

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

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICO  
ORGANOFOSFORADO NO SISTEMA AUDITIVO  
PERIFÉRICO DE COBAIAS: ESTUDO ANATÔMICO E  
FUNCIONAL**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Daiane Körbes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICO ORGANOFOSFORADO NO  
SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO DE COBAIAS:  
ESTUDO ANATÔMICO E FUNCIONAL**

por

**Daiane Körbes**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição, 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

2009

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

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

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICO ORGANOFOSFORADO NO  
SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO DE COBAIAS: ESTUDO  
ANATÔMICO E FUNCIONAL**

elaborada por  
**Daiane Körbes**

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

**Comissão Examinadora:**

---

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

---

**Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito (USP-RP)**  
(Co-Orientador)

---

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

---

**Prof. Dra. Sonia Maria Fighera Bortholuzzi (UFSM)**

Santa Maria, 14 de julho de 2009.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Rogério e Íres*, por sempre me apoiarem e se dedicarem às suas filhas para que elas pudessem realizar seus sonhos, e por serem exemplos de grandes pessoas, com valores éticos e morais e aos quais devo tudo o que sou e tudo o que tenho.

Às minhas irmãs, *Neodete e Lisiane*, por sempre terem acreditado em mim, me incentivando a seguir em frente com confiança nas minhas escolhas, independente dos obstáculos que poderiam surgir durante a caminhada.

Eu amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira*, professor titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria, pela orientação durante a realização deste estudo e pelo incentivo à pesquisa, amizade, ensinamentos e confiança.

Ao *Prof. Dr. Miguel Ângelo Hyppolito*, professor doutor do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela co-orientação deste trabalho, preciosos ensinamentos e exemplo de grande profissional que demonstrou ser, sempre atencioso e paciente.

Às *D<sup>ras</sup> Maristela Júlio Costa e Sonia Maria Fighera Bortholuzzi* pela disponibilidade, interesse e fundamentais considerações para o fechamento do estudo.

À *Maria Rossato*, técnica do Laboratório de Microdissecção do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo auxílio durante toda a minha estadia em Ribeirão Preto, pela dedicação e apoio na parte experimental da pesquisa.

À *Vani Maria Alves Corrêa*, técnica do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular de Bioagentes Patogênicos, pela preparação das doses da droga utilizada durante o experimento.

À *equipe do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental* do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por colocar à disposição o biotério, a área experimental e o laboratório. Em especial, agradeço ao técnico *José Carlos Vanni* e à bioterista *Aline Veneranto* por

todo apoio que me deram durante a fase experimental da pesquisa e pela amizade, prestatividade e exemplo de caráter.

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

Ao estatístico *José Henrique Souza da Silva*, professor titular do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria, pelas sugestões e auxílio na análise dos dados e cálculos estatísticos.

À *José Santos Cruz de Andrade*, pelo auxílio na escrita do texto em inglês e pelas preciosas sugestões. Agradeço ainda pelo estímulo, palavras, carinho e importante apoio recebidos durante a etapa final da preparação da dissertação, tornando meus dias mais leves e felizes.

Aos *Colegas do Mestrado da UFSM*, pela parceria e pelo incentivo. Em especial à amiga *Gisiane Munaro*, pelo companheirismo, risadas e apoio dado em todas as etapas do trabalho.

Aos *amigos que fiz durante minha estada em Ribeirão Preto*, pelas palavras ditas, pelas risadas, pela descontração e por tornarem ainda mais agradável o período que passei nessa cidade.

À *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto* e à *Universidade de São Paulo*, pela oportunidade da realização deste trabalho.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

*“Que o respeito a um órgão tão perfeito – o ouvido humano –  
e a valorização de um dos mais importantes sentidos  
dos quais fomos dotados – a audição – sejam  
um compromisso mais do que momentâneo,  
mas que o assumamos por toda uma vida,  
pois som e audição continuam a ser  
uma das combinações mais belas.”*

*(Russo, 1997)*

## **RESUMO**

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

### **TOXICIDADE DE AGROTÓXICO ORGANOFOSFORADO NO SISTEMA AUDITIVO PERIFÉRICO DE COBAIAS: ESTUDO ANATÔMICO E FUNCIONAL**

AUTORA: DAIANE KÖRBES  
ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA  
CO-ORIENTADOR: MIGUEL ÂNGELO HYPOLITO  
Local e Data: Santa Maria, 14 de julho de 2009

Os agrotóxicos organofosforados são amplamente utilizados na agricultura, e a elevada aplicação desses agentes, sem o emprego das devidas medidas de biossegurança, vem contribuindo para a degradação ambiental e para o aumento da incidência de intoxicação ocupacional, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no meio rural. Pesquisas demonstram que os agentes ototóxicos, além de comprometer os sistemas auditivo e vestibular periféricos, provocam ainda alterações nas vias auditivas centrais. Dentre os principais agentes químicos que podem levar à perda auditiva incluem-se os solventes, os metais, os asfixiantes e os agrotóxicos organofosforados. O objetivo deste estudo foi analisar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados no sistema auditivo periférico. Trata-se de um estudo experimental prospectivo, realizado em cobaias albinas machos, divididas em três grupos, nos quais se administrou água destilada (grupo 1 - controle), agrotóxico - 0,3mg/Kg/dia (grupo 2), agrotóxico - 3 mg/Kg/dia (grupo 3), durante sete dias consecutivos. O agrotóxico utilizado foi Tamaron® (metamidofós). A avaliação auditiva funcional foi realizada utilizando-se Emissões Otoacústicas Produto de Distorção (EOAPD) e Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE), ambos realizados antes e imediatamente após o período de aplicação do agrotóxico. A avaliação anatômica foi realizada com Microscopia Eletrônica de Varredura. As cobaias submetidas ao agrotóxico apresentaram alterações morfológicas cocleares, com lesões nas três espiras analisadas na microscopia eletrônica, intensificadas de acordo com a dosagem recebida do agente. Na avaliação auditiva funcional, todas as cobaias apresentaram EOAPD presentes, no entanto verificou-se significância estatística nos valores da relação sinal/ruído das frequências de 1.500 e 6.000 Hz das EOAPD das cobaias dos grupos 2 e 3 quando confrontados com os achados dos animais do grupo controle, indicando um possível sofrimento celular. Não foram encontradas alterações estatisticamente significantes na avaliação do VIII par craniano por meio da análise da onda I do PEATE. Concluiu-se que o organofosforado pode ser considerado um agente lesivo agudo das células ciliadas externas visto a correlação entre a dosagem aplicada e a quantidade de alterações observadas à microscopia eletrônica, entretanto a exposição aguda ao Tamaron® não causou alteração funcional do sistema auditivo periférico.

Palavras-chave: Organofosforado; Agrotóxico; Ototoxicidade; Emissões Otoacústicas; Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico; Células Ciliadas Externas.



## **ABSTRACT**

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

### **TOXICITY OF AN ORGANOPHOSPHATE PESTICIDE IN THE PERIPHERAL AUDITORY SYSTEM: ANATOMIC AND FUNCTIONAL STUDY**

**AUTHOR: DAIANE KÖRBES**  
**ADVISER: ARON FERREIRA DA SILVEIRA**  
**CO-ADVISER: MIGUEL ÂNGELO HYPPOLITO**  
Local and Date of the Defense: Santa Maria, 14 de julho de 2009

The organophosphate pesticides are widely used in agriculture, and the widespread application of these agents, without the appropriate use of bio-security measures, has contributed to environmental degradation and the increased incidence of occupational poisoning, becoming one of the main public health problems in rural areas. Studies show that the ototoxic agents, in addition to the peripheral vestibular and auditory systems compromise, also impair central auditory pathways. Among the major toxic agents that can lead to hearing loss are the solvents, metals, suffocating and organophosphate pesticides. This study examined the acute ototoxic action of a pesticide on the peripheral auditory system. This is a prospective experimental study. We used male albino guinea pigs, divided into three groups, which was administered distilled water (group 1 - control), pesticide - 0.3 mg/Kg/day (group 2), pesticide - 3 mg/Kg/day (group 3), for seven consecutive days. The pesticide used was Tamaron® (methamidophos). The auditory functional evaluation was performed using the Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAE) and Auditory Brainstem Response (ABR), both performed before and immediately after the application of the pesticide. The anatomical assessment was performed with scanning electron microscopy. The guinea pigs subjected to pesticide had cochlear morphological changes, with lesions in three turns examined in electron microscopy, which was increased according to the dosage received from the agent. In all animals the DPOAE was present, but it was verified that the signal/noise ratio of the frequencies of 1.500 and 6.000 Hz in DPOAE of groups 2 and 3 showed statistically significant difference when compared to control group, indicating possible cell impairment. There were no statistically significant changes in functional assessment of VIII nerve when evaluated by wave I of ABR. It is concluded that the organophosphorous can be considered as a harmful acute agent of outer hair cells, seen the correlation between the dose applied and the amount of changes observed by electron microscopy, however, the acute exposure to Tamaron® did not cause functional alteration of the peripheral auditory system.

**Keywords:** Organophosphate; Pesticide; Ototoxicity; Otoacoustic Emissions; Auditory Brainstem Response; Outer Hair Cells.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de cócleas que evidenciam resultados de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção presentes nos três grupos estudados .....	44
Tabela 2 – Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 2 por frequência.....	48
Tabela 3 – Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 3 por frequência.....	49
Tabela 4– Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas entre as cobaias dos grupos 1 e 2 .....	50
Tabela 5 – Comparação dos valores médios da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas entre as cobaias dos grupos 1 e 3 .....	51
Tabela 6 – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 2 .....	52
Tabela 7 – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 3 .....	52
Tabela 8 – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I entre as cobaias dos grupos 1 e 2 .....	52
Tabela 9 – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I entre as cobaias dos grupos 1 e 3 .....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Criptical Point Dryer BAL-TEC - CPD 030 .....	40
Figura 2 – Sputter Coater BAL-TEC – SCD 050.....	41
Figura 3 – Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – JSM 5200 .....	42
Figura 4– Exemplo de teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção de cobaia do grupo 1.....	44
Figura 5 – Exemplo de teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção de cobaia do grupo 2 pré intoxicação .....	45
Figura 6 – Exemplo de teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção de cobaia do grupo 2 pós intoxicação.....	46
Figura 7 – Exemplo de teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção de cobaia do grupo 3 pré intoxicação .....	46
Figura 8 – Exemplo de teste de Emissões Otoacústicas Produto de Distorção de cobaia do grupo 3 pós intoxicação.....	47
Figura 9 – Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 1 .....	53
Figura 10 – Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 2 pré intoxicação.....	54
Figura 11 – Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 2 pós intoxicação .....	55
Figura 12 – Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 3 pré intoxicação.....	55
Figura 13 – Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 3 pós intoxicação .....	56
Figura 14 – Fotomicrografia do órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1.....	57
Figura 15 – Fotomicrografia do órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1 “em close”.....	57
Figura 16 – Fotomicrografia do órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1 “em panorâmica” .....	58
Figura 17 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 2 mostrando E3 .....	59
Figura 18 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 2 “em close” da E3.....	59
Figura 19 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 3 “em panorâmica” mostrando E2 .....	60
Figura 20 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 3 “em close” da E2.....	61
Figura 21 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 3 “em panorâmica” mostrando E3 .....	61
Figura 22 – Fotomicrografia do órgão de Corti de cobaia do grupo 3 “em close” da E3.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABR</b>	Auditory Brainstem Response
<b>CCE</b>	Célula Ciliada Externa
<b>CCI</b>	Célula Ciliada Interna
<b>CETEA</b>	Comissão de Ética em Experimentação Animal
<b>COBEA</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>DPOAE</b>	Distortion Product Otoacoustic Emission
<b>E2</b>	Espira 2
<b>E3</b>	Espira 3
<b>EOA</b>	Emissões Otoacústicas
<b>EOAPD</b>	Emissões Otoacústicas Evocadas Produto de Distorção
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>et al.</b>	E colaboradores
<b>f(1)</b>	Frequência 1
<b>f(2)</b>	Frequência 2
<b>FMRP</b>	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<b>MAE</b>	Meato Acústico Externo
<b>MEV</b>	Microscópio Eletrônico de Varredura
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p.</b>	Página
<b>PEA</b>	Potencia Evocado Auditivo
<b>PEATE</b>	Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
<b>SINITOX</b>	Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>dB</b>	Decibel
<b>dB NA</b>	Decibel em Nível de Audição
<b>dB NPS</b>	Decibel em Nível de Pressão Sonora
<b>g</b>	Gramas
<b>Hz</b>	Hertz
<b>KHz</b>	Kilo Hertz
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>ms</b>	Milissegundos
<b>s</b>	Segundos
<b>®</b>	Marca Registrada
<b>%</b>	Porcento

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Os organofosforados.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Efeitos dos agrotóxicos no organismo humano .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 A ototoxicidade .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Experimentos com cobaias .....</b>	<b>30</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Métodos.....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Seleção dos animais experimentais e critérios de inclusão.....	35
3.2.2 Formação dos grupos de estudo .....	36
3.2.3 Avaliação funcional auditiva .....	37
3.2.4 Avaliação eletrofisiológica da audição .....	38
3.2.5 Avaliação histológica .....	39
3.2.5.1 Preparação do material.....	39
3.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura .....	41
3.2.6 Análise dos dados e tratamento estatístico .....	43
3.2.6.1 Delineamento experimental .....	43
3.2.6.2 Metodologia estatística .....	43
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>82</b>
ANEXO 1 .....	82

# 1 INTRODUÇÃO

Pesticidas do grupo dos organofosforados são compostos anticolinesterásicos que causam variado grau de toxicidade para o ser humano com ampla utilização na agricultura. Em razão do benefício do agrotóxico para o sucesso do plantio, o trabalhador tem a tendência de superestimar seus efeitos, desconsiderando os malefícios à saúde em curto, médio e longo prazo. Embora um grande número de pesticidas tenha sido descoberto no início do século, seus efeitos deletérios foram relatados somente a partir de 1932.

Apesar de se conhecer seu poder tóxico, o uso dos compostos organofosforados é ainda amplamente disseminado, principalmente nos países de terceiro mundo. Atualmente, o Brasil desponta como o maior consumidor de agrotóxicos da América Latina, respondendo por 50% da quantidade comercializada.

O uso indiscriminado acarreta em um significativo número de intoxicações, agudas ou crônicas, por esse tipo de pesticida. Para Moraes (1999), a elevada aplicação de agentes tóxicos, sem o emprego dos cuidados necessários, tem contribuído para a degradação ambiental e para o aumento das intoxicações ocupacionais, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no meio rural brasileiro.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram aproximadamente três milhões de envenenamentos humanos por pesticidas em todo o mundo ao longo de um ano, com mais de 220.000 mortes relatadas. No Brasil, a ocorrência de intoxicações por pesticidas do grupo dos organofosforados continua sendo alta, apesar da diminuição no seu uso em relação à década dos anos oitenta.

