimento dos líquidos labirínticos e conseqüentemente um desvio da cúpula e, portanto, nistagmos, desvios segmentares e tonturas. A irrigação com água quente provoca nistagmo na direção da orelha irrigada, enquanto que a água fria provoca o nistagmo na direção oposta da orelha irrigada (PESSÔA, 1999; MOR, FRAGOSO, 2012).

A estimulação da prova calórica da ENG pode ser realizada por água ou por ar, em diferentes temperaturas. O uso do ar é indicado em casos de perfuração timpânica ou para minimizar os sintomas neurovegetativos. Este método exige o uso de equipamentos especiais e não possui uma rotina clínica bem descrita como a da água. Já a água é um procedimento já padronizado. Esta provoca mais sintomas neurovegetativos, todavia produz uma resposta mais robusta ao exame (PESSÔA, 1999; MOR, FRAGOSO, 2012).

O exame com água é realizado nas temperaturas quente, fria e gelada. Segundo o protocolo de Fitzgerald & Hallpike (1942), as temperaturas utilizadas seriam de 44° C e 30°C, com 240 ml de água, irrigação durante 40 segundos e intervalo de cinco minutos entre as irrigações na seguinte sequência: 30°C-OD,

30°C-OE, 44°C-OE e 44°C-OD. Este protocolo sofreu algumas alterações com o passar dos anos. O protocolo usual atualmente é a estimulação a água com canais semicirculares laterais verticalizados, utilizando-se 240 ml de água durante 40 segundos de irrigação e na seguinte sequência: 44°C-OD, 44°C-OE, 30°C-OE e 30°C-OD; com intervalo de três minutos entre as provas (MOR, FRAGOSO, 2012).

Quando tais temperaturas não produzem respostas adequadas podemos realizar a prova a 18°C ou até mesmo a 0°C (PESSÔA, 1999). Estes protocolos são utilizados em humanos, o valor de temperatura estabelecido neste trabalho foi de 10°C, segundo o protocolo de Marsellian, Grellet e Colafêmina de 1969 (OLIVEIRA, CIBILINI, SOUZA, ANDRADE, 1979).

A prova fria, assim como a prova gelada, produzem estímulos ampulípedos, por isto o nistagmo neste caso bate para o lado oposto ao estímulo, já na prova quente o estímulo é ampulífugo e o nistagmo irá bater para o mesmo lado (PESSÔA, 1999).

3 ARTIGO 1

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS INTOXICADAS POR ORGANOFOSFORADO POR MEIO DA PROVA CALÓRICA

Functional evaluation system of guinea pigs vestibular poisoned by organophosphate through caloric

Lícia Assunção Cogo¹, Adriana de Andrade Batista Murashima², Valdete Alves Valentins dos Santos Filha³, Miguel Angelo Hyppolito⁴ e Aron Ferreira da Silveira⁵.

¹ Fisioterapeuta. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, Brasil. liciacogo@hotmail.com

² Bióloga. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, Brasil. adrimurashima@fmarp.usp.br

³Fonoaudióloga. Professora – Doutora, Adjunta do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria - RS, Brasil. valdetev@hotmail.com

⁴ Médico Otorrinolaringologista. Professor-Doutor, Docente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, Brasil. mhyppolito@uol.com.br

⁵ Médico Veterinário. Professor-Doutor Titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria e orientador do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM. Santa Maria – RS, Brasil. aronfer@gmail.com

Dados do Responsável:

Lícia Assunção Cogo

Endereço: Av. Mons. Pascoal Gomes Libreloto, 199. Parque Dom Antônio Reis.
Santa Maria – RS. CEP: 97065-290.

Telefone: 55- 99484920

E-mail: liciacogo@hotmail.com

Fonte de auxílio: CAPES

Declaro não existir conflito de interesse neste manuscrito.

Resumo

A manutenção do equilíbrio corporal é realizada pelo funcionamento conjunto do sistema vestibular, da visão e do sistema proprioceptivo. O sistema vestibular produz uma resposta à movimentação cefálica que é transmitida aos músculos extraoculares e produz o reflexo vestibulo-ocular. A eletroneistagmografia avalia de maneira adequada a integração visuo-vestibular. Os compostos organofosforados causam danos à saúde sendo a tontura um dos sintomas referidos por pessoas expostas a estes agentes. Objetivo deste estudo foi avaliar o funcionamento do sistema vestibular de cobaias expostas ao organofosforado clorpirifós, de forma aguda, por meio da prova calórica da eletroneistagmografia. A pesquisa do tipo experimental realizou a eletroneistagmografia de cobaias expostas a organofosforado durante 10 dias consecutivos, nas doses 0,5mg/kg/dia e 1,0mg/kg/dia por via intraperitoneal e comparadas com grupo controle que recebeu administração de água destilada. Foi realizada prova calórica gelada (10°C) e comparadas as variáveis frequência de aparecimento de nistagmos em 10 segundos (u/s) e velocidade angular da componente lenta (°/s). Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa na comparação das variáveis entre os grupos. Conclui-se que nas doses testadas o agrotóxico organofosforado clorpirifós não causou danos funcionais detectáveis na prova calórica.

Palavras-chave: Equilíbrio Postural. Sistema Vestibular. Inseticida Organofosforado. Praguicida. Toxicidade.

Abstract

Maintaining body balance is held by the joint operation of the vestibular system, vision and proprioceptive system. The vestibular system produces a response to head movement is transmitted to the extraocular muscles and produces the vestibular-ocular reflex. Electronystagmography adequately assesses visual-vestibular integration. Organophosphate compounds cause health damage being one of the dizziness symptoms reported by people exposed to these agents. This study aimed to assess the functioning of the vestibular system of guinea pigs exposed to the organophosphate chlorpyrifos, acutely, through caloric electronystagmography. The research conducted an experimental electronystagmography of guinea pigs exposed to organophosphate for 10 consecutive days, at doses 0.5 mg / kg / day and 1.0 mg / kg / day intraperitoneally and compared with a control group that received distilled water administration. We performed caloric ice (10 ° C) and compared the variables frequency of appearance of nystagmus in 10 seconds (u / s) and angular velocity of the slow component (° / s). The results showed no statistically significant difference in the comparison of variables between groups. We conclude that the tested doses of the pesticide organophosphate chlorpyrifos caused no detectable functional damage in the caloric test.

Key-words: Postural Balance. Vestibular System. Insecticide Organophosphate. Pesticides. Toxicity.

Introdução

O equilíbrio corporal é mantido pelo funcionamento conjunto de três estruturas: o sistema vestibular, o sistema visual e o sistema proprioceptivo. A manutenção do equilíbrio geral é realizada pelo sistema vestibular, esse sistema detecta as sensações de equilíbrio, auxiliando na coordenação dos movimentos da cabeça e dos olhos, e nos ajustes da postura corporal. Disfunções neste sistema podem resultar sensações desagradáveis como vertigem, náusea e uma sensação de desequilíbrio acompanhada de movimentos incontroláveis dos olhos, o nistagmo (GUYTON, 1992; BEAR, CONNORS, PARADISO, 2002; AFIFI & BERGMAN, 2008).

O sistema vestibular nos seres humanos é composto por três componentes fundamentais: um sistema sensorial periférico, um processador central e um mecanismo de resposta motora. O sistema periférico é constituído de um conjunto de sensores de movimento, os quais enviam informações ao sistema nervoso central (SNC). O SNC processa esses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica (HERDMAN, 2002). Sua estrutura anatômica é composta de uma rede de tubos, ossos e câmaras chamados labirinto ósseo, e dentro dele, uma rede de tubos membranosos chamados labirinto membranoso, a parte funcional do sistema vestibular (GUYTON, 1992).

O sistema vestibular central produz uma resposta à movimentação cefálica que é transmitida aos músculos extraoculares e a medula espinhal desencadeando os reflexos vestibulo-ocular (RVO) e vestibulo-espinhal (RVE). O RVO gera os movimentos dos olhos, que mantém a visão estável durante o movimento cefálico. O desempenho dos reflexos é monitorizado pelo SNC e quando necessário, é reajustado (HERDMAN, 2002).

A eletroneistagmografia (ENG), em suas diferentes modalidades, é a maneira mais adequada de avaliar os achados oculares e/ou vestibulares. Esta consiste no registro da movimentação ocular, que representa o elemento principal na investigação e na avaliação dos distúrbios vestibulares (GANANÇA, VIEIRA, CAOVIALLA, 1998; MUNARO, SLEIFER, PEDROSO, 2009).

A resposta padrão para o exame é o nistagmo, pois toda vez que se estimula o sistema vestibular, ele aparece como resposta. Isso se deve a um desequilíbrio entre as forças antagônicas vestibulares que contribui para manter a orientação dos

globos oculares. Da mesma maneira uma patologia no sistema periférico ou em suas conexões centrais pode determinar o aparecimento do nistagmo (PESSÔA, 1999). O nistagmo constitui-se no elemento fundamental de análise do RVO na ENG. As anormalidades do RVO podem ser encontradas na pesquisa da prova calórica (GANANÇA, VIEIRA, CAOVIALLA, 1998).

Algumas substâncias químicas têm causado danos ao ser humano e ao meio ambiente. Dentre estas substâncias encontram-se os agrotóxicos, alguns conhecidos por suas propriedades neurotóxicas, são frequentemente considerados como responsáveis por intoxicações a trabalhadores que entram em contato com esses compostos, principalmente nos países em desenvolvimento (TEIXEIRA, AUGUSTO, MORATA, 2003; HOSHINO, PACHECO-FERREIRA, TAGUCHI, TOMITA, 2008). Os agrotóxicos são um importante fator de risco para a saúde humana. Estes produtos são utilizados em grande escala por vários setores produtivos e mais intensamente pelo setor agropecuário (SILVA, SILVA, FARIA, 2005).

No Brasil, foram registrados 101.086 casos de intoxicação humana em 2009. Dentre esses as intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola totalizaram 5.253 casos, 1.058 só no Sul do país, região de forte produção agrícola (SINITOX, 2009). Em 2008, os dados mostravam 806 casos na região, o que revela que os casos de intoxicação vêm crescendo. O difícil acesso às informações e à educação por parte dos usuários desses produtos, bem como o baixo controle sobre sua produção, distribuição e utilização são alguns dos principais determinantes na constituição dessa situação como um dos principais desafios de saúde pública.

Em 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor mundial de venenos agrícolas, neste ano as vendas com agrotóxicos no país significaram 7,125 bilhões de dólares. No total, os herbicidas representaram cerca de 45% das vendas, os inseticidas 29%, e os fungicidas 21%(GUAZZELLI, 2009; IBAMA, 2010).

Entre os inseticidas, encontramos os organofosforados (OF), que são compostos anticolinesterásicos que causam variado grau de toxicidade para o ser humano. Em razão do benefício do agrotóxico para o sucesso do plantio, o trabalhador tem a tendência de subestimar seus efeitos na saúde de quem entra em contato com o produto (KÖRBES, 2009).

Diversas vezes, essa exposição causa alterações clínicas que, silenciosamente, alteram a vida do trabalhador. Sabe-se que a exposição por um

curto período causa os chamados efeitos agudos. Este quadro varia de intensidade, podendo ser caracterizado por náusea, vômito, cefaleia, tontura, desorientação, hiperexcitabilidade, parestesias, irritação de pele e mucosas, fasciculação muscular, dificuldade respiratória, hemorragia, convulsões, coma e morte. A tontura é um sintoma de destaque, considerada uma das expressões clínicas da exposição aos agrotóxicos (SILVA, SILVA, FARIA, 2005; HOSHINO, PACHECO-FERREIRA, TAGUCHI, TOMITA, 2008).

Faz-se importante ressaltar que a população exposta ao agrotóxico não se limita somente ao trabalhador, mas também a sua família, que convive próxima a plantação. Este fato evidencia a necessidade de pesquisas que aprofundem metodologias para avaliação da exposição aos agentes tóxicos e os riscos associados a estes produtos, tanto nos casos de intoxicação aguda como na exposição em longo prazo ao agrotóxico (KÖRBES, 2009).

O objetivo da pesquisa foi avaliar o funcionamento do sistema vestibular de cobaias expostas ao organofosforado clorpirifós, de forma aguda, por meio da eletrônistagmografia.

Materiais e métodos

A pesquisa caracterizou-se como do tipo experimental de corte prospectivo (SEVERINO, 2008). A mesma foi realizada de acordo com os Princípios Éticos na Experimental Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais e foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob o nº. 135/2011, em 08 de novembro de 2011.

Para este estudo foram utilizadas 18 cobaias albinas machos, espécie *Cavia porcellus*, linhagem inglesa, com peso entre 300 e 500g, com Reflexo de Preyer presente e que não apresentavam sinais de otite externa e/ou média, ausência de perfuração timpânica à otoscopia. O Reflexo de Preyer é avaliado por observação de pequenos movimentos de contração do pavilhão auricular da cobaia, quando a mesma é estimulada com sons de pequena e média intensidade. Tal reflexo é

utilizado para avaliar a função auditiva em roedores (JERO, COLING, LALWANI, 2001).

Os animais ficaram alojados no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina-USP, em gaiolas coletivas de acordo com o grupo, com maravalha, em regime claro/escuro de 12 horas, temperatura e umidade controladas, ração própria e água *ad libitum*.

Para a intoxicação as cobaias receberam pela via intraperitoneal o agrotóxico OF Pyrinex 480 CE®, comercializado pela Milenia Agrociências S/A, que tem como princípio ativo o clorpirifós. O Pyrinex 480 CE® é um inseticida OF com ação de contato e ingestão, recomendado para o controle de pragas nas culturas de algodão, batata, café, citros, feijão, maçã, milho, soja, tomate rasteiro para fins industriais e trigo. O produto está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 09298.

A via intraperitoneal foi a via escolhida, por garantir a absorção da dose, já que por outras via corria-se o risco de não sabermos a exata dose absorvida.

As cobaias foram divididas em três grupos: no grupo I (controle) foi realizada a administração de água destilada intraperitoneal em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de agrotóxico para o peso da cobaia; no grupo II foi administrado o agrotóxico por via intraperitoneal na dose única diária de 0,5 mg/kg/dia; e no grupo III foi administrado o agrotóxico por via intraperitoneal na dose única diária de 1,0 mg/kg/dia, todos durante dez dias consecutivos. As cobaias tiveram seu peso controlado diariamente para o cálculo adequado da dose do agrotóxico a ser utilizada. O controle era composto por cinco cobaias, e os grupos tratados II e III, por seis e sete cobaias respectivamente.

Para o manejo dos animais e administração do agrotóxico foram utilizados os equipamentos de proteção individual recomendados na bula do produto.

O número de cobaias por grupo foi definido de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) para realização de estudos toxicológicos, sendo o mínimo de cinco animais para cada dose testada no experimento.

A dose do agrotóxico escolhido foi baseada na $D_L 50$ oral para ratos do Pyrinex 480 CE®, encontrada na bula do produto, que é de 300 mg/Kg e considerou as normas da ANVISA de não exceder 80% da $D_L 50$.

A avaliação funcional selecionada para ser realizada neste estudo foi a prova calórica gelada (água à 10°C), conforme o protocolo de Marseillan, Grellet e Colafémia (1969) dentro do espectro do exame de ENG. As variáveis selecionadas foram: frequência de aparecimento de nistagmos (Fn) em 10 segundos de registro, mensurada em unidades por segundo (u/s) e velocidade angular da componente lenta (VACL), medida em graus por segundo (°/s).

A ENG foi realizada 24 horas antes de se iniciar o experimento e 24 horas após a última administração do agrotóxico e de água destilada no grupo controle. O primeiro exame foi realizado para que pudesse ser usado como parâmetro de comparação da situação do sistema vestibular das cobaias, previamente a intoxicação e pós-intoxicação. O segundo procedimento foi realizado para avaliação do efeito do agrotóxico no sistema vestibular destas cobaias através de uma prova funcional, analisando assim o reflexo vestibulo-ocular das mesmas.

A técnica a ser utilizada para o estudo das respostas vestibulares ao estímulo térmico foi a desenvolvida por Marseillan, Grellet e Colafémia em 1969. Essa técnica baseia-se no registro eletrônístagmográfico das reações oculares ao estímulo térmico, em cobaias preparadas para experimentos crônicos com eletrodos permanentes (OLIVEIRA, CICILINI, SOUZA, ANDRADE, 1979). Todas as cobaias selecionadas foram submetidas a um procedimento cirúrgico asséptico para a implantação de um eletrodo subcutâneo na região frontal, e dois eletrodos subcutâneos nas regiões periorbitais (esquerda e direita) sob anestesia com cloridrato de Xilazina 2% (0,5 ml/Kg – Dopaser®; Laboratórios Calier do Brasil Ltda) e cloridrato de Quetamina 10% (0,9ml/Kg - Ketamin® 50mg/ml; Laboratório Cristália), via intramuscular.

Após a cicatrização do ferimento cirúrgico as cobaias foram contidas em caixas adequadas para o registro do nistagmo, provocado pela irrigação com 20 ml de água gelada a 10°C no conduto auditivo externo.

Concluídos os dez dias de administração do agrotóxico, as cobaias foram submetidas a um novo registro do nistagmo (Figura 1), provocado novamente pela irrigação do conduto auditivo externo com 20 ml de água à 10°C.

Para o registro do exame foi utilizado o equipamento Nistagmocil®, monocal, que é um eletrônístagmógrafo para registro de nistagmos provocados pelo método de RALPAC (estimulação térmica a ar ou água), é portátil e de simples manejo, constituído por um sistema de registro acrescido de pré-amplificadores

especiais acoplados por meio de capacitores que registram variações dos potenciais córneo-retinianos, mas que não registram os valores absolutos desses potenciais.

Foram utilizados dois elétrodos ativos, um em cada canto externo das cavidades orbitárias, para registro dos movimentos horizontais e um eletrodo indiferente na linha média nasal a 2 cm da ponta nasal.

Os pré-amplificadores foram regulados para uma excursão de 2 cm da pena inscritora no papel de registro. Os elétrodos são polarizados de maneira que o olhar para a direita ocasione o desvio da pena para cima e o olhar para a esquerda cause um desvio da pena inscritora para baixo.

A calibração dos movimentos deu-se a partir da estabilização da pena e permanência da cobaia com a cabeça em posição estável.