A ação deletéria dos agrotóxicos sobre a saúde humana pode causar uma série de manifestações clínicas, como náuseas, tontura, fraqueza, falta de apetite, nervosismo, dores de cabeça, alergias, lesões renais e hepáticas, câncer e alterações genéticas. Em decorrência da inespecificidade dos sintomas relacionados à intoxicação, sendo estes comuns a múltiplos fatores etiológicos, torna-se difícil, muitas vezes, estabelecer a manipulação do organofosforado como o nexo causal.

Com relação ao sistema vestibulococlear, o efeito de agentes ototóxicos pode manifestar-se em lesões de células ciliadas externas (CCE), lesões do VIII par craniano, alterações no sistema vestibular e alterações no sistema nervoso central (SNC). A ação

neurotóxica de algumas substâncias químicas encontradas nos ambientes de trabalho pode afetar não somente a audição e o equilíbrio, mas também o tronco cerebral e via auditivas centrais (BERNARDI, 2003). Há evidências de que a alteração auditiva possa ser uma manifestação precoce de intoxicação por organofosforados (MANJABOSCO, MORATA e MARQUES, 2004).

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

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

Em razão do exposto, o objetivo desta pesquisa consiste em estudar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados no sistema auditivo periférico de cobaias.



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Neste capítulo são apresentadas as sínteses dos estudos mais representativos encontrados na literatura especializada e que se relacionam com o tema da presente pesquisa. Para facilitar a leitura, o capítulo está dividido em quatro partes. Primeiramente são dispostos trabalhos relacionados ao organofosforado e sua influência na saúde em geral, e em seguida, são apresentados estudos respectivos a ação tóxica do organofosforado no sistema vestibulococlear. Por fim, faz-se referência ao uso de cobaias em estudos de base.

### **2.1 Os organofosforados**

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

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

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

Em 1962, Carson já alertava sobre o efeito da contaminação ambiental e humana ocasionada pelo uso dos pesticidas. Segundo a autora, as substâncias químicas, difundidas sobre as terras de cultivo, florestas ou sobre jardins, fixam-se por longo tempo no solo, e podem, posteriormente, entrar em contato com organismos vivos, dando início a uma cadeia de envenenamentos. Além disso, estas substâncias podem passar de uma área para outra, por

meio de correntezas subterrâneas, até emergirem ao chão, e, a seguir, através da alquimia do ar e da luz solar, se combinarem sob novas formas altamente perigosas à vegetação, aos animais e ao ser humano.

A autora acima citada comenta ainda que, sob as condições agrícolas primitivas, observavam-se poucos problemas relativos a insetos. Tais problemas surgiram com a intensificação da agricultura, na disposição de vários hectares de terra a um único gênero de colheita, contribuindo assim para o aumento de populações específicas de insetos. A natureza mantém um controle e equilíbrio intrínseco, por meio dos quais se mantém as espécies dentro de determinados limites. Contudo, o cultivo de um único gênero de produto favorece o desenvolvimento da população de um determinado tipo de inseto a níveis muito mais altos, em uma plantação dedicada somente àquele produto, ao contrário do que acontece em terras cultivadas por diversificadas plantas.

A larga utilização de agrotóxicos acaba desenvolvendo resistência das pragas aos princípios ativos, principalmente depois de serem expostas repetidas vezes ao mesmo pesticida ou a dosagens inadequadas. A consequência dessa resistência é a necessidade do uso de maior variedade e de maior quantidade de produtos. O aumento do consumo leva a uma expansão dos riscos a ele inerentes, fazendo com que a população de uma forma geral se exponha em função da contaminação ambiental e dos alimentos, tornando a problemática do agrotóxico uma questão ainda mais grave de saúde pública (BEDOR et al., 2007).

Para atender à crescente demanda de produtos, Araújo et al. (2007) reforçam o fato de que os agricultores têm sido estimulados a utilizar uma grande variedade de produtos a fim de aumentar a produtividade e reduzir as perdas das safras. Esta ação tem levado ao uso indiscriminado de agrotóxicos, colocando em risco a saúde dos produtores, do meio ambiente e dos consumidores.

Conforme Oliveira-Silva et al. (2001), a utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de consequências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Em geral, essas consequências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância. Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria desses trabalhadores.

Castro e Confalonieri (2005), fizeram um levantamento de propriedades rurais de Cachoeiras de Macau, no Rio de Janeiro, acerca da percepção de risco e práticas de uso de agrotóxicos. Os autores verificaram que 22,5% dos agricultores reportaram já terem sido intoxicados. Verificou-se que 85% dos agricultores não utilizavam equipamento de proteção individual (EPI), que 27,5% jogavam embalagens de agrotóxicos no rio ou no mato e que 60% dos entrevistados nunca foram treinados para manusear agrotóxicos. Quanto à percepção do risco do uso de agrotóxicos, foram identificadas três categorias: 70% percebem, mas continuam usando; 27% não percebem o risco; 3% percebem e não utilizam mais.

A OMS estima que a cada ano ocorra cerca de 3.000.000 casos de intoxicação aguda por pesticidas, com 220.000 óbitos. A maioria destes incidentes ocorre nos países em desenvolvimento, como a África do Sul, Ásia, América Central e América do Sul (JAGA e DHARMANI, 2003).

No Brasil, em 2003, ocorreram 5.570 casos notificados de intoxicação por circunstâncias ocupacionais, sendo que destes, 1.748 (31,4%) por agrotóxicos e 640 (11,5%) por produtos químicos (Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas – SINITOX). Hoshino et al. (2008) alertaram para o fato de que o difícil acesso às informações e à educação por parte dos usuários desses produtos, bem como o baixo controle sobre a produção, a distribuição e a utilização dos agrotóxicos são alguns dos principais determinantes na constituição dessa situação como um potencial desafio de saúde pública.

A interação do trabalhador agrícola com os agrotóxicos pode ocorrer de forma direta ou indireta. De acordo com Manjabosco (2005), o contato direto ocorre quando os trabalhadores preparam o agrotóxico que será utilizado para aplicação na lavoura e pulverizam-na, ou quando preparam a semente. O contato indireto com os agrotóxicos ocorre constantemente, seja dentro do armazém ou na lavoura, onde se encontram resíduos desses agentes tóxicos.

Ferrer (2003) relatou que os praguicidas são uma das famílias de produtos químicos mais amplamente empregadas pelo homem. Podem ser classificados de acordo com sua função (inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas) ou de sua família química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides). Até 1957, os organoclorados eram os compostos mais usados como pesticidas. Entretanto, gradativamente eles foram sendo substituídos pelos agrotóxicos do grupo dos organofosforados, devido à sua persistência ambiental e seu reconhecido potencial inseticida (MORAES, 1999; FERRER, 2003).

Atualmente os organofosforados são utilizados tanto no meio laborial como doméstico, estendendo seu emprego no controle de pragas na agricultura, em diversas indústrias, na medicina e incluso no armamento químico (BENEDICO, 2002; FERRER, 2003; JAGA e DHARMANI, 2003). Ferrer (2003) acrescentou que esses químicos têm seu uso na medicina humana vinculado ao tratamento do glaucoma e da miastenia grave, sendo usado como antiparasitário sistêmico e dérmico.

De acordo com Jaga e Dharmani (2003), as variáveis que determinam a toxicidade do organofosforado são o nível de exposição ao agrotóxico no meio-ambiente, a dose absorvida e o nível de depressão da acetilcolinesterase individual.

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

Contudo, como comentado por outros autores, a exposição ao organofosforado ocorre não somente no meio rural, mas em diversos ambientes frequentados usualmente pela população em geral. Morgan et al. (2005) observaram a exposição de crianças em idade pré-escolar ao pesticida clorpirifós, e verificaram que, das 129 casas e 13 centros de educação infantil analisados, resíduos de clorpirifós foram detectados em 100% dos ambientes, principalmente no ar e na poeira depositada no chão.

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

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

Em estudo realizado por Delgado e Paumgartten (2000), em 55 lavouras do Município de Paty do Alferes, no Rio de Janeiro, os autores verificaram que o Tamaron® é o produto mais utilizado nas lavouras (53%), dentre os mais de 18 inseticidas em uso na região. Neste estudo, 55 agricultores foram entrevistados a respeito do uso dos agrotóxicos. Dos entrevistados, 92% dos trabalhadores envolvidos no manuseio destes produtos informaram não utilizar qualquer tipo de EPI para preparar e/ou aplicar os pesticidas. Esta negligência ou falta de conhecimento das medidas preventivas acarreta em prejuízos à saúde do trabalhador, como verificado pelos autores, visto que 62% dos trabalhadores referiram já ter apresentado alguns sintomas durante o manuseio do agrotóxico. Dos indivíduos que referiram os sintomas, 30% estavam usando o agrotóxico Tamaron®.

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

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

Pires, Caldas e Recena (2005) relataram que, se as intoxicações pela exposição podem refletir uma falta de conhecimento dos riscos dos agrotóxicos à saúde, o uso predominante dos inseticidas organofosforados na tentativa de suicídio reflete, paradoxalmente, um conhecimento real da toxicidade aguda destes compostos por esta população. Na microrregião de Dourados, em Mato Grosso do Sul, os autores verificaram que o inseticida que mais provocou intoxicações foi o organofosforado. Este agente apresentou um índice de 34,3% de

indivíduos intoxicados, e, dos indivíduos intoxicados, 45,5% foram ao óbito. As tentativas de suicídio com o uso do organofosforado ocorreram em 57,9% dos indivíduos.

Garcia (1996) relatou que o risco no trabalho com agrotóxicos está associado basicamente ao seu manuseio e à sua aplicação, por isso a descontaminação das roupas impregnadas desses agentes é muito difícil, permanecendo o acúmulo da substância química. Nesse caso, a pele permanece em constante contato com os agentes, o que facilita a absorção dérmica.

A fim de se evitar ou minimizar os danos à saúde provocados pelo manejo com os agrotóxicos, medidas preventivas deveriam ser tomadas, tal como afirmou Teixeira (2000), para o qual seria indicado que o trabalhador exposto a pesticidas tivesse um local adequado para se alimentar, se trocar, guardar e lavar as roupas de trabalho, e que recebesse ainda orientações quanto ao hábito de lavar as mãos e o rosto antes de beber, comer ou fumar. No entanto, o que se verifica em grande parte das empresas agrícolas é um mínimo de cuidado com a saúde do trabalhador. Manjabosco (2005), tomando por base os dados coletados em sua pesquisa, referiu que os métodos de prevenção se deram em porcentagens não significativas, abrangendo apenas a higiene das mãos, banho e troca de roupa.

Para Hoshino et al. (2008), os trabalhadores possuem a percepção dos perigos que seu trabalho oferece à sua saúde e ao meio ambiente, fato que permite evidenciar a necessidade de ações que promovam o conhecimento e capacitação desta população para o uso adequado de agrotóxicos, bem como a divulgação de outras formas de cultivo que não necessitem desta substância.

No Brasil, criou-se a necessidade de regulamentação do uso dos agrotóxicos, a partir da década de 1970, tendo em vista o grande aumento de consumo no país. A legislação foi sendo atualizada, através de portarias e, posteriormente, pela Lei dos Agrotóxicos (Lei 7.802, de 11 de julho de 1989) e sua regulamentação (Decreto nº 98.816, 11 de janeiro de 1990). Apesar de a legislação brasileira ser bastante moderna e abrangente, os casos de intoxicação em trabalhadores rurais são frequentes no país (SOARES, FREITAS e COUTINHO, 2005).

Bedor et al. (2007) alertaram para o fato de que deveria haver maior fiscalização na utilização dos agrotóxicos, para a proteção da população local e do meio ambiente, além de reflexões para a organização de serviços locais integrados de saúde do trabalhador para a vigilância e assistência sanitária, articulando os aspectos ambientais, epidemiológicos, clínico e de educação na promoção e proteção à saúde e ao meio ambiente.

## 2.2 Efeitos dos agrotóxicos no organismo humano

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

Os inseticidas organofosforados são conhecidos por seu efeito anticolinesterásico. Estes agentes inibem a enzima acetilcolinesterase, responsável pela hidrólise da acetilcolina, levando a um acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses nervosas (BEDOR et al., 2007). De acordo com Cantarutti (2005), os sinais de intoxicação aguda estão associados à inibição da colinesterase, ou seja, aos efeitos colinérgicos exacerbados. A toxicidade crônica é relacionada a efeitos neurotóxicos.

Ecobichon e Joy (1991) descreveram que, em virtude do efeito inibidor das colinesterases, os pesticidas organofosforados podem ocasionar, em mamíferos, lacrimejamento, salivação, sudorese, diarreia, tremores e distúrbios cardiorrespiratórios. Estes últimos são decorrentes de broncoconstrição, aumento das secreções brônquicas e bradicardia, bem como de depressão do SNC, sendo as principais causas de morbidade e mortalidade por tais produtos.

O tratamento das intoxicações por organofosforados baseia-se principalmente no uso da atropina, antídoto sintomático e, com menor frequência, das oximas, antídotos específicos que reativam as colinesterases (CAVALIERE et al., 1996).

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

(2000) complementaram referindo que a exposição crônica ao agrotóxico está relacionada, entre outros, ao câncer, efeitos teratogênicos, neuropatias periféricas tardias e toxicidade reprodutiva.

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

Palacios-Navas et al. (1999) observaram a ocorrência de sintomas persistentes em 89 trabalhadores industrialmente expostos a praguicidas organofosforados. Verificaram que as proporções mais altas de sintomas foram encontradas nos trabalhadores com idade entre 31 e 40 anos, com tempo de exposição de 6 a 13 anos. Os sintomas mais frequentemente apresentados foram conjuntivite (n=36), cefaleia (n=35), debilidade (n=34), náusea, lacrimejamento e dor estomacal (n=21), diarreia (n=20), visão turva (n=19), nervosismo e formigamento (n=18).

Em estudo realizado com 102 pequenos agricultores em Nova Friburgo, Rio de Janeiro, com exposição múltipla a agrotóxicos, foram diagnosticados 13 quadros de neuropatia tardia e 29 quadros de síndrome neurocomportamental e distúrbios neuropsiquiátricos associados ao uso crônico de organofosforados (ARAÚJO et al., 2007).

Outra alteração resultante da exposição ao agrotóxico verificada por Salles Jr. e Faro (2007), foi uma diminuição significativa da atividade motora, em uma pesquisa cujo objetivo foi o de avaliar os efeitos comportamentais da administração de uma formulação comercial de agrotóxico, constituída de uma associação entre um organofosforado e um piretróide.