Figura 1 – Fotografia dos equipamentos e registro da Eletronistagmografia

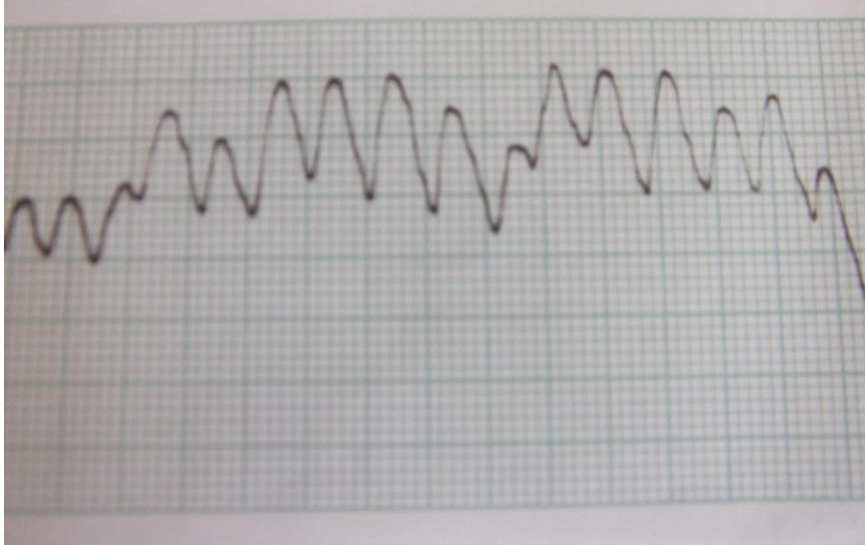


Figura 2 – Fotografia do registro dos nistagmos para a direita de cobaia do Grupo Controle, estímulo oferecido na orelha esquerda.

Os valores da frequência de aparecimento de nistagmo (F_n) foram obtidos a partir da contagem do número de nistagmos presentes em 10 segundos de registro do exame, com base na velocidade do papel no equipamento utilizado de 25 mm/s.

Para a obtenção dos valores da velocidade angular da componente lenta (VACL), foram realizadas três medidas de nistagmos com bases iguais em três locais diferentes: no início, meio e fim do registro. O valor considerado para VACL para cada orelha de cobaia foi a média entre os nove valores mensurados.

Os dados encontrados foram tratados estatisticamente através do programa *Statística*, versão 9.0. Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors. Para os dados normais intragrupos foi utilizado o teste *t de Student* para variáveis dependentes. Já para os dados intergrupos foi realizado o teste *ANOVA*. Foi considerado o nível de significância de 5%.

Resultados

Os resultados da ENG, quando comparados intragrupos demonstraram que não existe diferença significativa entre as orelhas em nenhum dos grupos, o que nos mostra que existe semelhança entre as orelhas, tanto na variável F_n como na variável VACL. O teste de comparação no momento pré-experimento entre os grupo

I, II e III demonstrou que não existia diferença significativa entre eles, portanto os grupos eram homogêneos.

Tais testes foram realizados para garantir a homogeneidade entre as orelhas e entre os grupos. Este fato permite-nos comparar os resultados no momento pós-experimento, considerando que antes eles eram estatisticamente semelhantes.

As médias das Fn e da VACL para as orelhas dos animais em cada grupo estão explicitadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Comparação dos valores médios das frequências do aparecimento de nistagmos (u/s) entre o pré e pós-experimento dos Grupos I, II e III (#)

Grupo	Pré Experimento	Pós Experimento	p-valor
G I (n= 5)			
OD	5,18±1,12	4,08±1,29	0,28
OE	4,78±0,70	4,28±1,39	0,37
G II (n= 6)			
OD	4,95±2,04	3,96±1,18	0,16
OE	4,63±0,98	4,08±1,30	0,20
G III (n= 7)			
OD	4,42±1,52	3,94±0,77	0,47
OE	4,45±1,27	5,04±0,79	0,37

(#) Os dados foram apresentados como a média ± desvio padrão

OD - orelha direita OE - orelha esquerda n - número de cobaias u/s - unidade/segundo

Teste intragrupo – Teste *t de Student* Teste intergrupos - ANOVA

Tabela 2 - Comparação dos valores médios das velocidades angulares da componente lenta ($^{\circ}/s$) entre o pré e pós-experimento dos Grupos I, II e III^(#)

Grupo	Pré Experimento	Pós Experimento	p-valor
G I (n= 5)			
OD	59,75±19,19	63,21±21,39	0,79
OE	55,59±23,25	73,39±22,70	0,09
G II (n= 6)			
OD	59,05±17,42	57,34±15,74	0,76
OE	44,31±14,37	52,86±11,19	0,36
G III (n= 7)			
OD	55,85±23,17	69,45±24,18	0,17
OE	62,66±16,71	68,31±25,69	0,54

^(#) Os dados foram apresentados como a média \pm desvio padrão
 OD - orelha direita OE - orelha esquerda n - número de cobaias $^{\circ}/s$ - grau por segundo
 Teste intragrupo – Teste *t de Student* Teste intergrupos – ANOVA

A comparação entre os grupos no pós-experimento não demonstrou diferença estatisticamente significativa nas variáveis Fn e VACL.

Discussão

Pesquisadores advertem que a grande maioria dos acidentes graves e fatais causados por agrotóxicos, incluindo a exposição acidental, profissional e a ingestão em caso de suicídio é devida aos inseticidas OF e carbamatos altamente tóxicos (MENDES, 1995; MORAES, 1999).

Este fato revela que o agrotóxico OF clorpirifós nas doses administradas de 0,5mg/kg/dia e 1mg/kg/dia, durante 10 dias não ocasionou dano que fosse detectado em exame funcional do sistema vestibular das cobaias.

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o impacto do uso de agrotóxicos OF na saúde humana. Tais estudos utilizaram como metodologia a entrevista com trabalhadores rurais expostos a estes compostos (MANJABOSCO, MORATA, MARQUES, 2004; ARAÚJO et al., 2007; LISBOA, SENA, DUTRA, 2007; FARIA, ROSA, FACCHINI, 2009; HOSHINO et al., 2009; MAGALHÃES, 2010;

AZEVEDO, 2010; SOUZA, 2011). Os resultados mostraram a tontura, como sendo um sintoma recorrente referido por esses trabalhadores. O que sugere um comprometimento funcional, porém neste estudo não se encontrou diferença significativa entre as cobaias intoxicadas e as não intoxicadas, através da prova calórica.

Ainda com a ressalva, de que a entrevista com trabalhadores é uma avaliação subjetiva e, portanto, não possui a mesma confiabilidade do exame funcional realizado neste estudo. Exame este, que confere um resultado mensurável do efeito causado pela exposição à substância em questão. Em contraponto com esta pesquisa, os estudos referidos avaliam os sintomas crônicos, enquanto a amostra dessa pesquisa foi exposta por um período breve, onde se avaliou o efeito agudo e em animais.

O estudo que avaliou as alterações morfológicas do aparelho vestibulo-coclear de cobaias expostas a OF encontrou evidências de alterações através da microscopia eletrônica de varredura nas cócleas, sáculos e utrículos. Este resultado que evidencia uma alteração morfológica pode sugerir um distúrbio funcional (KÖRBES, 2010). No entanto, na presente pesquisa ainda não houve manifestação de sintomas funcionais, isto pode ter ocorrido em virtude da diferença do princípio ativo testado, apesar de pertencer à classe dos compostos organofosforados.

Os resultados da presente pesquisa não mostraram diferença estatística significativa entre as variáveis pesquisadas. Isto está em desacordo com outros pesquisadores que encontraram alterações funcionais em testes sensório-motores em seres humanos como mudança na medida de oscilação postural com olhos fechados e em superfície macia, sugerindo efeito subclínico do agrotóxico sob os sistemas vestibular e proprioceptivo (HOSHINO et al, 2008). Também discorda da pesquisa, que analisou a Vectoeletronistagmografia de trabalhadores expostos a OF cronicamente, que encontraram alterações em 50 % dos casos analisados; estas alterações traduziram-se em hiperreflexia na prova calórica da VENG, entretanto, aqui avaliamos os efeitos agudos deste organofosforado (DICK, STEENLAND, KRIEG, HINES, 2001).

O estudo com trabalhadores rurais expostos de forma aguda torna-se difícil, já que a grande maioria destes sujeitos esteve anteriormente exposta a estas substâncias por longos períodos. Outra limitante do estudo com seres humanos é que raramente os mesmos estão expostos a um só agente, o que dificulta a

avaliação dos efeitos específicos de um único princípio ativo. Por tal motivo, o estudo experimental torna-se uma alternativa de se pesquisar o efeito isolado de um princípio ativo.

Os achados dessa pesquisa são similares àqueles encontrados em pesquisa realizada na China, país de forte produção agrícola, que utilizou como amostra 301 crianças com idade entre 23-25 meses expostas a OF. Neste estudo evidenciou-se a presença de altos níveis de metabólitos OF nos testes de urina, porém não encontrou relação entre este dado e os níveis de desenvolvimento infantil (GUODONG et al., 2012). Este fato reforça a ideia de que mesmo na presença do composto no organismo, muitas vezes não encontramos correlação funcional com este achado.

Exposições agudas a organofosforados podem não ser capazes de representar alterações em exames funcionais, como mostra o estudo que avaliou os efeitos destes compostos no sistema auditivo de cobaias. A pesquisa encontrou alterações nas células ciliadas externas da cóclea pós-intoxicação aguda por OF, porém esta lesão morfológica não se traduziu em alteração funcional no sistema auditivo periférico das cobaias avaliadas pelos testes de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção e potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (KÖRBES, 2009).