Araújo et al. (2007) realizaram avaliação para verificar os sinais e sintomas clínicos, indagados, referidos ou observados, e os classificaram em efeitos muscarínicos, nicotínicos, centrais (cognitivos e neurocomportamentais) e periféricos (motores e sensitivos), descritos a seguir:

- efeitos muscarínicos: sudorese, hipersalivação, lacrimejamento, coriza, espasmos e câimbras abdominais, náuseas e vômitos, rubor facial, ardência e irritação nos olhos, prurido nasal, dermatite, diarreia ou constipação, ressecamento da mucosa oral, sensação de pressão torácica, incontinência urinária.



- efeitos nicotínicos: miofasciculação, principalmente braquial e palpebral, sensações parestésicas, tremores involuntários nas mãos e pernas, palpitação, mialgias na panturrilha, formigamento, sensação de queimação e de peso nos membros inferiores, incoordenação motora.

- efeitos no sistema nervoso central: cefaleia habitual, fadiga, astenia, vertigem, insônia, ansiedade, irritabilidade, zumbido, nistagmo, confusão mental, visão turva, convulsão, episódios depressivos e excitação psicomotora.

- efeitos no sistema nervoso periférico: alterações nos reflexos tendinosos profundos, na sensibilidade dolorosa e tátil.

Estudos conduzidos por Manjabosco, Morata e Marques (2004) mostraram que os agrotóxicos organofosforados causam basicamente três tipos de sequelas neurológicas após a intoxicação aguda ou devido à exposição crônica:

- polineuropatia retardada, caracterizada por fraqueza progressiva e ataxia das pernas, podendo evoluir até uma paralisia flácida;

- síndrome intermediária, na qual ocorre paralisia dos músculos do pescoço, perna e pulmão, além de diarreia intensa; ocorre de um a quatro dias após o envenenamento e apresenta risco de morte devido à depressão respiratória associada;

- efeitos comportamentais, tais como insônia ou sono perturbado, ansiedade, retardo de reações, dificuldade de concentração e uma variedade de sequelas psiquiátricas: apatia, irritabilidade, depressão, esquizofrenia.

Vasconcellos, Leite e Nascimento (2002) dividem as três fases da intoxicação pelo agrotóxico como: efeitos colinérgicos agudos, síndrome intermediária, neuropatia tardia induzida por organofosforado.

Para Benedico (2002), os quadros clínicos provenientes da intoxicação ao agrotóxico são considerados como:

- síndrome colinérgica na fase aguda da intoxicação, em um período de latência de 30 a 60 minutos.

- efeitos tóxicos diretos, com sinais de inflamação aguda, ulceração e necrose laríngea, esofágica, gástrica e duodenal, laringotraqueal e pulmonar, bem como hepatite, pancreatite e insuficiência renal aguda.

- síndrome intermediária, nas 24 a 96 horas após intoxicação aguda, na qual é produzida uma paralisia dos músculos respiratórios, proximais das extremidades, podendo persistir por vários dias e ocasionar uma insuficiência respiratória severa.

- neuropatia retardada, que surge de duas a quatro semanas após a exposição ao agrotóxico e consiste numa degeneração axonal que desenvolve uma polineuropatia distal e periférica-central.

O manejo incorreto dos organofosforados é, em grande parte, responsável pelo número de intoxicações agudas, caracterizadas pelo desenvolvimento de uma síndrome colinérgica e múltiplas complicações crônicas, sendo a neuropatia retardada uma das mais representativas. Na atualidade, está se dando maior importância a estas últimas, cuja frequência vai progressivamente aumentando, pois podem passar despercebidas por desconhecimento médico e do próprio usuário, que não é capaz de relacionar sua sintomatologia com a exposição ao agrotóxico (BENEDICO, 2002).

A população rural exposta ao agrotóxico não se limita somente aos trabalhadores, mas também à sua família, que convive próxima à plantação, reforçando a necessidade de pesquisas que aprofundem metodologias para avaliar esta 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.

### **2.3 A ototoxicidade**

Diversos estudos correlacionando perda auditiva com a exposição ao ruído têm sido vistos na literatura, no entanto, existem outros fatores de risco para a saúde auditiva que vêm sendo observados com frequência nos ambientes de trabalho. Ao se considerar perdas auditivas ocupacionais, é importante que se reconheça a potencialidade de outros agentes, como é o caso dos produtos químicos de efeito ototóxico (MORATA, 1989; TEIXEIRA e BRANDÃO, 1998; MORATA, 2003; TEIXEIRA, AUGUSTO e MORATA, 2002; AZEVEDO, 2004).

Agente ototóxico é definido como substância, químico ou droga que causa dano funcional ou lesão celular na orelha interna, especialmente em nível da cóclea e/ou canais

semicirculares e VIII par craniano. Já os agentes neurotóxicos alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo primariamente em neurônios das vias auditivas periférica e central (JOHNSON, 1993).

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

Conforme o Protocolo de Procedimentos Médico-periciais (Código CID-10), decretado em 1999, a perda auditiva por ototoxicidade refere-se àquela disacusia do tipo neurossensorial, induzida por distintas substâncias químicas, de origem endógena ou exógena. O efeito ototóxico pode alcançar também, com frequência, o aparelho vestibular, sendo que nestes casos os testes vestibulares podem mostrar um nistagmo espontâneo, depressão da reação térmica labiríntica e reflexos vestibuloespinais normais. Os sintomas da lesão tóxica ao sistema vestibulococlear caracterizam-se por: zumbido como sendo o primeiro sintoma; perda auditiva neurossensorial progressiva e bilateral, evoluindo das frequências altas para as médias e inferiores; vertigem posicional e associada a náuseas; distúrbios do equilíbrio, com vertigem persistente e instabilidade de marcha; e, ainda, osciloscopia, em razão do distúrbio do reflexo vestibulococlear presente.

A perda auditiva pode ser de instalação rápida ou insidiosa e a gravidade depende da quantidade absorvida do agente, e ainda do tempo de exposição e interação com o ototóxico. Pode ocorrer durante a exposição ou ter aparecimento tardio (KÓS e KÓS, 1998).

Azevedo (2004) citou como os métodos mais frequentemente utilizados para a avaliação da ototoxicidade a audiometria tonal, audiometria vocal, imitanciometria, pesquisa do declínio do reflexo acústico, pesquisa das Emissões Otoacústicas (EOA) e do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE).

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

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

Estudo realizado com agentes de saúde pública de Pernambuco demonstrou que a exposição crônica a inseticidas pode ser responsável pelo comprometimento da audição em nível periférico e central e, em caso de exposição combinada - ruído e inseticidas - haveria interação entre estes dois agentes, levando a uma potencialização da perda auditiva em nível periférico (TEIXEIRA, 2000).

Teixeira, Augusto e Morata, em 2002, desenvolveram um estudo com o objetivo de fazer uma descrição do perfil audiométrico do trabalhador agrícola para verificar a influência deste tipo de atividade laborial sobre o sistema auditivo. As pesquisadoras investigaram a audição de 98 trabalhadores com idade média de 41,6 anos, submetidos à exposição crônica aos inseticidas organofosforados e piretroides com um tempo mínimo de três anos. Os sujeitos foram divididos em dois grupos: um grupo (n=47) sem exposição ao ruído e o outro (n=51) com exposição atual ou progressiva ao ruído. Constatou-se que 64% dos trabalhadores expostos somente aos inseticidas apresentaram perda auditiva, enquanto que para o grupo com exposição concomitante aos inseticidas e ruído, a incidência de alteração na audiometria tonal foi de 67%. A partir desses resultados, as autoras concluíram que a exposição isolada aos inseticidas dos tipos organofosforados e piretroides induz ao dano auditivo periférico e o ruído é um fator que interage com os inseticidas, potencializando seus efeitos ototóxicos.

As mesmas autoras anteriormente citadas, em nova publicação, referiram que as queixas de maior frequência observadas em seu estudo foram irritação nos olhos (54,1%), cefaleia (44,9%), tonturas (35,7%), náuseas e torpor (16,3%). Já os sintomas mais referidos, relacionados ao SNC foram: dificuldades na compreensão da fala (46%), dificuldade em lembrar alguns fatos (43%), dificuldade em manter a atenção (24%) e zumbido (24%) (TEIXEIRA, AUGUSTO e MORATA, 2003).

Manjabosco, Morata e Marques (2004) realizaram um estudo na cidade de Cruz Alta, no Rio Grande do Sul, com o objetivo de descrever o perfil audiométrico do trabalhador agrícola e assim verificar a influência desta ocupação sobre a audição do trabalhador. Foram determinados dois grupos, sendo o grupo 1 constituído por 42 homens que trabalhavam no

ramo da agricultura com tempo médio de 15 anos. Estes indivíduos eram expostos a vários tipos de agrotóxicos, dentre eles os organofosforados. O grupo 2 foi composto por 42 sujeitos não expostos a agentes externos nocivos à audição e sem história prévia de perda auditiva. Os resultados demonstraram que 60% dos sujeitos (n=25) do grupo 1 apresentaram limiares auditivos elevados, sendo a alteração do tipo neurossensorial bilateral em 23 deles. A maioria (n=23) dos trabalhadores com alteração nos limiares auditivos apresentou elevação dos limiares na faixa de frequências de 3.000 a 6.000Hz, no entanto, também foram encontradas alterações nas frequências de 1.000, 2.000 e 8.000 Hz. Dos 25 indivíduos com alteração nos limiares auditivos, 16% (n=4) estavam expostos somente a ruído e 84% (n=21) estavam expostos a ruído e agrotóxicos. Desses 21 exames, 14% (n=3) mantinham contato indireto com agrotóxicos e 86% (n=18) contato indireto e direto. Os autores concluíram que o fator ocupacional dos trabalhadores da empresa agrícola estudada teve grande impacto nos achados audiométricos dos indivíduos avaliados.

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

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

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

Ernest (1995), em sua pesquisa com trabalhadores rurais, observou alta incidência de neuropatias periféricas e presença de perdas auditivas do tipo neurossensorial de grau leve a moderado nos trabalhadores expostos a agrotóxicos organofosforados.

Os achados de Beckett, Chamberlain e Hallman (2000) corroboram com a pesquisa realizada pelo autor anteriormente citado, uma vez que também foi verificada a ocorrência de perda auditiva periférica associada à exposição a plantações pulverizadas com inseticidas dos tipos piretroide e organofosforado em um grupo de agricultores de Nova York.

Hoshino et al. (2008) realizaram um estudo com 18 trabalhadores rurais da cidade de Teresópolis, Rio de Janeiro, compreendidos numa faixa etária de 16 a 59 anos, que responderam a questionários e foram avaliados por meio de audiometria e vectoeletronistagmografia. Quando interrogados a respeito da interação entre o sistema de trabalho e a queixa de tontura, 72,25% dos entrevistados responderam que os produtos químicos que utilizam no trabalho afetam o equilíbrio, e ainda, 88,9% deles acreditam que seu trabalho oferece risco à saúde. Os autores verificaram que 88,8% dos trabalhadores apresentaram alterações de equilíbrio corporal do tipo periférico irritativo e 38,8% deles apresentaram perda auditiva do tipo neurossensorial, sendo que 22,22% apresentaram queda nas frequências de 6.000 e 8.000 Hz, sugerindo que os agrotóxicos induzem alterações do sistema vestibulococlear através de uma intoxicação progressivamente lenta.

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

Teixeira, Augusto e Morata (2003), Manjabosco, Morata e Marques (2004) e Hoshino et al. (2008) alertaram sobre a questão da utilização de EPI, observando que a falta de uso dos equipamentos de segurança pode agravar ainda mais o quadro de alterações.

A literatura sugere que os agrotóxicos organofosforados induzem alterações do sistema auditivo e do sistema vestibular, tendo sido evidenciado ainda seu potencial neurotóxico na população exposta a este químico. Portanto, os efeitos dos agrotóxicos organofosforados sobre a saúde humana englobam uma variedade de sinais e sintomas, muito além da visibilidade clínica, necessitando de uma abordagem complexa à saúde, de forma a assegurar uma intervenção terapêutica e preventiva nas ações de saúde ambiental e do trabalhador (HOSHINO et al., 2008).

O trabalhador agrícola está exposto a vários agentes nocivos à saúde, incluindo ruídos, vibrações e produtos químicos específicos, como agrotóxicos. A ação destes agentes pode ser simultânea, favorecendo o comprometimento da audição. O indivíduo que trabalha em indústrias tem um acompanhamento periódico no que diz respeito à saúde e principalmente audição, recebendo informações sobre o problema. Já os trabalhadores agrícolas, que estão em

contato com diversos tipos de agrotóxicos, e, da mesma forma, podem sofrer a ação somatória de outros agentes nocivos, na grande maioria das vezes, não têm o mesmo acompanhamento. Pela influência destes fatores na audição, é possível que esses indivíduos sejam candidatos a apresentarem danos no sistema auditivo por estarem expostos a fatores de risco para a saúde auditiva (MANJABOSCO, MORATA e MARQUES, 2004).

## 2.4 Experimentos com cobaias

Pesquisas com animais têm papel importante no desenvolvimento da ciência, no sentido de aprimorar o conhecimento acerca dos mecanismos fisiopatológicos de doenças e avaliar técnicas com possibilidade de aplicabilidade no ser humano (ALBUQUERQUE, 2006).

O osso temporal da cobaia, a cóclea e os seus componentes são semelhantes aos do homem, com poucas exceções, incluindo uma cadeia ossicular compactada, com o martelo e a bigorna juntos, formando o complexo ósseo maleoincudal e o estribo. As dimensões do tímpano são significativamente maiores nas cobaias e desprovidas de *pars flacida*. As dimensões das voltas em espiral da cóclea da cobaia são de aproximadamente 4,25 voltas; já no homem, variam de 2,5 a 2,75 voltas (SEHITOCLU et al., 1990); 3,5 a 3,75 voltas (WYSOCKI, 2004).

Diversos estudos foram realizados buscando revelar a extensão da cóclea de cobaias e outros animais de laboratório. Com relação especificamente às pesquisas com cobaias, a média do comprimento da membrana basilar encontrada foi 16,4 mm (LINSS et al., 2006); 18 mm (ZHOU e PICKLES, 1994); 18,6 mm (WADA et al., 1998); 20,32 mm (VIBERG e CANLON, 2004). Na análise por espiras, Linss et al. (2006) encontraram para espira basal, espira 2 (E2), espira 3 (E3) e espira apical os valores 6,92 mm, 4,22 mm, 3,32 mm e 1,86 mm, respectivamente.

A cobaia não possui meato acústico interno, somente o externo. O osso temporal, a histologia e as estruturas auditivas da cobaia parecem ser um potencial modelo para estudo comparativo com o ouvido humano (VASCONCELOS, 2005). Podem ser ainda manipuladas com certa facilidade, conhecendo-se as diferenças e similaridades topográficas. Quanto ao

VIII par craniano, Vasconcelos e Barreira (2007) referiram que este nervo, na cobaia, percorre, em média, uma distância de 5 mm até o tronco cerebral, sendo que o osso temporal molda o seu formato. O nervo vestibulococlear é constituído por fascículo único, resultante da fusão dos fascículos dos nervos vestibular e coclear. No homem podem ser identificados um componente vestibular dorsal e outro ventral, o que não se observa na cobaia.

Com relação à avaliação da audição em animais experimentais, o primeiro teste a surgir foi o reflexo de Preyer, descrito em 1882. Consiste em uma técnica de fácil execução, que envolve a administração de um estímulo sonoro intenso, como o bater de palmas ou a apresentação de um som metálico, seguida da observação da reação reflexa do animal, caracterizada pela movimentação do pavilhão auricular. De acordo com Jero, Coling e Lalwani (2001), a aplicação do reflexo de Preyer é usada principalmente para determinar se o animal apresenta uma resposta auditiva.

Além da pesquisa do reflexo de Preyer, as Emissões Otoacústicas Produto de Distorção (EOAPD) vêm sendo utilizadas como método de avaliação da função auditiva em cobaias há alguns anos (WITHNELL, SHAFFER e TALMADGE, 2003; NUTALL et al., 2004; HYPPOLITO et al., 2005; LUKASHKIN e RUSSEL, 2005). Trata-se de método de fácil execução, baixo custo e alta reprodutibilidade. Adicionalmente, quando comparado à análise morfológica do órgão de Corti, têm mostrado grande correlação funcional (AQUINO, OLIVEIRA e ROSSATO, 2008).

Concomitante à avaliação por meio das EOAPD, têm-se observado na literatura a utilização dos PEATE como método objetivo de avaliação dos sistemas auditivos periférico e central de cobaias, por serem registrados de forma não invasiva e sem a interferência da sedação ou anestesia aplicadas (ROCINHOLI, 1998; KASSE et al., 2008).

Com relação às pesquisas nas quais utilizou-se o agrotóxico como agente de intoxicação de cobaias, Pelegrino et al. (2006) realizaram um estudo para verificar os efeitos tóxicos do organofosforado metamidofós no SNC, objetivando estudar os aspectos morfométricos no cérebro de ratos, tratados com doses repetitivas de organofosforados metamidofós. A pesquisa envolveu ratos Wistar machos que foram inoculados via oral, com doses de 2,5 mg/Kg e 5,0 mg/Kg, durante dois meses, com intervalos de sete dias. Após a análise dos resultados, os autores concluíram que doses subletais de organofosforados metamidofós produzem hipotrofia da camada molecular do córtex cerebral, sem, contudo, causar redução do número de neurônios em regiões específicas do cérebro.



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

Salles Jr. e Faro (2007) realizaram um estudo sobre os efeitos comportamentais produzidos pela exposição aguda a pesticidas organofosforados. Os pesquisadores utilizaram uma formulação comercial de agrotóxico vendida no Brasil, o Deltaphos®, que constitui uma associação entre um organofosforado (triazofós) e um piretroide (deltametrina) sobre a atividade locomotora e em modelo de ansiedade e depressão em ratos. Os animais foram divididos em grupos que receberam, via subcutânea, o organofosforado administrado durante sete dias consecutivos. A ansiedade foi avaliada no Labirinto em Cruz Elevado; a atividade locomotora foi avaliada em campo aberto e a depressão foi avaliada no teste do nado forçado. Os resultados da pesquisa demonstraram que a administração aguda de agrotóxico alterou o comportamento locomotor e produziu ansiedade nos animais tratados, mas não produziu depressão nos mesmos.

Em um estudo no qual os autores aplicaram uma combinação de dois inseticidas organofosforados em ratas durante o período gestacional e de lactação, observaram que de um a 15 dias de pós-natal, os animais apresentaram alteração nos períodos de desenvolvimento dos dentes, pelos e orelhas, bem como nos reflexos postural, palmar e de *startle* (GODINHO et al., 2003).

Quilodrán, Miranda e Jiménez (2006), ao aplicarem dose única de um organofosforado em ratos machos com o intuito de pesquisar o efeito da exposição aguda ao inseticida no cerebelo, evidenciaram apoptose nas células de Purkinge de todos os ratos submetidos ao agente tóxico, bem como dano estrutural no citoesqueleto dos animais sobreviventes, fato que poderia justificar a ocorrência de danos motores nos casos de intoxicação por organofosforados.

A literatura atualmente refere que se têm pesquisado sobre o sinergismo entre mais de um tipo de agrotóxico, tendo em vista que muitos trabalhadores rurais fazem uso de combinações de dois ou mais tipos diferentes destes produtos químicos. Em estudo realizado por Karabay e Oguz (2005), os autores procuraram investigar a genotoxicidade de dois

inseticidas, quando administrados isoladamente ou em conjunto, verificando o efeito sinérgico. Foram utilizados os produtos comerciais Tamaron® e Confidor®, analisados separadamente, e Taifun®, pesticida que tem em sua fórmula a combinação de dois agrotóxicos. A pesquisa, realizada com ratos alimentados durante 15 semanas com ração contendo os agrotóxicos, indicou que o número de aberrações cromossômicas aumentou de acordo com as doses de agrotóxico recebidas, e houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos que receberam diferentes agrotóxicos e grupo controle. Os autores alertam para o fato de que pesquisas que investiguem a genotoxicidade podem ser desenvolvidas para auxiliar na descoberta do potencial humano ao desenvolvimento de câncer.

Não foram encontrados estudos que fizessem referências às lesões no sistema vestibulococlear provocadas pela administração proposital de agrotóxicos, no que se refere à experimentos com cobaias e demais animais de laboratório, mesmo após extensa consulta em base de dados nacionais e internacionais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

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

Esta pesquisa foi desenvolvida na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP) no período de agosto a setembro de 2008, com o objetivo de estudar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados no sistema auditivo periférico de cobaias.

#### 3.1 Materiais

Para o estudo foram utilizadas 15 cobaias albinas machos, espécie *Cavia porcellus*, linhagem inglesa, com peso entre 300 e 500g, divididas em três grupos: grupo 1 (água destilada) com três cobaias, grupo 2 (dose igual a 0,3 mg/Kg de agrotóxico) com seis cobaias e grupo 3 (dose de 3 mg/Kg de agrotóxico) também com seis cobaias.

Para a intoxicação das cobaias, administrou-se o organofosforado Taron® (metamidofós), comercializado pela Bayer CropScience Ltda. Optou-se por este agente pelo mesmo ser largamente utilizado em uma grande variedade de culturas, tais como algodão, amendoim, batata, feijão, fumo, soja, tomate e trigo, mesmo sendo considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) (RAMOS, 1999). Em estudo realizado com trabalhadores rurais expostos a diversos tipos de agrotóxicos, os autores constataram que Taron® foi o terceiro agente mais utilizado na lavoura (HOSHINO et al., 2008).

## 3.2 Métodos

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

O modelo experimental utilizado foi a cobaia albina pela facilidade de manejo, dissecação coclear e manipulação e ainda pela igual facilidade de infusão de drogas anestésicas e drogas em experimentação, seja pela via intraperitoneal, intramuscular ou subcutânea, quando comparadas a outros animais experimentais (AQUINO, OLIVEIRA e ROSSATO, 2008).

Os cuidados seguiram as diretrizes do Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do *Institute of Laboratory Animal Resources*, (2003).

O protocolo experimental seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguiu ainda as diretrizes expostas por Goldenberg (2000). A pesquisa foi submetida à análise e aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP com o título preliminar de “Agrotóxicos: ação do organofosforado no sistema vestibulococlear”, sob o protocolo número 100/2008 (Anexo 1).

Os animais foram selecionados no Biotério Central da FMRP-USP, através da presença do reflexo de Preyer (JERO, COLING e LALWANI, 2001) e peso variando entre 300 e 500 g.

Após repouso auditivo de 24 horas, os animais foram avaliados e submetidos à otoscopia externa através da visualização do meato acústico externo (MAE) com otoscópio. Os animais que apresentaram sinais de otite externa ou média aguda, cerúmen de difícil remoção, alterações inflamatórias do MAE ou mesmo conduto auditivo muito estreito para adequar a sonda do equipamento EOA, foram descartados do experimento. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da FMRP – USP.

Como os grupos experimentais foram expostos a organofosforado de ação sistêmica, considerou-se para este estudo o número de orelhas internas, não de animais estudados.

### 3.2.2 Formação dos grupos de estudo

O grupo 1 foi formado por três cobaias e os grupos 2 e 3 por seis cobaias cada.

#### GRUPO 1 – CONTROLE – ÁGUA DESTILADA

- Três animais – seis cócleas, com administração de água destilada intraperitoneal em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de agrotóxico para o peso da cobaia, durante sete dias.

#### GRUPO 2 – AGROTÓXICO NA CONCENTRAÇÃO DE 0,3 mg/Kg

- Seis animais – doze cócleas, com administração intraperitoneal de agrotóxico na dose única diária de 0,3mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos.

#### GRUPO 3 – AGROTÓXICO NA CONCENTRAÇÃO DE 3mg/Kg

- Seis animais – doze cócleas, com administração intraperitoneal de agrotóxico na dose única diária de 3mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos.

A dose mínima utilizada do agrotóxico foi baseada em um estudo prévio realizado por Cavaliere et al. (1996), no qual evidenciou-se o potencial de miotoxicidade do organofosforado. O cálculo da dose máxima inicialmente baseou-se na dose letal para ratos descrita na bula do produto. Em virtude do alto índice de mortalidade, propôs-se uma dosagem máxima original, obtida por testes piloto, com menor índice de letalidade.

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

Em virtude da importância dos EPI para evitar contato com o agrotóxico, no momento da aplicação das doses diárias nos animais do experimento foram adotadas medidas de precaução, tais como a utilização de jaleco, calças compridas, calçado fechado, luvas de látex antiderrapante, toca cirúrgica, óculos de segurança e máscara descartável contra vapores orgânicos cobrindo nariz e boca.

### 3.2.3 Avaliação funcional auditiva

A avaliação funcional auditiva foi realizada através do teste de EOAPD, utilizando-se o Equipamento Smart DPOAE 4.42USBez. As cobaias eram sedadas com cloridrato de cetamina para serem submetidas aos testes. Somente as cobaias com EOA presentes foram incluídas no estudo.

Em todos os grupos, as EOAPD foram realizadas no primeiro dia da administração do agrotóxico, previamente ao início da intoxicação, e 24 horas após a última dose da droga, imediatamente antes do sacrifício.

O teste de EOAPD foi realizado seguindo a relação de frequências  $2f(1) - f(2)$  com relação  $f(2)/f(1) = 1,22$ . Deve-se ainda levar em consideração que as intensidades de  $f(1)$  e  $f(2)$  podem ser iguais ou diferentes. Na literatura, em trabalhos utilizando cobaias, é citado que os estímulos variam de 30 a 120 dB (WITHNELL, SHAFFER e TALMADGE, 2003; LUKASHKIN e RUSSEL, 2005). Em humanos, a intensidade do estímulo desencadeante pode variar de 0 a 70 dB NPS e pode ser medida na faixa de 500 a 8.000 Hz (HE e SCHMIEDT, 1993). Baseando-se nos estudos de Michaelis et al. (2004), Hyppolito et al. (2005) e Aquino (2007), no presente trabalho foi utilizada a intensidade de 70 dB NPS para  $f(1)$  e  $f(2)$ .

As otoemissões resultantes costumam ser aproximadamente 55 dB NPS menos intensas que o estímulo provocante (RASMUSSEN et al., 1993). O conjunto destas respostas forma o gráfico chamado audiococleograma, no qual se tem o estímulo que é o som e a resposta que também é um som e fornece a função das CCE responsáveis pelas frequências analisadas.

Foram consideradas as EOA a partir de 1,5 KHz, pois as dimensões do MAE da cobaia fazem com que haja uma dificuldade de detecção das EOA abaixo desta frequência, obtendo respostas que coincidem com as respostas do ruído (HYPPOLITO et al., 2005). Estes dados estão de acordo com o trabalho de Liang e Zhan (1998) que encontraram maiores amplitudes de EOAPD acima de 2KHz, em cobaias.

Assim, como critério de integridade ou de alteração funcional da cóclea foi considerada a condição de presença ou ausência das EOAPD, respectivamente (HYPPOLITO et al., 2005). As EOAPD foram também avaliadas pela comparação dos valores médios das amplitudes da relação sinal/ruído por frequência entre o início e o fim do experimento, conforme metodologia utilizada por Garcia, Iório e Petrilli (2003), com o intuito de observar

indícios de sofrimento precoce das CCE. A relação sinal/ruído relaciona-se à diferença na comparação entre os parâmetros de resposta (amplitude) e ruído de fundo (KASSE et al., 2008).

### 3.2.4 Avaliação eletrofisiológica da audição

A avaliação eletrofisiológica da audição foi realizada com o registro do PEATE, por meio do equipamento Smart EP 3.86USBez, conectado a um microcomputador, duas sondas de espuma, quatro eletrodos de contato e pasta eletrolítica. Nos três grupos, o PEATE foi realizado logo após a pesquisa das EOAPD, no primeiro dia de administração do agrotóxico e 24 horas após a última dose da droga, imediatamente antes do sacrifício. Na ocasião do exame, os animais já se encontravam previamente anestesiados com injeção de cetamina via intraperitoneal.

Para o registro do PEATE, o pelo da região do vértex e entre as órbitas foi raspado com lâmina de aço, e realizou-se a limpeza das orelhas com esponja de aço para retirar a oleosidade e melhorar o contato do eletrodo com a pele (ROCINHOLI, 1998).

Os eletrodos de superfície, para registro do PEATE, foram dispostos da seguinte maneira: um eletrodo positivo no vértex craniano, dois eletrodos negativos na porção posterior do pavilhão das orelhas e um referência (terra) na frente (entre as órbitas). Os mesmos foram posicionados com interposição de pasta eletrolítica, para melhor condutibilidade do sinal elétrico.

A estimulação sonora foi realizada por via aérea, através de sondas de espuma. O estímulo utilizado foi o clique alternado, na taxa de 11,4 estímulos por segundo, com duração de 0,1 ms e frequência fundamental de 1.000 Hz, utilizando a intensidade de 60 dB. O sinal captado pelos eletrodos foi submetido a filtros passa-alta e passabaixa de 150 e 3.000 Hz, respectivamente. O sinal filtrado e amplificado foi submetido à promediação de 1.000 varreduras dos registros dos Potenciais Evocados Auditivos (PEA), com 10 ms, e o resultado final foi fornecido sob forma de ondas de potencial elétrico. Somente a onda I foi considerada para o presente estudo, visto que esta onda registra o potencial no nervo auditivo, fazendo parte ainda do sistema auditivo periférico. Foram avaliadas a amplitude e a latência da onda I, bem como o limiar eletrofisiológico mínimo. Para a pesquisa do limiar, o estímulo sonoro foi sendo oferecido de maneira decrescente de 10 em 10 dB até o limiar aproximado, e então de 5

em 5 dB, pesquisando-se a intensidade mínima de formação do pico da onda I, conforme descrito por Viberg e Canlon (2004).