O período agudo de exposição e avaliação pode ter sido o fator determinante dos resultados não significativos neste estudo, apontando para a necessidade de se realizar estudos com diferentes doses e por um período de tempo mais prolongado para que se possa determinar com maior segurança a utilização desta substância.

Conclusão

O agrotóxico organofosforado clorpirifós nas doses testadas não demonstrou dano funcional ao sistema vestibular das cobaias intoxicadas de forma aguda.

Agradecimentos

Agradecemos às equipes do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e

Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela colaboração nesta pesquisa e a CAPES pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. **Neuroanatomia Funcional**: texto e atlas. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2008.p. 354.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Metodologias utilizadas para a realização de estudos toxicológicos. Brasília, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br.

ARAÚJO, A.J.et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ.**Ciênc. saúde coletiva**. Rio de Janeiro, vol.12 nº.1, Jan./Mar. 2007. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141381232007000100015&script=sci_artt_ext>.

AZEVEDO, K. A. A. **Neurotoxicidade perinatal por cádmio em ratos Wistar e interação com clorpirifós**. Tese de doutorado em Clínica Veterinária. UNESP, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS B. W.; PARADISO, M.A. **Neurociências Desvendando Sistema Nervoso**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 350-395.

DICK, R.B.; STEENLAND, K.; KRIEG, E.F.; HINES, C.J. Evaluation of acute sensory–motor effects and test sensitivity using termiticide workers exposed to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and Teratology**. Vol. 23, issue 4, July-August 2001, Pages 381-393. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>.

FARIA, N.M.X.; ROSA, J.A.R.; FACCHINI, L.A. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. **Rev. Saúde Pública** . São Paulo, vol.43 no.2, Apr. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/2009nahead/7200.pdf>>.

GANANÇA, M. M.; VIEIRA, R. M.; CAOVILO, H. H. **Princípios de Otoneurologia**. Volume 1. São Paulo: Atheneu, 1998. p.1-3, 23-43.

GUAZZELLI, M.J. **Brasil: o maior consumidor de agrotóxicos**. [Entrevista concedida IHU On-line. Instituto HumanitasUnisinos – IHU, da Universidade do Vale

do Rio dos Sinos –Unisinos, em São Leopoldo, RS]. Junho, 2009. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2009/06/09/brasil-o-maior-consumidor-de-agrotoxicos-entrevista-especial-com-maria-jose-quazzelli>>.

GUODONG, D.; PEI, W.; YING, T.; JUN, Z.; YU, G.; XIAOJIN, W.; et al. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Shanghai children. **Environ.Sci. Technol.** Mar, 2012; 46(5): 2911-7.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 583-548.

HERDMAN, S. J. **Reabilitação Vestibular**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2002. p. 3-24.

HOSHINO, A. C. H. et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** São Paulo, vol.74 no.6 , Nov./Dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003472992008000600015>

HOSHINO, A. C. H. et al. A auto-percepção da saúde auditiva e vestibular de trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev. CEFAC.** 2009 Out-Dez; 11(4):681-687. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-18462009000800017&script=sci_abstract&tlng=pt.

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental/ Rafaela Maciel Rebelo et. al. – Brasília: Ibama, 2010.

JERO, J.; COLING, D. E.; LALWANI, A. K. The use of Preyer's reflex inevaluation of hearing in mice. **ActaOtolaryngol.** 121(5): 585-589, 2001.

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

KÖRBES, D.; SILVEIRA, A.F.; HYPOLITO, M.A.; MUNARO, G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2010;76(2):238-44. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942010000200015>.

LISBOA, R.; SENA, J.; DUTRA, T. **Uso de agrotóxicos na produção de hortaliças da Bacia Hidrográfica do Natuba, aflente do Tapacurá – PE e consequências sobre o meio ambiente e saúde dos agricultores.** Artigo apresentado no II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, PB, 2007.

MAGALHÃES, M. A. S. **Exposição A Agrotóxicos Na Atividade Agrícola: Um Estudo De Percepção De Riscos Á Saúde Dos Trabalhadores Rurais No Distrito De Pau Ferro – Salgueiro – PE.** (Dissertação). Mestrado Profissional em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

MANJABOSCO, C. W.; MORATA, T. C.; MARQUES, J. M. Perfil Audiométrico de Trabalhadores Agrícolas. **Arq. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.8, n.4, p. 285-295, 2004. Disponível em: <http://www.arquivosdeorl.org.br/conteudo/acervo_port.asp?id=293>.

MENDES, R. **Patologia do Trabalho.** Rio de Janeiro: Athneu, 1995, p. 504.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.

MORAES, A.C.L. **Contribuição para o estudo da intoxicação humana por carbamatos: o problema do “chumbinho” no Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - FIOCRUZ, 1999.

MUNARO, G.; SLEIFER, P.; PEDROSO, F. S. Análise da influência do nistagmo espontâneo e pré-calórico na Vectoeletronistagmografia. **Rev. CEFAC.** Vol.11. nº. 2. São Paulo, Apr./Jun. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151618462009000200019>.

OLIVEIRA, J. A. A; CICILINI, G. A.; SOUZA, M. L.; ANDRADE, M. H. Efeitos do ácido etacrínico sobre o sistema vestibular. **Rev. Bras. de Otorrinolaringol.** Jan./Abr. 1979; 45(1), p. 8-16.

PESSÔA, K. S. **Avaliação Otoneurológica.** Monografia (Especialização em Audiologia Clínica) – CEFAC. Rio de Janeiro, 1999.

SEVERINO, A. J. **Metodologia Científica.** São Paulo: Cortez, 2008.

SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, 10(4):891-903, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141381232005000400013

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>.

SOUZA, J. L. N. C. **O uso de agrotóxicos entre produtores de hortaliças na localidade rural de Passo do Vigário, Viamão/RS** (Trabalho de Conclusão de Curso). Graduação Tecnológico em Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural – PLAGEDER da Faculdade de Ciências Econômicas Balneário Pinhal: UFRGS, 2011.

TEIXEIRA, C.F.; AUGUSTO, L.G.S.; MORATA, T.C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Rev. Saúde Pública**.2003;37(4):417-23. Disponível em: <<http://www.scielosp.org/pdf/rsp/v37n4/16775.pdf>>.

4 ARTIGO 2

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO SISTEMA VESTIBULAR DE COBAIAS INTOXICADAS POR ORGANOFOSFORADO

*Morphological Analysis of Vestibular System of Guinea Pigs Poisoned to
Organophosphate*

Lícia Assunção Cogo¹, Adriana de Andrade Batista Murashima², Valdete Alves
Valentins dos Santos Filha³, Miguel Angelo Hyppolito⁴ e Aron Ferreira da Silveira⁵.

¹ Fisioterapeuta. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, Brasil. liciacogo@hotmail.com

² Bióloga. Mestranda do Programa de Pós Graduação em Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, Brasil. adrimurashima@fmarp.usp.br

³Fonoaudióloga. Professora - Doutora Adjunta do Departamento de Fonoaudiologia da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria - RS, Brasil. valdetev@hotmail.com

⁴Médico Otorrinolaringologista. Professor-Doutor, Docente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, Brasil. mhyppolito@uol.com.br

⁵ Médico Veterinário. Professor-Doutor Titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria e orientador do Programa de Pós Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM. Santa Maria – RS, Brasil. aronfer@gmail.com

Dados do Responsável:

Lícia Assunção Cogo

Endereço: Av. Mons. Pascoal Gomes Libreloto, 199. Parque Dom Antônio Reis.
Santa Maria – RS. CEP: 97065-290.

Telefone: 55- 99484920

E-mail: liciacogo@hotmail.com

Fonte de auxílio: CAPES

Declaro não existir conflito de interesse neste manuscrito.

Resumo

O sistema vestibular é responsável pelo equilíbrio corporal. Existem substâncias que o danificam, causando tontura. Estas são chamadas vestibulotóxicas. Os agrotóxicos tornaram-se objeto de investigação da ototoxicidade a partir de pesquisas que apontaram a tontura como um sintoma recorrente entre as queixas de produtores rurais. O objetivo constitui-se em avaliar a histopatologia do sistema vestibular de cobaias expostas a organofosforados, identificando os efeitos destes compostos nesse sistema. O estudo é do tipo experimental. Foram utilizadas 18 cobaias, sendo seis intoxicadas com organofosforado clorpirifós nas doses de 0,5 mg/kg/dia; sete na dose de 1mg/kg/dia, e grupo controle composto por cinco cobaias expostas a água destilada, durante 10 dias consecutivos. Posteriormente realizou-se a contagem dos tufo ciliares nas máculas dos sáculos e utrículos através Microscopia Eletrônica de Varredura. Na comparação dos dados intergrupos, para a variável sáculo realizou-se o Teste ANOVA *one-way* que resultou em $p= 0,0569$; já para a variável utrículo, utilizou-se o Teste Kruskal-Wallis, que apresentou como resultado $p= 0,8958$, revelando não haver diferença entre os grupos em ambas as variáveis. Conclui-se que a análise histopatológica do sistema vestibular de cobaias expostas agudamente ao agrotóxico organofosforado não demonstrou diferença para a quantidade de tufo ciliares nas máculas dos sáculos e utrículos nas doses testadas neste experimento.