### 3.2.5 Avaliação histológica

No dia seguinte à última dose da droga ou da água destilada administrada em cada um dos grupos, imediatamente após a realização das EOAPD e do PEATE, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilasina 2% (0,5ml/kg - Dopaser® 200mg; Laboratórios Calier do Brasil Ltda) e cloridrato de cetamina 10% (0,9ml/Kg - Ketamin® 50mg/ml; Laboratório Cristália) via intramuscular e sacrificados pelo método de decapitação. As bulas foram imediatamente retiradas bilateralmente e abertas, expondo-se as cócleas.

#### 3.2.5.1 Preparação do material

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

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

A secagem da água ainda presente nas amostras, após desidratação, foi realizada utilizando-se o equipamento BAL-TEC – CPD 030 – Critical Point Dryer (Balzers,



Liechtenstein) (Figura 1), através do processo de ponto crítico, sendo as amostras transferidas para a câmara do aparelho e recobertas por dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) líquido.



**Figura 1** Criptical Point Dryer BAL-TEC – CPD 030

Para a adequada observação à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as cócleas dissecadas e parcialmente preparadas foram fixadas pela base em um porta-espécime cilíndrico de metal com pasta condutiva de carbono, Colloidal Graphite (Electron Microscopy Sciences – Hatfield, PA). As estruturas foram então cobertas por uma fina camada de ouro de 24 quilates, através do processo de evaporação com o equipamento BAL-TEC – SCD 050 – Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein) (Figura 2), tornando-se eletricamente condutivas, conforme estudos de Oliveira, Canedo e Rossato (2002), Hyppolito et al. (2003) e Aquino (2007).



**Figura 2** Sputter Coater BAL-TEC – SCD 050

### 3.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura

Terminados os processos de preparação das estruturas, as mesmas foram levadas para análise à MEV. O microscópio eletrônico utilizado foi o JEOL Scanning Electron Microscope – JSM 5200 (Tokyo, Japan) (Figura 3).



**Figura 3** Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol Scanning Microscope – JSM 5200

A análise estrutural foi padronizada pelo estudo do terço médio das primeiras três espiras cocleares. A espira apical não foi incluída no estudo visto que o desarranjo natural da mesma dificulta uma análise criteriosa da presença e integridade das células ciliadas (AQUINO, 2007). Uma vez que a varredura era feita na superfície do órgão de Corti, a imagem era congelada e fotografada, para posterior estudo, considerando-se a integridade ou lesão das CCE e células ciliadas internas (CCI).

A condição de integridade ou lesão das CCE e CCI foi definida pela análise dos estereocílios destas estruturas. Células que apresentaram estereocílios com forma e disposição perfeitas foram consideradas íntegras (normais). Células com estereocílios ausentes, disformes ou em padrão de desarranjo foram consideradas lesadas (OLIVEIRA e BERNAL, 2003; HYPPOLITO et al., 2003; 2005).

### 3.2.6 Análise dos dados e tratamento estatístico

Baseando-se em estudo prévio (KASSE et al., 2008), foi realizada a análise dos dados de cada orelha de cada cobaia separadamente, como se fosse um dado isolado, que depois foram agrupados, pois cada uma das orelhas apresentou uma resposta com um valor diferente nos testes, variação interindividual, dentro da normalidade.

#### 3.2.6.1 Delineamento experimental

Quanto às EOAPD, foi considerada a situação de presença e ausência de respostas, bem como a relação sinal/ruído de cada frequência.

Com relação ao PEATE, considerou-se para a análise estatística, a amplitude e a latência da onda I, bem como o limiar eletrofisiológico mínimo.

Foi adotado o delineamento experimental casualizado com um número diferente de repetições (três cobaias para grupo controle e seis cobaias para cada um dos grupos expostos ao organofosforado) de um experimento fatorial 3 x 2 (três grupos x duas fases – pré e pós).

#### 3.2.6.2 Metodologia estatística

Os dados foram submetidos ao método da Análise de Variância (ANOVA) e Significância de F para dados paramétricos. Para normalizar o coeficiente de variação, foi adotado o Teste de Tukey, após a transformação para raiz quadrada dos dados das variáveis limiar e amplitude da onda I. Já aos dados de relação sinal/ruído foi acrescentada uma constante. Considerou-se o nível crítico de significância de 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SAS – *Statistical Analysis System* 2001, versão 9.1.3.

## 4 RESULTADOS

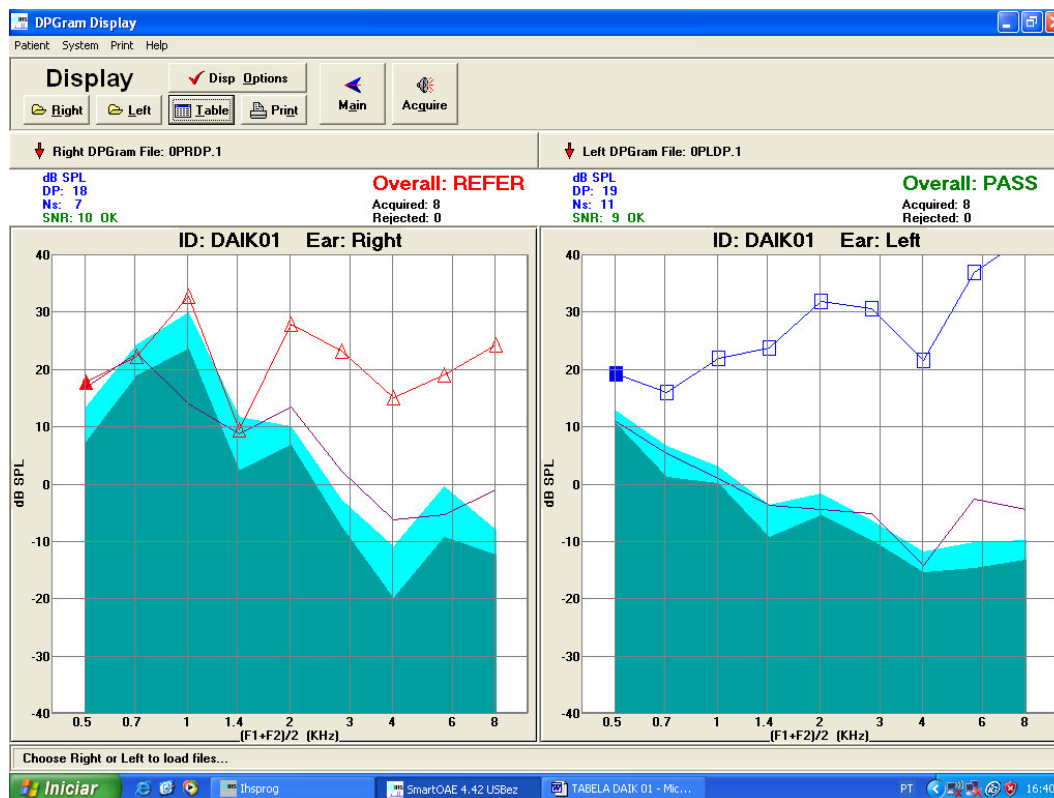
Neste capítulo, são apresentados os resultados da pesquisa cujo objetivo consistiu em estudar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados no sistema auditivo periférico de cobaias.

Com relação à avaliação funcional através das EOAPD, todas as cobaias dos três grupos avaliados mostraram presença de resposta após os sete dias de experimento, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** – Número de cócleas que evidenciam resultados de EOAPD presentes nos três grupos estudados.

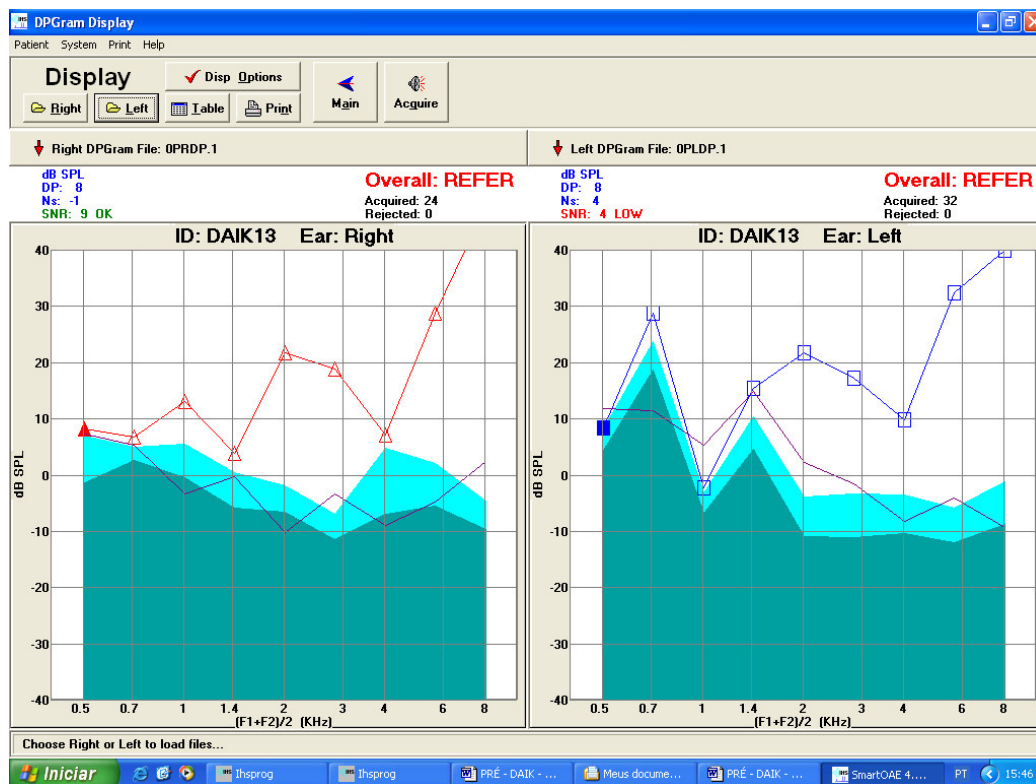
	<i>Grupo 1</i>		<i>Grupo 2</i>		<i>Grupo 3</i>	
EOAPD	Presentes	Ausentes	Presentes	Ausentes	Presentes	Ausentes
Cócleas	6	0	12	0	12	0

A presença de resposta das EOAPD de uma das cobaias do grupo 1 pode ser observada na Figura 4.



**Figura 4** Exemplo de teste de EOAPD de cobaia do grupo 1, mostrando presença de resposta.

A seguir estão apresentados exames de EOAPD de cobaias do grupo 2 (Figuras 5 e 6) e do grupo 3 (Figuras 7 e 8), tanto pré quanto pós exposição ao organofosforado, mostrando presença de respostas.



**Figura 5** Exemplo de teste de EOAPD de cobaia do grupo 2 pré intoxicação, mostrando presença de resposta.

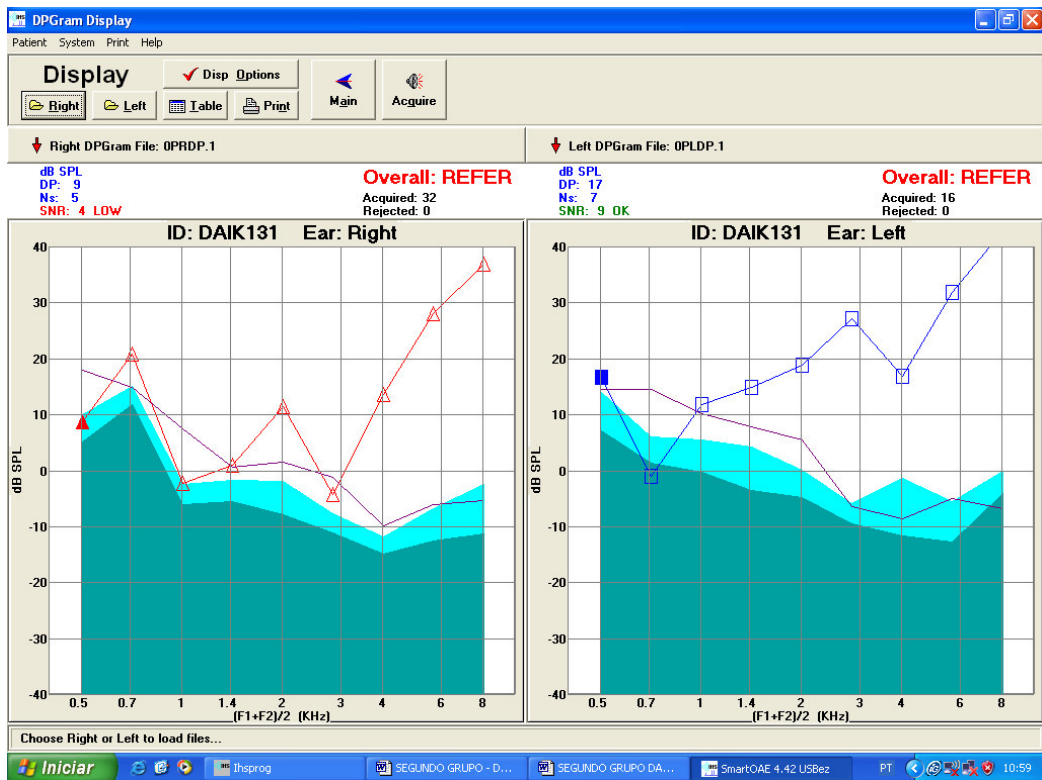


Figura 6 Exemplo de teste de EOAPD de cobaia do grupo 2 pós intoxicação, mostrando presença de resposta.