Palavras-chave: Equilíbrio Postural. Sistema Vestibular. Inseticida Organofosforado. Praguicida. Toxicidade.

Abstract

The vestibular system is responsible for body balance. There are substances that damage, causing dizziness. These are called vestibulotoxics. Pesticides have become the object of investigation of ototoxicity from research that showed dizziness as a symptom of recurrent complaints among farmers. The objective is to evaluate the histopathology in vestibular system of guinea pigs exposed to organophosphates, identifying the effects of these compounds in this system. The study is the experimental type. 18 guinea pigs were used, six organophosphate intoxicated with chlorpyrifos at doses of 0.5 mg / kg / day seven dose of 1mg/kg/day and control group of five guinea pigs exposed to distilled water for 10 consecutive days. Later there was the counting of ciliary tufts in macules of saccules and utricles by Scanning Electron Microscopy. In intergroup comparison of data for the variable saccule held the one-way ANOVA test resulted in $p = 0,0569$, whereas for the variable utricle, we used the Kruskal-Wallis test, showed that as a result $p = 0,8958$, revealed no differences between groups in both variables. It is concluded that the histopathologic analysis of the vestibular system of guinea pigs acutely exposed to organophosphate pesticides showed no difference in the amount of the ciliary tufts macules saccules and utricles of the doses tested in this experiment.

Key-words: Postural Balance. Vestibular System. Insecticide Organophosphate. Pesticides.Toxicity.

Introdução

O sistema vestibular é constituído por três partes principais: um sistema sensorial periférico, um processador central e um mecanismo de resposta motora. O sistema sensorial periférico é composto de um conjunto de sensores do movimento, os quais enviam informações ao sistema nervoso central (SNC). O SNC é responsável pelo processamento desses sinais e os combina com outras informações sensoriais, para estimar a orientação cefálica (HERDMAN, 2002).

Este sistema periférico é composto de um labirinto ósseo e um labirinto membranoso (GUYTON, 1992). O componente membranoso é a parte funcional do sistema, que detecta as sensações de equilíbrio. Esta contém três canais semicirculares, sáculo e utrículo, constituindo os órgãos sensoriais vestibulares (MARTIN, 1998).

As células receptoras vestibulares estão localizadas em regiões dos canais semicirculares, denominadas ampolas, já no sáculo e no utrículo são chamadas de máculas. Estas células são sensores biológicos, que convertem o deslocamento provocado pelo movimento cefálico em uma descarga neural (HERDMAN, 2002). Contudo, estas propriedades mecânicas do labirinto vestibular conferem aos receptores a sensação de movimento. As células ciliadas do utrículo e do sáculo registram o movimento linear. Estes órgãos possuem um revestimento gelatinoso sobre as células sensoriais das suas máculas, com cristais de carbonato de cálcio embebidos na superfície do material gelatinoso, estes repousam sobre os estereocílios das células sensoriais. Esta gelatina sofre uma deformação causada pelos movimentos da cabeça, que acabam desviando os estereocílios (MARTIN, 1998).

O equilíbrio corporal, pelo qual o sistema vestibular é um dos responsáveis, é uma complexa interação entre o sensorial e o motor, que nos previne de quedas, permite-nos adotar posturas e realizar movimentos com harmonia (GANANÇA, MUNHOZ, CAOVIALLA, SILVA, 2000). Quando ocorre uma alteração vestibular, ocorrem sintomas de desequilíbrio, que entre outros, a tontura é o mais comum e o que mais afeta a qualidade de vida do indivíduo (POPPER, 2001).

Existem substâncias que tem a capacidade de danificar ou perturbar o sistema vestibular, causando tontura. Tais substâncias que influenciam negativamente o sistema, ocasionando perda da função vestibular ou lesão celular

na orelha interna são chamadas de ototóxicas ou vestibulotóxicas (JOHNSON, 1993). O grau com que esta substância vai influenciar no indivíduo depende da predisposição individual, da dose administrada, do tempo de duração, da via de administração, da idade, da tendência familiar e/ou de eventual dano prévio à orelha interna (ZOCOLI, REICHOW, ZOCOLI, 2003).

Diversas substâncias ototóxicas vêm sendo estudadas dentre elas antibióticos aminoglicosídeos, aspartame, ácido salicílico, medicações oncológicas, agrotóxicos entre outros.

Os agrotóxicos tornaram-se objeto de investigação na linha de ototoxicidade a partir de pesquisas realizadas com produtores rurais, que apontaram a tontura e/ou vertigem como sendo um sintoma recorrente entre as queixas desta população (DICK, STEENLAND, KRIEG, HINES, 2001; ARAÚJO et al., 2007; HOSHINO et al., 2008; FARIA, ROSA, FACCHINI, 2009).

As pesquisas com seres humanos permitem-nos identificar os sintomas, porém não nos permitem avaliar o impacto morfológico que estes sintomas causam no sistema vestibular do indivíduo. Por isso o objetivo desta pesquisa constitui-se em analisar a histopatologia do sistema vestibular de cobaias expostas a organofosforados, identificando os efeitos destes compostos nesse sistema.

Materiais e Métodos

Esta pesquisa foi submetida à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, aprovada sob protocolo número 135/2011 (Anexo 1) e esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

No presente estudo foram utilizadas dezoito cobaias albinas adultas, machos, da espécie *Cavia porcellus* selecionadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, com peso entre 300 e 500 gramas. Foram incluídas no estudo as que apresentaram Reflexo de Preyer presente, reflexo este, avaliado por observação de pequenos movimentos de contratura do pavilhão auricular da cobaia, quando a mesma é estimulada com sons de pequena e média intensidade. Tal reflexo é utilizado para avaliar a função auditiva em roedores (JERO, COLING, LALWANI, 2001). Na seleção inicial, as cobaias foram avaliadas e

submetidas à otoscopia manual. Não foram incluídas no experimento aquelas, que apresentaram sinais de otite externa e/ou média e perfuração timpânica.

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em gaiolas coletivas separadas de acordo com o grupo experimental, com maravalha, em regime claro/escuro de 12 horas, ração própria e água *ad libitum*.

Para realização do estudo as cobaias foram divididas em três grupos, sendo o grupo I o controle;

-Grupo I: cinco cobaias, com administração de água destilada intraperitoneal em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de agrotóxico para o peso da cobaia, durante 10 dias.

-Grupo II: seis cobaias, com administração intraperitoneal de agrotóxico na dose única diária de 0,5 mg/kg/dia, durante 10 dias consecutivos.

-Grupo III: sete cobaias, com administração intraperitoneal de agrotóxico na dose única diária de 1mg/kg/dia, durante 10 dias consecutivos.

As dezoito cobaias, totalizavam trinta e seis orelhas, considerando-se trinta e seis sáculos e trinta e seis utrículos.

O número de cobaias por grupo foi definido de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009) para realização de estudos toxicológicos, sendo o mínimo de cinco animais para cada dose testada no experimento.

O modelo experimental escolhido foi cobaia albina, pois segundo estudo de Albuquerque et al. (2009) este modelo mostrou-se o melhor animal na etapa de microdissecção em comparação com o rato. As vantagens deste modelo estão no tamanho e rigidez do osso temporal que permite uma maior facilidade para a retirada do material anatômico para análise.

Para a intoxicação das cobaias, foi administrado o agrotóxico organofosforado Pyrinex 480 CE®, comercializado pela Milenia Agrociências S/A. O Pyrinex 480 EC® é um inseticida organofosforado com ação de contato e ingestão, recomendado para o controle de pragas nas culturas de algodão, batata, café, citros, feijão, maçã, milho, soja, tomate rasteiro para fins industriais e trigo. O produto está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 09298.

A dose do agrotóxico escolhido foi baseada na DL 50 oral para ratos do Pyrinex 480 CE®, encontrada na bula do produto, que é de 300 mg/Kg e considerou as normas da ANVISA de não exceder 80% da DL 50. As cobaias tiveram seu peso controlado diariamente para o cálculo adequado da dose do agrotóxico a ser utilizada.

Para o manejo das cobaias e administração do agrotóxico foram utilizados os equipamentos de proteção individual recomendados na bula do produto.

Após 24 horas da última administração do agrotóxico os animais foram anestesiados com Tionembutal (25 mg/kg) na dose 6 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal e eutanasiados pelo método de decapitação. Imediatamente após o sacrifício do animal, os ossos temporais contendo as bulas timpânicas foram removidos. As bulas timpânicas foram abertas e removeram-se os órgãos vestibulares.

Posteriormente a eutanásia dos animais, para dissecação microscópica, as peças anatômicas foram perfundidas com solução de fixação de glutaraldeído a 3% a 4°C e mantidas na solução por 24 horas. Através da janela redonda foi injetada, para fixação, uma solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M, pH = 7,4, por 4 horas a 4°C, lavadas três vezes por cinco minutos com o mesmo tampão. Em seguida, foram fixadas com tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a 4°C e a seguir submetidas à desidratação.