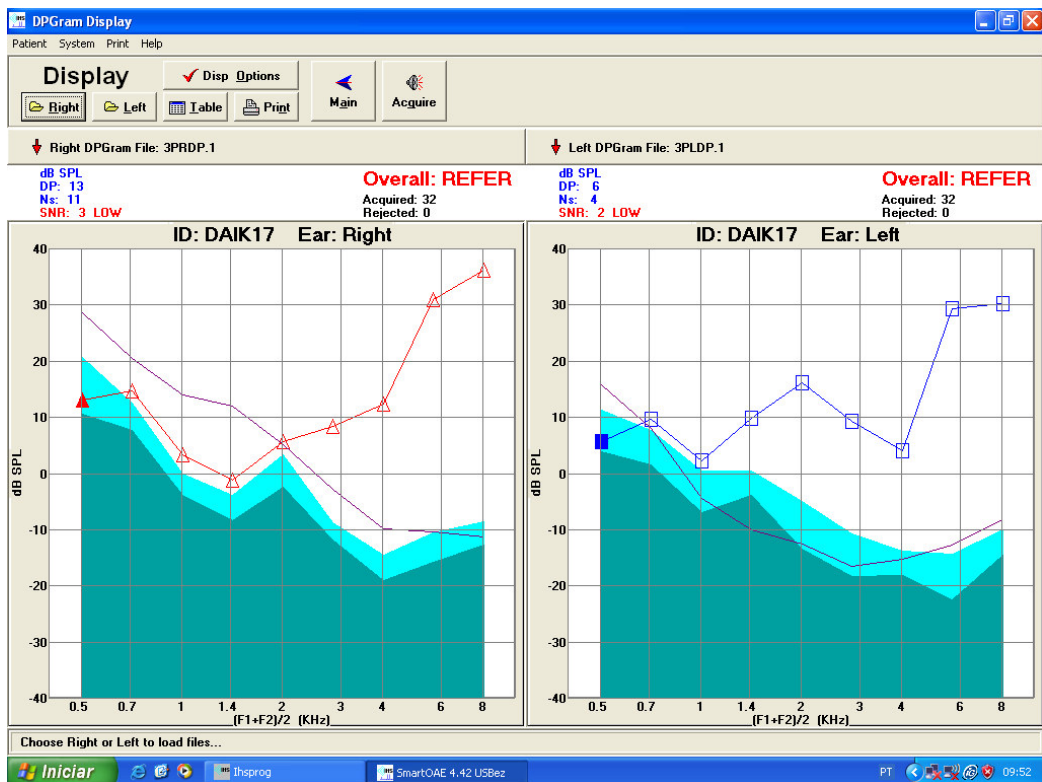
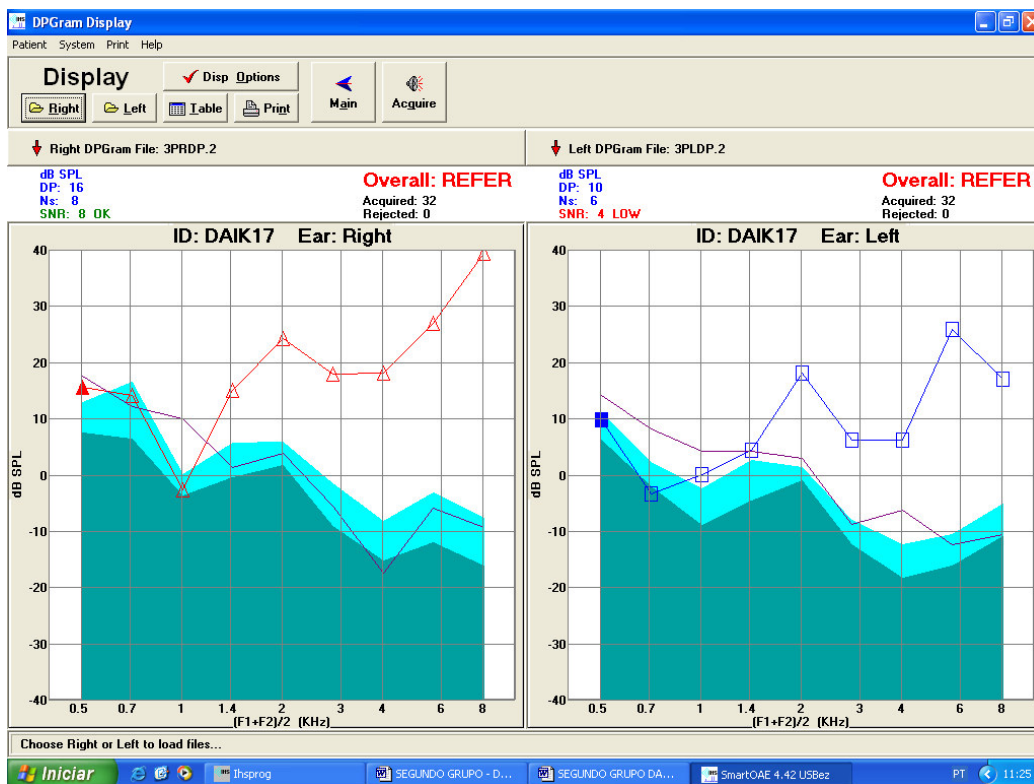


Figura 7 Exemplo de teste de EOAPD de cobaia do grupo 3 pré intoxicação, mostrando presença de resposta.



**Figura 8** Exemplo de teste de EOAPD de cobaia do grupo 3 pós intoxicação, mostrando presença de resposta

Com relação à variável relação sinal/ruído, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das frequências testadas, tanto na comparação entre os valores pré e pós exposição do grupo 2, que recebeu a dosagem mais baixa de agrotóxico (0,3 mg/Kg) como na comparação entre os períodos pré e pós intoxicação do grupo 3, cujas cobaias foram expostas a doses elevadas do agrotóxico (3 mg/Kg).

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores médios da relação sinal/ruído por frequência nos dois grupos de cobaias que receberam o agrotóxico durante sete dias consecutivos, com resultados pré e pós experimento.



**Tabela 2** – Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 2 por frequência.

<i>Orelha</i>	<i>Frequência</i>	<i>Fase</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de p</i>	
Direita	1500	Pré	10,83	4,62	0,22	
		Pós	16,33	9,16		
	2000	Pré	24,83	7,90	0,34	
		Pós	29,17	7,03		
	3000	Pré	24,83	8,64	0,63	
		Pós	27,67	10,89		
	4000	Pré	16,60	12,21	0,27	
		Pós	22,83	7,47		
	6000	Pré	27,50	7,37	0,16	
		Pós	32,83	4,62		
	8000	Pré	39,50	15,31	0,38	
		Pós	46,00	8,19		
	Esquerda	1500	Pré	12,83	10,68	0,29
			Pós	19,00	8,19	
2000		Pré	21,50	9,57	0,34	
		Pós	26,83	8,65		
3000		Pré	21,00	9,45	0,24	
		Pós	28,33	10,98		
4000		Pré	18,83	13,79	0,31	
		Pós	25,67	7,39		
6000		Pré	33,17	11,70	0,29	
		Pós	40,00	9,25		
8000		Pré	41,67	12,40	0,48	
		Pós	46,00	7,32		

**Tabela 3** – Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 3 por frequência.

<i>Orelha</i>	<i>Frequência</i>	<i>Fase</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de p</i>	
Direita	1500	Pré	11,50	3,56	0,09	
		Pós	21,83	7,05		
	2000	Pré	13,83	12,45	0,16	
		Pós	25,00	12,88		
	3000	Pré	17,83	8,25	0,77	
		Pós	19,83	14,26		
	4000	Pré	18,67	11,88	0,11	
		Pós	28,50	7,04		
	6000	Pré	29,67	14,95	0,18	
		Pós	38,83	4,17		
	8000	Pré	39,50	17,67	0,30	
		Pós	48,00	6,32		
	Esquerda	1500	Pré	10,33	4,08	0,19
			Pós	15,50	8,09	
2000		Pré	20,67	13,95	0,54	
		Pós	24,50	4,85		
3000		Pré	24,00	7,61	0,33	
		Pós	18,00	12,03		
4000		Pré	17,00	7,37	0,11	
		Pós	24,16	6,68		
6000		Pré	36,00	12,69	0,54	
		Pós	39,33	2,66		
8000		Pré	39,83	5,19	0,51	
		Pós	6,62	6,62		

.Na comparação dos resultados do teste de EOAPD do grupo controle com os achados na avaliação pós experimento do grupo 2, verificou-se diferença estatisticamente significativa nos valores médios da relação sinal/ruído das frequências de 1.500 e 6.000 Hz na orelha direita. Os valores obtidos nas demais frequências não apresentaram diferença significativa entre as cobaias do grupo exposto à dose mais baixa de agrotóxico e àquelas pertencentes ao grupo controle.

Já a comparação realizada entre os resultados obtidos nas EOAPD do grupo controle com o grupo 3, intoxicado com dose mais elevada do organofosforado, obteve-se diferença estatística significativa também nos valores médios da relação sinal/ruído das frequências de 1.500 e 6.000 Hz, porém em 1.500 Hz na orelha direita e 6.000 Hz na orelha esquerda. A mesma diferença não pôde ser observada nas outras frequências avaliadas na comparação dos resultados pós experimento do grupo 3 com o grupo controle.

As Tabelas 4 e 5 mostram os valores médios da relação sinal/ruído por frequência nos dois grupos de cobaias que receberam o agrotóxico durante sete dias consecutivos, em comparação com resultados encontrados no grupo controle.

**Tabela 4** – Comparação dos valores médios da amplitude da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas entre as cobaias dos grupos 1 (G1) e 2 (G2).

<i>Orelha</i>	<i>Frequência</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de p</i>	
Direita	1500	G1	36,67	2,31	0,008*	
		G2	16,33	9,16		
	2000	G1	29,67	4,73	0,92	
		G2	29,17	7,03		
	3000	G1	18,00	16,46	0,32	
		G2	27,67	10,89		
	4000	G1	31,67	4,04	0,1	
		G2	22,83	7,47		
	6000	G1	49,33	7,23	0,004*	
		G2	32,83	4,62		
	8000	G1	45,00	7,55	0,86	
		G2	46,00	8,19		
	Esquerda	1500	G1	27,67	10,07	0,2
			G2	19,00	8,19	
2000		G1	29,67	11,59	0,69	
		G2	26,83	8,66		
3000		G1	25,33	20,59	0,78	
		G2	28,33	10,98		
4000		G1	34,00	8,19	0,17	
		G2	25,67	7,39		
6000		G1	47,00	5,29	0,27	
		G2	40,00	9,25		
8000		G1	49,00	9,64	0,61	
		G2	46,00	7,32		

\*Valor menor que 0,05 significa diferença estatisticamente significante. Teste de Tukey.

**Tabela 5** – Comparação dos valores médios da relação sinal/ruído das Emissões Otoacústicas entre as cobaias dos grupos 1(G1) e 3 (G3).

<i>Orelha</i>	<i>Frequência</i>	<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Valor de p</i>
Direita	1500	G1	36,67	2,31	0,01*
		G3	21,83	7,05	
	2000	G1	29,67	4,73	0,57
		G3	25,00	12,88	
	3000	G1	18,00	16,46	0,87
		G3	19,83	14,26	
	4000	G1	31,67	4,04	0,5
		G3	28,50	7,04	
	6000	G1	49,33	7,23	0,25
		G3	38,83	4,17	
	8000	G1	45,00	7,55	0,55
		G3	48,00	6,32	
Esquerda	1500	G1	27,67	10,07	0,09
		G3	15,50	8,09	
	2000	G1	29,67	11,59	0,36
		G3	24,50	4,85	
	3000	G1	25,33	20,59	0,51
		G3	18,00	12,03	
	4000	G1	34,00	8,19	0,09
		G3	24,16	6,68	
	6000	G1	47,00	5,29	0,02*
		G3	39,33	2,66	
	8000	G1	49,00	9,64	0,07
		G3	37,50	6,62	

\*Valor menor que 0,05 significa diferença estatisticamente significativa. Teste de Tukey.

Com relação à avaliação do estado funcional do nervo auditivo através do PEATE, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas variáveis limiares, latência e amplitude da onda I, tanto na comparação entre os valores pré e pós de cada um dos grupos cujas cobaias foram expostas ao agrotóxico, como na comparação dos resultados pós experimento dos grupos 2 e 3 com o grupo controle.

As Tabelas 6 e 7 mostram os valores médios dos limiares, latência e amplitude da onda I nos dois grupos de cobaias que receberam o agrotóxico durante sete dias consecutivos, com resultados pré e pós experimento.

**Tabela 6** – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 2.

		<i>Limiar</i>		<i>Latência</i>		<i>Amplitude</i>	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Orelha Direita	Média	26,67	31,67	1,29	1,77	2,79	2,39
	Desvio Padrão	13,66	7,53	0,12	0,11	1,53	1,38
	Valor de p	0,45		0,8		0,64	
Esquerda	Média	25,00	30,00	1,13	1,17	2,05	1,87
	Desvio Padrão	8,37	10,95	0,56	0,11	1,09	1,33
	Valor de p	0,4		0,87		0,8	

**Tabela 7** – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I pré e pós intoxicação das cobaias do grupo 3.

		<i>Limiar</i>		<i>Latência</i>		<i>Amplitude</i>	
		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
Orelha Direita	Média	24,17	28,33	1,28	1,25	2,50	1,93
	Desvio Padrão	12,00	9,83	0,11	0,10	1,06	0,71
	Valor de p	0,53		0,66		0,24	
Esquerda	Média	26,67	26,67	1,24	1,18	2,31	2,17
	Desvio Padrão	8,16	12,11	0,08	0,06	0,93	1,13
	Valor de p	1,00		0,2		0,82	

As Tabelas 8 e 9 mostram os valores médios dos limiares, latência e amplitude da onda I nos dois grupos de cobaias que receberam o agrotóxico durante sete dias consecutivos, em comparação com resultados encontrados no grupo controle.

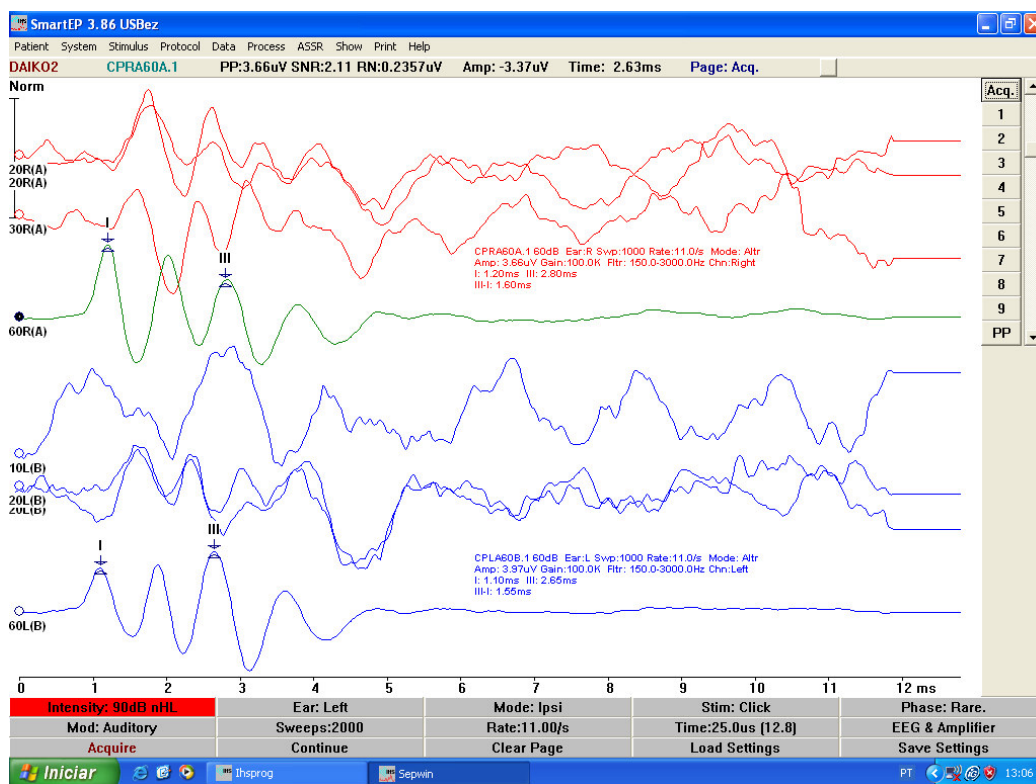
**Tabela 8** – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I entre as cobaias dos grupos 1 (G1) e 2 (G2).