A desidratação das estruturas foi realizada com banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e 95% durante 10 minutos cada em temperatura ambiente. A seguir utilizou-se etanol a 100% em três banhos de 20 minutos cada, deixando-se as estruturas imersas no último banho à temperatura ambiente por 12 horas. A secagem da água ainda presente nas amostras, após desidratação, foi realizada utilizando-se o equipamento BAL-TEC – CPD 030 – *Critical Point Dryer* (Balzers, 40 Liechtenstein), através do processo de ponto crítico, sendo as amostras transferidas para a câmara do aparelho e recobertas por dióxido de carbono (CO₂) líquido.

Para a adequada observação à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as peças dissecadas e parcialmente preparadas foram fixadas em um porta-espécime cilíndrico de metal com pasta condutiva de carbono, *Colloidal Graphite* (*Electron Microscopy Sciences* – Hatfield, PA). As estruturas foram cobertas por uma camada fina de ouro 24 quilates, através do processo de vaporização com o

equipamento BAL-TEC – SCD 050 – *Sputter Coater* (Balzers, Liechtenstein), tornando-se eletricamente condutivas.

A análise morfológica das estruturas vestibulares foi realizada através da Microscopia Eletrônica de Varredura no microscópio eletrônico JEOL *Scanning Electron Microscope* - JSM 5200. Procedeu-se o registro fotográfico das imagens com aumento de 3.500 vezes. Após o registro fotográfico as fotografias foram transferidas para o *software* IMAGE J®, para que se processasse a avaliação.

Realizou-se uma avaliação microscópica dos tufo ciliares das máculas do sáculo e do utrículo, bilateralmente para cada animal incluso no experimento. Esta avaliação se deu por meio da contagem do número de tufo ciliares na região da estriola presentes por campo fotográfico. O aumento de 3.500 vezes foi padronizado para todas as fotografias.

Para a análise estatística foi obtida a média ponderada do número de tufo de estereocílios presentes em cada orelha. Os órgãos vestibulares, que apresentaram à MEV artefatos que pudessem interferir na contagem dos tufo ciliares, como lesões das estruturas durante a dissecação ou montagem do material, foram excluídos do estudo.

Os dados encontrados foram tratados estatisticamente através do programa *Statística*, versão 9.0, considerando-se um nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi testada pelo Teste de Lilliefors. Foi realizada a análise descritiva dos dados. Conforme o resultado do teste de normalidade, os dados normais foram comparados entre grupos pelo Teste ANOVA one-way e os dados não-normais foram comparados através do Teste Kruskal-Wallis.

Resultados

Ao final das análises, perderam-se seis sáculos e três utrículos, os quais foram considerados nos itens “n” das tabelas.

O Teste de Lilliefors acusou normalidade para os dados da variável sáculo e não-normalidade para a variável utrículo. Foi realizada a análise descritiva dos dados para o número de tufo ciliares do sáculo e utrículo nos grupos I, II e III, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação dos valores médios do número de tufo ciliares do sáculo e do utrículo entre os Grupos I, II e III (*)

Grupo	Média	Mínimo	Máximo
G I			
Sáculo (n = 9)	25,44±6,50	14,00	35,00
Utrículo (n = 10)	24,86±3,51	17,00	28,00
G II			
Sáculo (n = 9)	26,70±5,54	20,00	38,00
Utrículo (n = 11)	26,45±4,50	18,00	34,00
G III			
Sáculo (n = 12)	31,41±5,35	22,50	42,00
Utrículo (n = 12)	27,97±3,77	23,66	37,50

(*) Os dados foram apresentados como a média ± desvio padrão
n – número de sáculo e de utrículo

Para comparar os dados intergrupos, para a variável sáculo foi realizado o Teste ANOVA *one-way* que resultou em $p= 0,0569$, demonstrando não haver diferença entre os valores dos grupos I, II e III para a variável testada. Já para a variável utrículo, a comparação entre os grupos foi analisada através do Teste Kruskal-Wallis, que apresentou como resultado $p= 0,8958$, revelando não haver diferença entre os grupos.

Os resultados dos testes comparativos entre o grupo controle e as diferentes doses de agrotóxico organofosforado testadas não causaram danos histopatológicos as células ciliadas do sáculo e do utrículo das cobaias envolvidas neste estudo, durante o período de dez dias, quando analisadas pela MEV.

Discussão

A média do grupo I foi menor do que os demais, mas não é possível afirmar que houve diferença significativa entre os grupos, pois as médias dos grupos II e III estão de acordo com os valores médios encontradas por outros autores, que realizaram MEV em cobaias, utilizando em seus grupos controles água destilada

durante 30 dias, e outro soro fisiológico durante 10 dias (SILVEIRA, 2011; MARQUEZINI, 2011).

Os resultados da presente pesquisa não evidenciaram diferença estatística significativa entre o número de tufos ciliares dos grupos de cobaias intoxicadas com as diferentes doses de organofosforado. Isto vai de encontro aos resultados de outros pesquisadores, que avaliaram o sistema vestibular de cobaias intoxicadas por organofosforados durante sete dias, nas doses de 0,3 e 3mg/kg/dia, e que encontraram alterações ciliares nos sáculos e utrículos (KÖRBES, SILVEIRA, HYPPOLITO, 2010). Convém ressaltar que a referida pesquisa utilizou doses e princípio ativo diferentes da atual.

Os danos morfológicos em animais exposto a organofosforados vem sendo amplamente pesquisados. Estudo que avaliou de forma aguda os efeitos de um organofosforado no sistema nervoso observou alteração estrutural no cerebelo, caracterizada por apoptose nas células de Purkinje e dano estrutural ao citoesqueleto dos animais sobreviventes (QUILODRÁN, MIRANDA, JIMÉNEZ, 2006). Em pesquisa que avaliou os efeitos crônicos no SNC de animais intoxicados por organofosforado, foi observada a hipertrofia da camada molecular do córtex cerebral, e que pode levar à perda ou afinamento das ramificações neurais (PELEGRINO et al., 2006; PEREZ et al., 2006), porém este não foi objetivo de nossa pesquisa, que avaliou tufos ciliares em células sensoriais das máculas do sáculo e utrículo.

Pesquisa realizada com trabalhadores rurais, que entraram em contato com organofosforado clorpirifós e posteriormente realizaram testes para avaliação sensório-motora, demonstraram alterações principalmente nas medidas de oscilação postural com os olhos fechados e em superfície macia. Este resultado sugere um efeito subclínico envolvendo os sistemas proprioceptivo e vestibular (HOSHINO et al., 2008).

Avaliação funcional através da Vectoeletronistagmografia de trabalhadores expostos a organofosforados revelou que a grande maioria dos sujeitos apresentou alteração do tipo Disfunção Vestibular Periférica Irritativa (ARAÚJO et al., 2007) . Isto evidencia que o agrotóxico organofosforado tem potencial neuro-ototóxico, porém não se pode ainda afirmar qual a dose e o tempo de exposição seguros para estes compostos não causarem danos à saúde.

Estudos funcionais comprovam que a intoxicação por agrotóxico causa tontura e/ou vertigem em trabalhadores expostos a estes compostos (DICK, STEENLAND, KRIEG, HINES, 2001; HOSHINO et al., 2008), porém ainda não foi possível elucidar a origem morfológica específica deste sintoma, nem mesmo se existe uma causa única ou esta seria multifatorial.

Ainda são necessários estudos que possam determinar as doses e tempo de exposição seguros para os agrotóxicos organofosforados. Portanto, vale ressaltar que em qualquer dose a ser utilizada e em eventual contato com estes compostos utilize-se os equipamentos de proteção individual indicados para tal.

Conclusão

A análise histopatológica do sistema vestibular de cobaias expostas de forma aguda ao agrotóxico organofosforado não demonstrou diferença para a quantidade de tufo ciliares nas máculas dos sáculos e dos utrículos nas doses testadas neste experimento.

Agradecimentos

Agradecemos às equipes do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo pela colaboração nesta pesquisa e a Capes pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

ALBUQUERQUE, A. A. S.; ROSSATO, M.; OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M.A. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. **Rev. Bras. Otorrinolaringologia**. São Paulo, vol.75 nº.1, Jan./Fev. 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Metodologias utilizadas para a realização de estudos toxicológicos. Brasília, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br.

ARAÚJO, A.J.et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciênc. saúde coletiva**. Rio de Janeiro, vol.12 nº.1, Jan./Mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141381232007000100015&script=sci_arttext>.

DICK, R.B.; STEENLAND, K.; KRIEG, E.F.; HINES, C.J. Evaluation of acute sensory-motor effects and test sensitivity using termiticide workers exposed to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and Teratology**. Vol. 23, issue 4, July-August 2001, Pages 381-393. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>.

FARIA, N.M.X.; ROSA, J.A.R.; FACCHINI, L.A. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, vol.43 no.2, Apr. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/2009nahead/7200.pdf>>.

GANANÇA, M. M.; MUNHOZ, M. S. L.; CAOVIALLA, H. H.; SILVA, M. L. G. **Estratégias Terapêuticas em Otoneurologia**. Volume 4. São Paulo: Atheneu, 2000.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 583-548.

HERDMAN, S. J. **Reabilitação Vestibular**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2002. p. 3-24.

HOSHINO, A. C. H. et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** São Paulo, vol.74 no.6, Nov./Dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003472992008000600015>

JERO, J.; COLING, D. E.; LALWANI, A. K. The use of Preyer's reflex in evaluation of hearing in mice. **Acta Otolaryngol.** 121(5): 585-589, 2001.

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

KÖRBES, D.; SILVEIRA, A. F.; HYPOLITO, M. A.; MUNARO, G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2010;76(2):238-44.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942010000200015>.

MARQUEZINI, R. M. S. **Ototoxicidade vestibular provocada pelo uso sistêmico de aminoglicosídeos em cobaias** [Dissertação]. Mestrado em Ciências Médicas. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.

MARTIN, J.H. **Neuroanatomia**: Texto e atlas. 2º ed. Artes Médicas: Porto Alegre, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.

PELEGRINO, J.R.; CALORE, E.E.; SALDIVA, P.H.N.; ALMDEIDA, V.F.; PERES, N.M.; VLILELA-DE-ALMEIDA, L. Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2006;64(2):251-5.

PEREZ, N. M.; CALORE, E. E.; VILELA-DE-ALMEIDA, L.; NARCISO, E. S.; PUGA, F. R. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** 2006;65(1):50-3.

POPPER, V.M.; **A Reabilitação Vestibular na Vertigem.** Monografia (Especialização em Audiologia Clínica).CEFAC. Itajaí, 2001.

QUILODRÁN, J.; MIRANDA, J. P.; JIMÉNEZ, L. Efecto del agropesticida Cipermetrina en dosis única intraperitoneal sobre el cerebelo del ratón. **Int. J. Morphol.** 2006;24:5-113.

SILVEIRA, S. C. R. **Estreptomicina – ototoxicidade e autoproteção** [Tese]. Doutorado em Ciências Médicas. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.

ZOCOLI, R.; REICHOW, S.L.; ZOCOLI, A. M. F. Emissões otoacústicas x cisplatina: detecção precoce da ototoxicidade em pacientes oncológicos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** 2003, 69 (2): 222-225.

5 DISCUSSÃO GERAL

Pesquisadores advertem que a grande maioria dos acidentes graves e fatais causados por agrotóxicos, incluindo a exposição acidental, profissional e a ingestão em caso de suicídio é devida aos inseticidas OF e carbamatos altamente tóxicos (MORAES, 1999; MENDES, 1995).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o impacto do uso de agrotóxicos OF na saúde humana. Tais estudos utilizaram como metodologia a entrevista com trabalhadores rurais expostos a estes compostos (ARAÚJO, 2007; AZEVEDO, 2009; FARIA et al., 2009; HOSHINO et al., 2009; LISBOA et al., 2007; MAGALHÃES, 2010; MANJABOSCO et al., 2004; SOUZA, 2011). Os resultados mostraram a tontura, como sendo um sintoma recorrente referido por esses trabalhadores. Porém no presente estudo não se encontrou diferença significativa entre as cobaias intoxicadas e as não intoxicadas.

Ainda com a ressalva, de que a entrevista com trabalhadores é uma avaliação subjetiva e, portanto, não possui a mesma confiabilidade do exame funcional realizado neste estudo. Exame este, que confere um resultado mensurável do efeito causado pela exposição à substância em questão. Em contraponto com esta pesquisa, os estudos referidos avaliam os sintomas crônicos, enquanto a amostra dessa pesquisa foi exposta por um período breve, onde se avaliou o efeito agudo e em animais.

Os resultados da presente pesquisa não mostraram diferença estatística significativa nas variáveis pesquisadas. Isto está em desacordo com outros pesquisadores que encontraram alterações funcionais em testes sensório-motores como mudança na medida de oscilação postural com olhos fechados e em superfície macia em trabalhadores rurais que entraram em contato com OF clorpirifós. Tal achado sugere efeito subclínico do agrotóxico nos sistemas vestibular e proprioceptivo (HOSHINO, 2008). Também discorda da pesquisa, que analisou a Vectoeletronistagmografia de trabalhadores expostos a OF cronicamente, que encontraram alterações em 50 % dos casos analisados; estas alterações traduziram-se em hiperreflexia na prova calórica da VENG, entretanto, aqui avaliamos os efeitos agudos de um organofosforado (DICK et al., 2001).

Isto evidencia que o agrotóxico organofosforado tem potencial neurotótico, porém não se pode ainda afirmar qual a dose e o tempo de exposição

seguros para estes compostos não causarem danos à saúde, o que vem de encontro aos limiares de doses, aqui testadas e que não mostraram diferença estatística significativa.

O estudo com trabalhadores rurais expostos de forma aguda torna-se difícil, já que a grande maioria destes sujeitos esteve anteriormente exposta a estas substâncias por longos períodos. Outra limitante do estudo com seres humanos é de que raramente os mesmos estão expostos a um só agente, o que dificulta a avaliação dos efeitos específicos de um único tipo de princípio ativo, o que justifica a utilização de animais de laboratório de forma experimental.

Ainda os achados dessa pesquisa são similares àqueles encontrados em pesquisa realizada na China, país de forte produção agrícola, que utilizou como amostra 301 crianças com idade entre 23-25 meses expostas a OF. Neste estudo evidenciou-se a presença de altos níveis de metabólitos OF nos testes de urina, porém não encontrou relação entre este dado e os níveis de desenvolvimento infantil (GUADONG et al., 2012). Este fato reforça a ideia de que mesmo na presença do composto no organismo, muitas vezes não encontramos correlação funcional com este achado.

Exposições agudas a organofosforados podem não ser capazes de representar alterações em exames funcionais, como mostra o estudo que avaliou os efeitos destes compostos no sistema auditivo de cobaias, com alterações nas células ciliadas externas da cóclea pós-intoxicação aguda por OF, porém esta lesão morfológica não se traduziu em alteração funcional no sistema auditivo periférico das cobaias avaliadas pelos testes de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (KÖRBES, 2009). No entanto, nessa pesquisa que objetivou avaliar os tufo ciliares nas máculas das células sensoriais, estas não mostraram alterações morfológicas pela MEV e nem funcionais através da ENG. Todavia, as doses e princípio ativo foram diferentes, apesar de ser um composto da classe dos organofosforados.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram que a média do grupo I foi menor do que os demais com relação a variável número de tufo ciliares, mas não é possível afirmar, que houve diferença entre os grupos, pois as médias dos grupos II e III estão de acordo com as médias encontradas por outros autores que realizaram MEV em cobaias, utilizando em seus grupos controles água destilada durante 30 dias e soro fisiológico durante 10 dias (SILVEIRA, 2011; MARQUEZINI, 2011).

Os resultados da presente pesquisa, que não evidenciaram diferença estatística significativa entre o número de tufos ciliares dos grupos de cobaias intoxicadas com as diferentes doses de organofosforado, vão de encontro aos resultados de outros pesquisadores que avaliaram o sistema vestibular de cobaias intoxicadas por organofosforados durante 7 dias, nas doses de 0,3 e 3mg/kg/dia, os quais encontraram alterações ciliares nos sáculos e utrículos (KÖRBES et al., 2010). Convém ressaltar que tal pesquisa utilizou doses e princípio ativo diferentes da atual.

Estudos funcionais comprovam que a intoxicação por agrotóxico causa tontura e/ou vertigem em trabalhadores expostos a estes compostos (DICK et al., 2001; HOSHINO, 2008), porém ainda não foi possível elucidar a origem morfológica específica deste sintoma, nem mesmo se existe uma causa única ou esta seria multifatorial.

Os danos morfológicos em animais exposto a organofosforados vem sendo amplamente pesquisados. Estudo que avaliou de forma aguda os efeitos de um organofosforado no sistema nervoso observou alteração estrutural no cerebelo, caracterizada por apoptose nas células de Purkinge e dano estrutural ao citoesqueleto dos animais sobreviventes (QUILODRÁN et al., 2006). Em pesquisa que avaliou os efeitos crônicos no SNC de animais intoxicados por organofosforado, foi observada a hipertrofia da camada molecular do córtex cerebral, e que pode levar à perda ou afinamento das ramificações neurais (PELEGRINO et al., 2006; PEREZ et al., 2006), dados estes, que reforçam e justificam os objetivos da presente pesquisa em avaliar possíveis injúrias celulares, embora em locais diferentes como nas máculas dos sáculos e utrículos.

Ainda são necessários estudos, que possam determinar as doses e tempo de exposição seguros para os agrotóxicos organofosforados. Portanto, vale ressaltar que em qualquer dose a ser utilizada e em eventual contato com estes compostos utilize-se os equipamentos de proteção individual indicados para tal.

O período agudo de exposição e avaliação pode ter sido o fator determinante dos resultados não significativos neste estudo, apontando para a necessidade de se realizar estudos com diferentes doses e por um período de tempo mais prolongado para que se possa determinar com maior segurança a utilização desta substância.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se com este estudo que o organofosforado clorpirifós nas doses testadas de 0,5mg/kg/dia e 1mg/kg/dia não teve influência no sistema vestibular das cobaias intoxicadas de forma aguda durante 10 dias, pois os resultados da avaliação funcional através da eletronistagmografia e da avaliação morfológica por microscopia eletrônica de varredura não demonstraram diferença para a frequência de aparecimento de nistagmos, VACL, e para o número tufo ciliares nas máculas dos sáculos e utrículos, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, A.K.; BERGMAN, R.A. **Neuroanatomia Funcional**: texto e atlas. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2008.p. 354.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Metodologias utilizadas para a realização de estudos toxicológicos. Brasília, 2009. Disponível em: www.anvisa.gov.br.