		<i>Limiar</i>		<i>Latência</i>		<i>Amplitude</i>	
		G1	G2	G1	G2	G1	G2
Orelha Direita	Média	30	31,67	1,28	1,77	3,01	2,39
	Desvio Padrão	10	7,53	0,11	0,11	0,70	1,38
	Valor de p	0,79		0,98		0,5	
Esquerda	Média	26,67	30,00	1,24	1,17	2,44	1,87
	Desvio Padrão	11,54	10,95	0,17	0,11	1,63	1,33
	Valor de p	0,68		0,51		0,59	

**Tabela 9** – Comparação dos valores médios das latências absolutas, limiares e amplitudes da onda I entre as cobaias dos grupos 1 (G1) e 3 (G3).

		<i>Limiar</i>		<i>Latência</i>		<i>Amplitude</i>	
		G1	G3	G1	G3	G1	G3
Orelha Direita	Média	30	28,33	1,28	1,25	3,01	1,93
	Desvio Padrão	10	9,83	0,11	0,10	0,70	0,71
	Valor de p	0,82		0,76		0,07	
Esquerda	Média	26,67	26,67	1,24	1,18	2,44	2,17
	Desvio Padrão	11,54	12,11	0,17	0,06	1,63	1,13
	Valor de p	1,00		0,48		0,77	

A seguir, encontram-se dispostas figuras representando o exame de PEATE realizado nos três grupos estudados. A Figura 9 exemplifica um exame realizado em cobaia do grupo controle, na qual se observa presença da onda I na intensidade de 60 dB e limiar eletrofisiológico em 20 dB para ambas as orelhas (mínima intensidade na qual se verifica a presença da onda I).



**Figura 9** Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 1.

Os resultados do PEATE de cobaias expostas ao organofosforado encontram-se representados a seguir, demonstrando o exame pré e pós exposição do grupo 2 (Figuras 10 e 11, respectivamente), bem como exame pré e pós intoxicação do grupo 3 (Figuras 12 e 13, respectivamente).

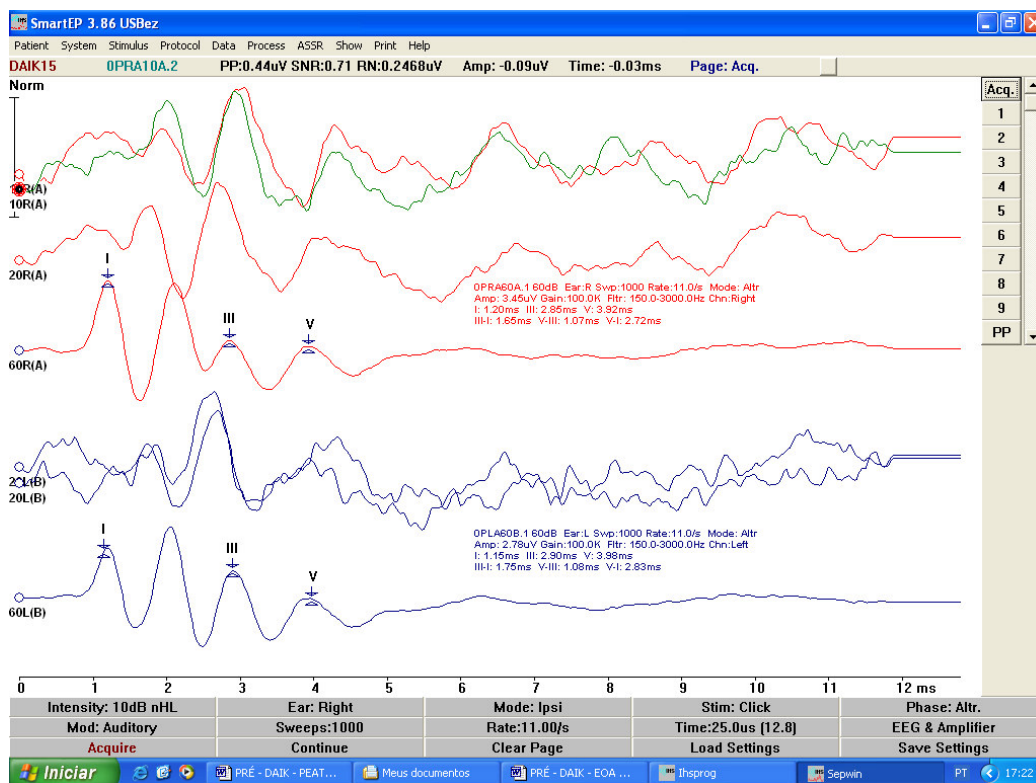


Figura 10 Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 2 pré intoxicação.

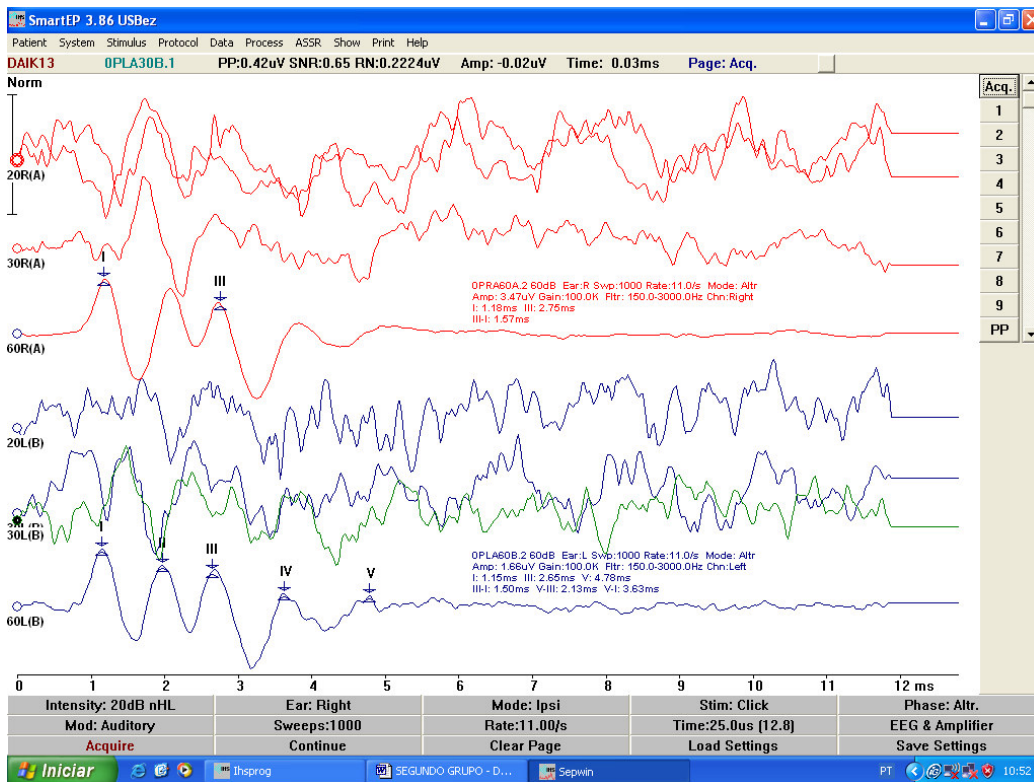


Figura 11 Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 2 pós intoxicação.

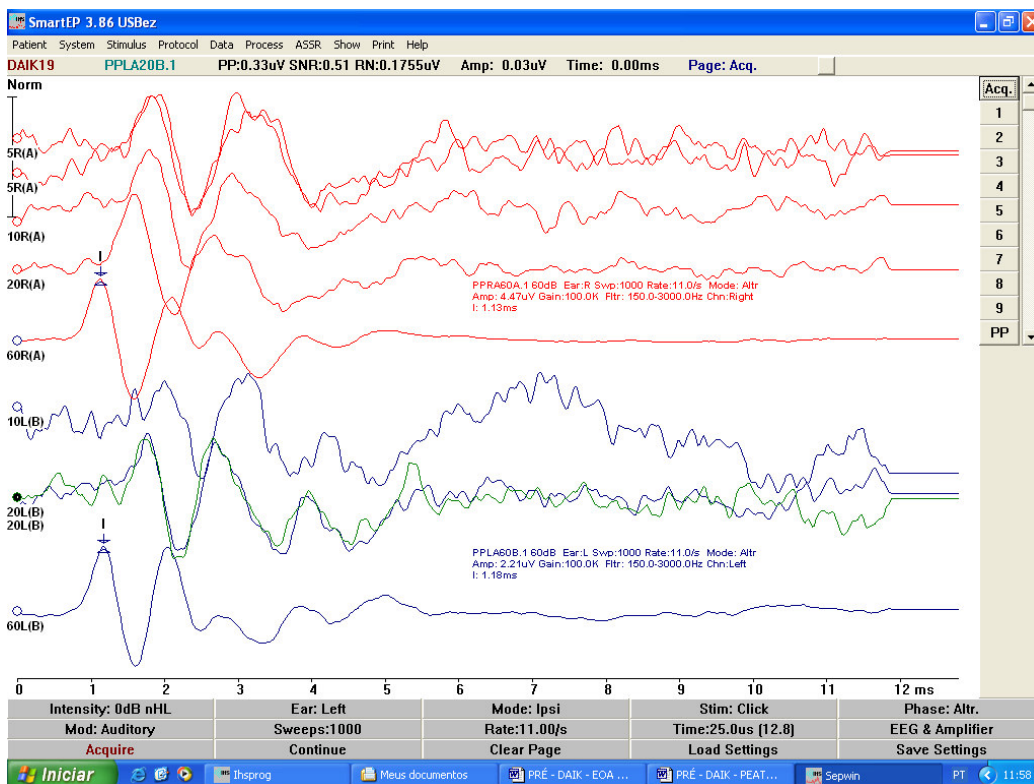
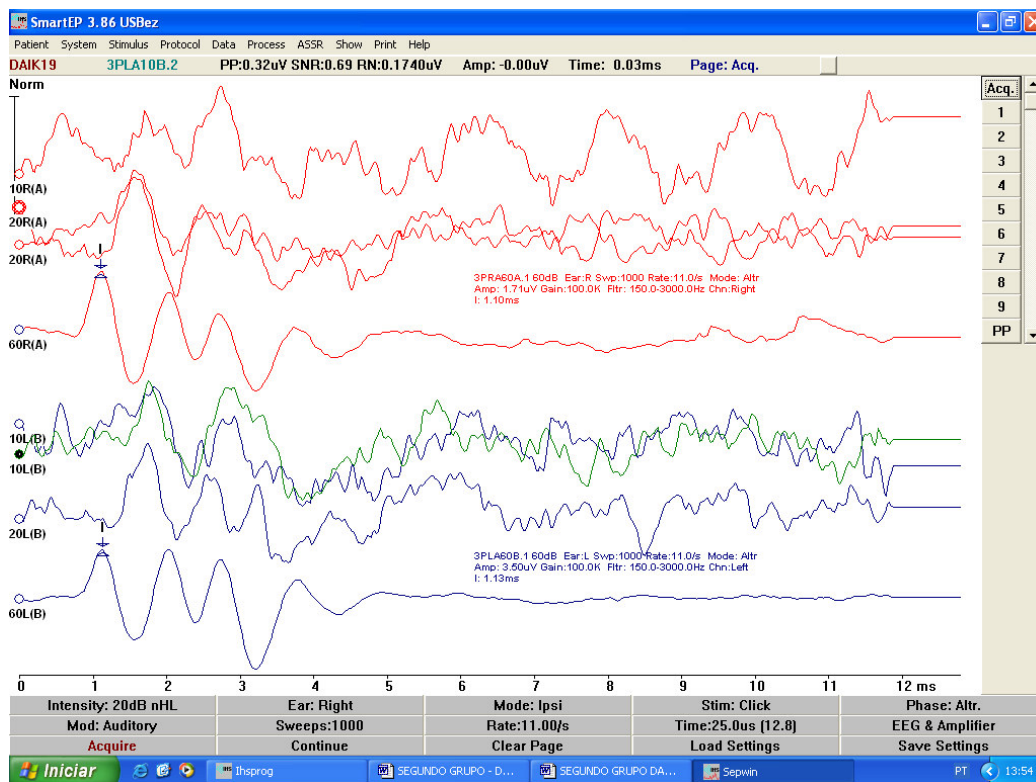


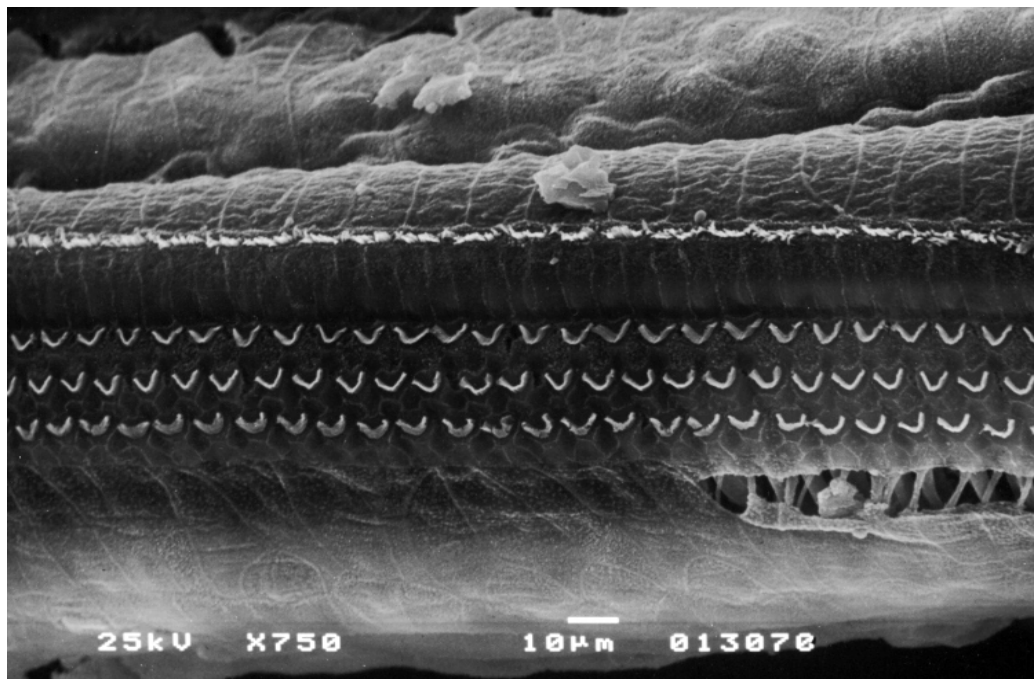
Figura 12 Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 3 pré intoxicação.



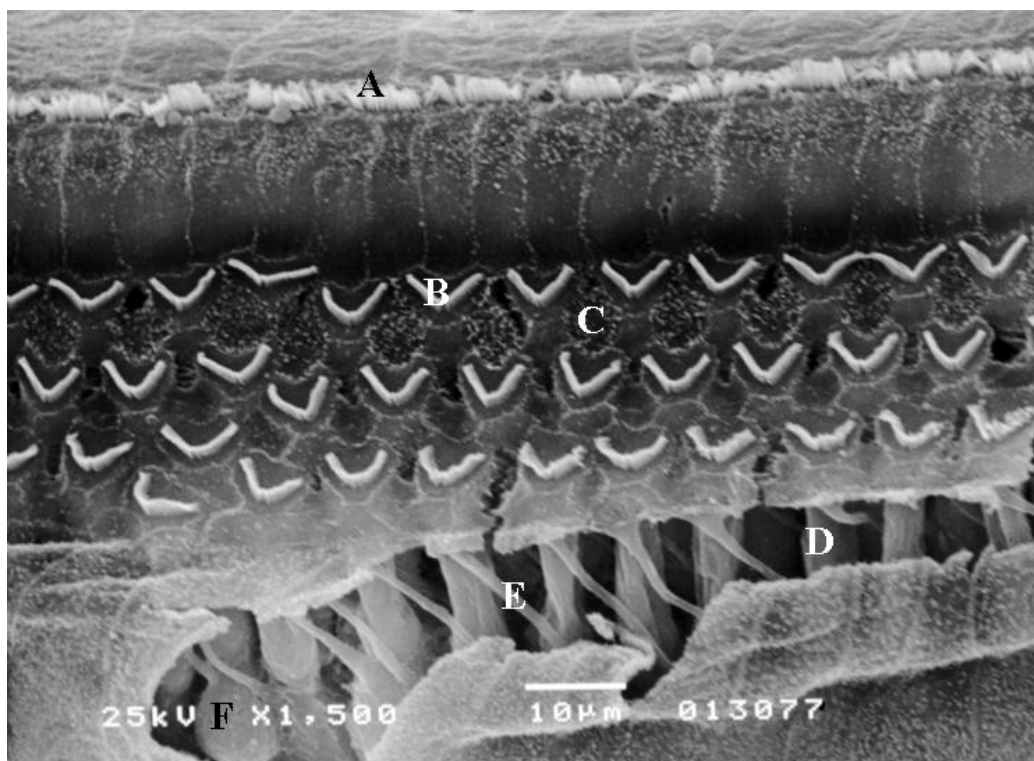


**Figura 13** Exemplo de traçados do PEATE de cobaia do grupo 3 pós intoxicação.

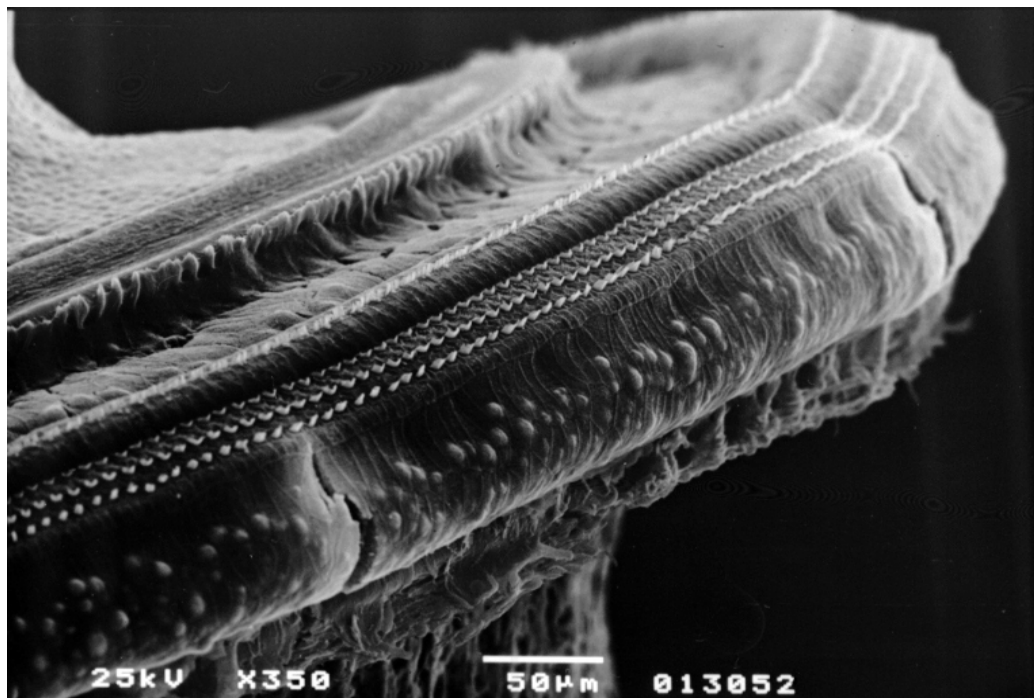
Para identificar as lesões provocadas pela administração do agrotóxico no sistema auditivo periférico, foi realizada a MEV das cócleas. Nas cobaias do grupo 1, observou-se a manutenção da arquitetura normal das CCE e CCI (Figuras 14, 15 e 16).



**Figura 14** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1. Observa-se a preservação das estruturas. Aumento de 750 vezes.



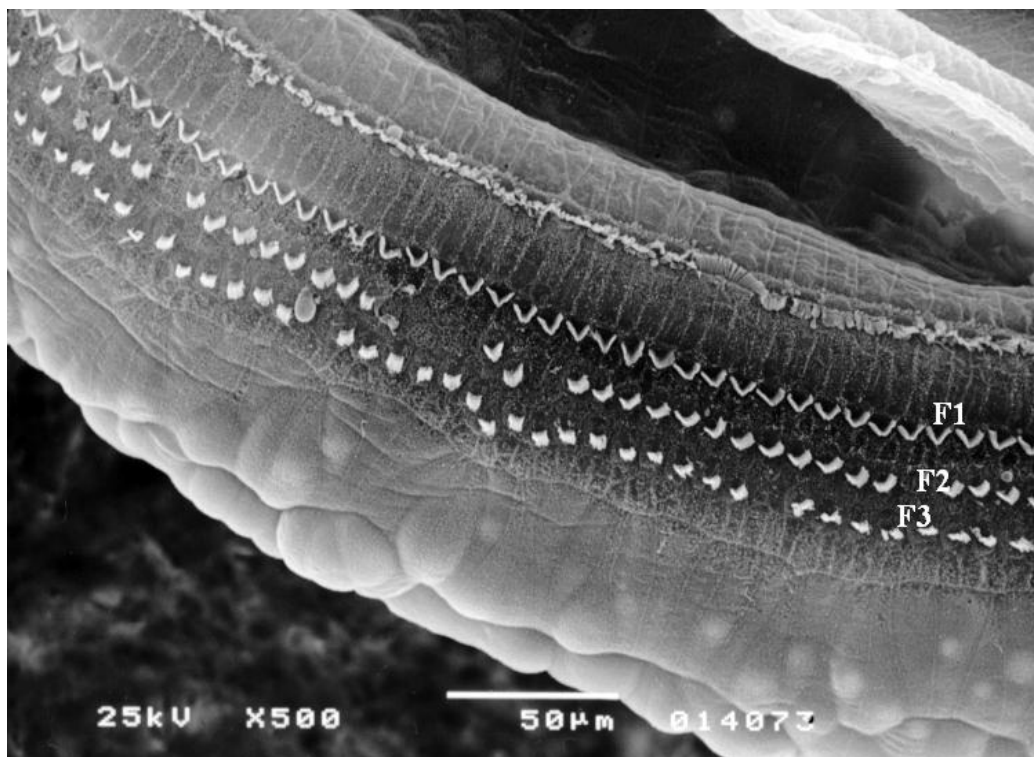
**Figura 15** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1, em “close”, mostrando: A – estereocílios das CCI; B – estereocílio da CCE; C – membrana reticular; D – CCE; E – prolongamento digital da célula de Deiters; F – células de Deiters. Aumento de 1.500 vezes.



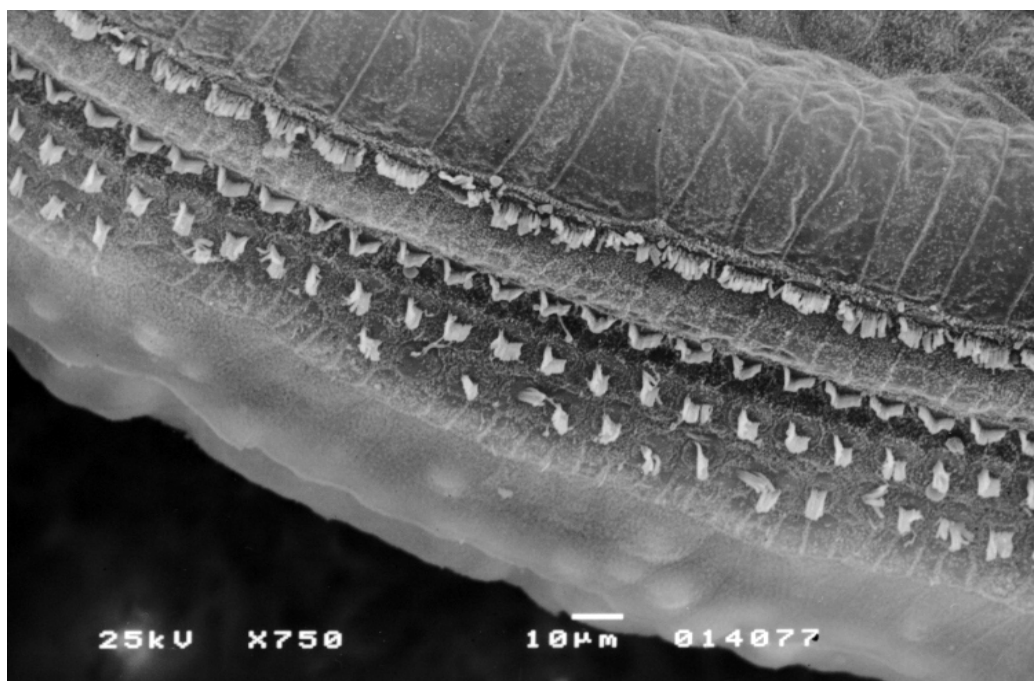
**Figura 16** Fotomicrografia de órgão de Corti normal de cobaia do grupo 1, em “panorâmica”, mostrando a E3. Aumento de 350 vezes.

Quanto à MEV dos grupos nos quais foram administradas doses de agrotóxico, observou-se alterações morfológicas em 83,3% das cócleas do grupo 2 (0,3 mg/Kg/dia) e em 100% das cócleas do grupo 3 (3 mg/Kg/dia), sendo as lesões mais extensas neste último grupo.

A avaliação anatômica do grupo 2, no qual foi administrado doses de 0,3 mg/Kg/dia, mostrou lesão de CCE em nível da E3, caracterizadas por distorção ciliar com desarranjo no padrão em W e encurtamento dos cílios, ou ainda, ausência dos mesmos. As alterações foram observadas na 2ª e 3ª fileiras, mais evidentes nesta última. Já as CCI apresentaram alterações na espira basal, E2 e E3, com cílios presentes, porém, com desarranjo na conformação em V. As alterações estão exemplificadas nas Figuras 17 e 18.

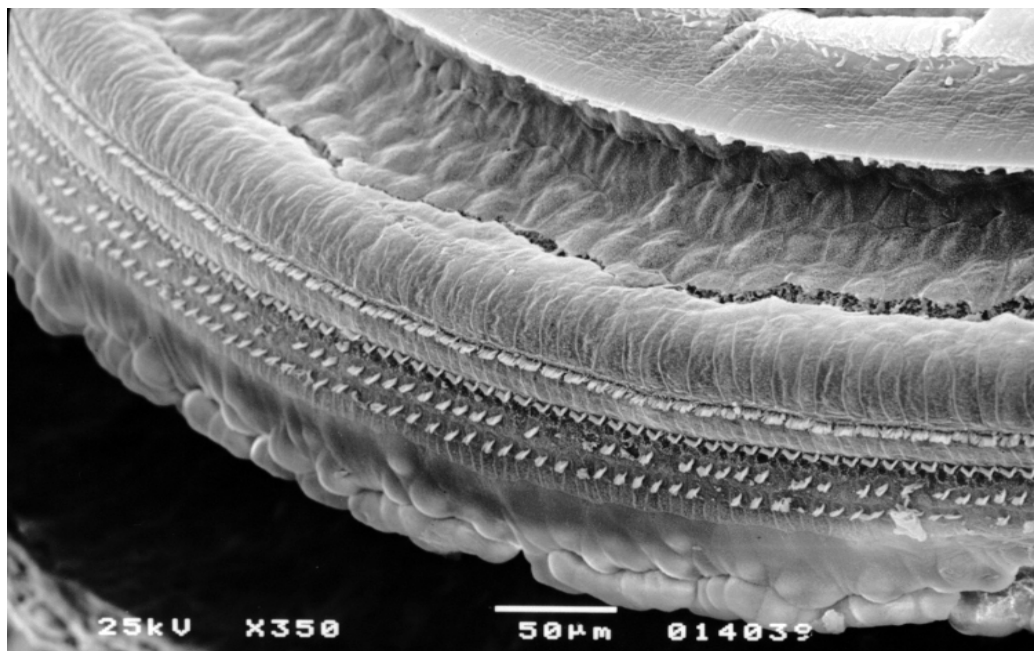


**Figura 17** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2, mostrando a E3, com deformação ou ausência dos cílios das CCE na 2ª e 3ª fileiras e cílios das CCI. F1: primeira fileira; F2: segunda fileira; F3: terceira fileira. Aumento de 500 vezes.