ARAÚJO, A.J.et al. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciênc. saúde coletiva**. Rio de Janeiro, vol.12 nº.1, Jan./Mar.2007. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141381232007000100015&script=sci_artt_ext>.

AZEVEDO, K. A. A. **Neurotoxicidade perinatal por cádmio em ratos Wistar e interação com clorpirifós**. Tese de doutorado em Clínica Veterinária. UNESP, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS B. W.; PARADISO, M.A. **Neurociências Desvendando Sistema Nervoso**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 350-395.
BRASIL. Decreto Nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>.

BRASIL. Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>.

BULA PYRINEX 480 EC. Disponível em: <http://www.seab.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/PYRINEX_480_EC.pdf>.

DICK, R.B.; STEENLAND, K.; KRIEG, E.F.; HINES, C.J. Evaluation of acute sensory–motor effects and test sensitivity using termiticide workers exposed to chlorpyrifos. **Neurotoxicology and Teratology**. Vol. 23, issue 4, July-August 2001, Pages 381-393. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Normas gerais sobre o uso de agrotóxicos. Sistemas de Produção, no. 7 setembro 2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/normas_gerais_uso_agrotoxicos.htm>.

ENDERLE, M.S. **Abordagem Fisioterapêutica na reabilitação Vestibular**. Monografia (Curso de Fisioterapia) – UNIOESTE – Cascavel, 2004.

FARIA, N.M.X.; ROSA, J.A.R.; FACCHINI, L.A. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, vol.43 no.2, Apr. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/2009nahead/7200.pdf>>.

GANANÇA, M. M.; VIEIRA, R. M.; CAOVIILLA, H. H. **Princípios de Otoneurologia**. Volume 1. São Paulo: Atheneu, 1998. p.1-3, 23-43.

GANANÇA, M. M.; MUNHOZ, M. S. L.; CAOVIILLA, H. H.; SILVA, M. L. G. **Estratégias Terapêuticas em Otoneurologia**. Volume 4. São Paulo: Atheneu, 2000.

GONÇALVES, G.M.S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente na etnia Xukuru do Ororubá – Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) -Fundação Oswaldo Cruz. Centro de pesquisas Aggeu Magalhães. Recife, 2008.

GUAZZELLI, M.J. **Brasil: o maior consumidor de agrotóxicos**. [Entrevista concedida IHU On-line. Instituto HumanitasUnisinos – IHU, da Universidade do Vale do Rio dos Sinos –Unisinos, em São Leopoldo, RS]. Junho, 2009. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2009/06/09/brasil-o-maior-consumidor-de-agrotoxicos-entrevista-especial-com-maria-jose-quazzelli>>.

GUODONG, D.; PEI, W.; YING, T.; JUN, Z.; YU, G.; XIAOJIN, W.; et al. Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Shanghai children. **Environ.Sci. Technol.** Mar, 2012; 46(5): 2911-7.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 583-548.

HERDMAN, S. J. **Reabilitação Vestibular**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2002. p. 3-24.

HOSHINO, A.C.H. et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** São Paulo, vol.74 no.6 , Nov./Dez. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003472992008000600015>

HOSHINO, A.C.H. et al. A auto-percepção da saúde auditiva e vestibular de trabalhadores expostos a organofosforados. **Rev. CEFAC.** 2009 Out-Dez; 11(4):681-687. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-18462009000800017&script=sci_abstract&tlng=pt.

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

KÖRBES, D.; SILVEIRA, A.F.; HYPOLITO, M.A.; MUNARO, G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. **Braz J Otorhinolaryngol.** 2010;76(2):238-44. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942010000200015>.

LISBOA, R.; SENA, J.; DUTRA, T. **Uso de agrotóxicos na produção de hortaliças da Bacia Hidrográfica do Natuba, afluente do Tapacurá – PE e consequências sobre o meio ambiente e saúde dos agricultores.** Artigo apresentado no II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa, PB, 2007.

LOPES, K.C. et al. Manifestações Otoneurológicas do Acidente Vascular de Tronco Encefálico. O que o Otorrinolaringologista precisa saber? **Acta ORL.** São Paulo, v.26 n.2, p. 89-93, Abr/Mai/Jun – 2008. Disponível em: <http://www.actaorl.com.br/detalhe_artigo.asp?id=242>.

MAGALHÃES, M.A.S. **Exposição A Agrotóxicos Na Atividade Agrícola: Um Estudo De Percepção De Riscos Á Saúde Dos Trabalhadores Rurais No Distrito De Pau Ferro – Salgueiro – PE.** (Dissertação). Mestrado Profissional em Saúde Pública do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães. Recife: Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

MANJABOSCO, C. W.; MORATA, T. C.; MARQUES, J. M. Perfil Audiométrico de Trabalhadores Agrícolas. **Arq. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.8, n.4, p. 285-295, 2004. Disponível em: <http://www.arquivosdeorl.org.br/conteudo/acervo_port.asp?id=293>.

Manual de Diagnóstico e Tratamento em Acidentes com Agrotóxicos – CIT/RS, 2000.

MARQUEZINI, R.M.S. **Ototoxicidade vestibular provocada pelo uso sistêmico de aminoglicosídeos em cobaias** [Dissertação]. Mestrado em Ciências Médicas. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.

MARTIN, J.H. **Neuroanatomia**: Texto e atlas. 2º ed. Artes Médicas: Porto Alegre, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.

MORAES, A.C.L. **Contribuição para o estudo da intoxicação humana por carbamatos: o problema do “chumbinho” no Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - FIOCRUZ, 1999.

MENDES, R. **Patologia do Trabalho**. Rio de Janeiro: Athneu, 1995, p. 504.

MOR, R.; FRAGOSO, M. **Vestibulometria na prática fonoaudiológica**. Pulso Editorial: São Paulo, 2012.

MUNARO, G.; SLEIFER, P.; PEDROSO, F. S. Análise da influência do nistagmo espontâneo e pré-calórico na Vectoeletronistagmografia. **Rev. CEFAC**. Vol.11. nº. 2. São Paulo, Apr./Jun. 2009. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151618462009000200019>.

NISHIDA, S. M. Curso de Fisiologia. Ciclo de Neurofisiologia. Departamento de Fisiologia, IB. Unesp-Botucatu, 2012.

OLIVEIRA, J. A. A; CICILINI, G. A.; SOUZA, M. L.; ANDRADE, M. H. Efeitos do ácido etacrínico sobre o sistema vestibular. **Rev. Bras. de Otorrinolaringol.** Jan./Abr. 1979; 45(1), p. 8-16.

PELEGRINO, J.R.; CALORE, E.E.; SALDIVA, P.H.N.; ALMDEIDA, V.F.; PERES, N.M.; VLILELA-DE-ALMEIDA, L. Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 2006;64(2):251-5.

PEREZ, N.M.; CALORE, E.E.; VILELA-DE-ALMEIDA, L.; NARCISO, E.S.; PUGA, F.R. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**. 2006;65(1):50-3.

PESSÔA, K.S. **Avaliação Otoneurológica**. Monografia (Especialização em Audiologia Clínica) – CEFAC. Rio de Janeiro, 1999.

POPPER, V.M.; A **Reabilitação Vestibular na Vertigem**. Monografia (Especialização em Audiologia Clínica).CEFAC. Itajaí, 2001.

QIAO, D.; SEIDLER, F. J.; PADILLA, S.; SLOTKIN, T. A. Developmental Neurotoxicity of Chlorpyrifos: What Is the Vulnerable Period? **Environmental Health Perspectives**.Vol.110 nº 11Nov., 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241065/>>.

QUILODRÁN, J.; MIRANDA, J.P.; JIMÉNEZ, L. Efecto del agropesticida Cipermetrina en dosis única intraperitoneal sobre el cerebelo del ratón. **Int. J. Morphol.**2006;24:5-113.

SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural.**Ciência e Saúde Coletiva**, 10(4):891-903, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.phpscript=sci_arttext&pid=S141381232005000400013.

SILVEIRA, S.C.R. **Estreptomicina – ototoxicidade e autoproteção** [Tese]. Doutorado em Ciências Médicas. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2011.

SINITOX - Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas, 2009. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>.

SOUZA, J.L.N.C. **O uso de agrotóxicos entre produtores de hortaliças na localidade rural de Passo do Vigário, Viamão/RS** (Trabalho de Conclusão de Curso). Graduação Tecnológico em Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural – PLAGEDER da Faculdade de Ciências Econômicas Balneário Pinhal: UFRGS, 2011.

TEIXEIRA, C.F.; AUGUSTO, L.G.S.; MORATA, T.C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Rev. Saúde Pública**.2003;37(4):417-23.Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/rsp/v37n4/16775.pdf>>.

ZEIGELBOIM, B. S.et al.Avaliação vestibular em crianças com distúrbio de aprendizagem.Pediatria Moderna. Nº 5. Set/Out,2006. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=3429>.

ANEXOS

Anexo A**Comprovante de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 135/2011, sobre o projeto intitulado “*A influência do organofosforado clorpirifós no sistema vestibular*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Miguel Ângelo Hyppolito** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *ad referendum* no dia 08 de novembro de 2011.

(We certify that the protocol nº 135/2011, about “*The clorpyrifos in vestibular system*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) *ad referendum* in 11/08/2011.

Ribeirão Preto, 08 de novembro de 2011.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Márcio Dantas', written in a cursive style.

Prof. Dr. Márcio Dantas
*Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal*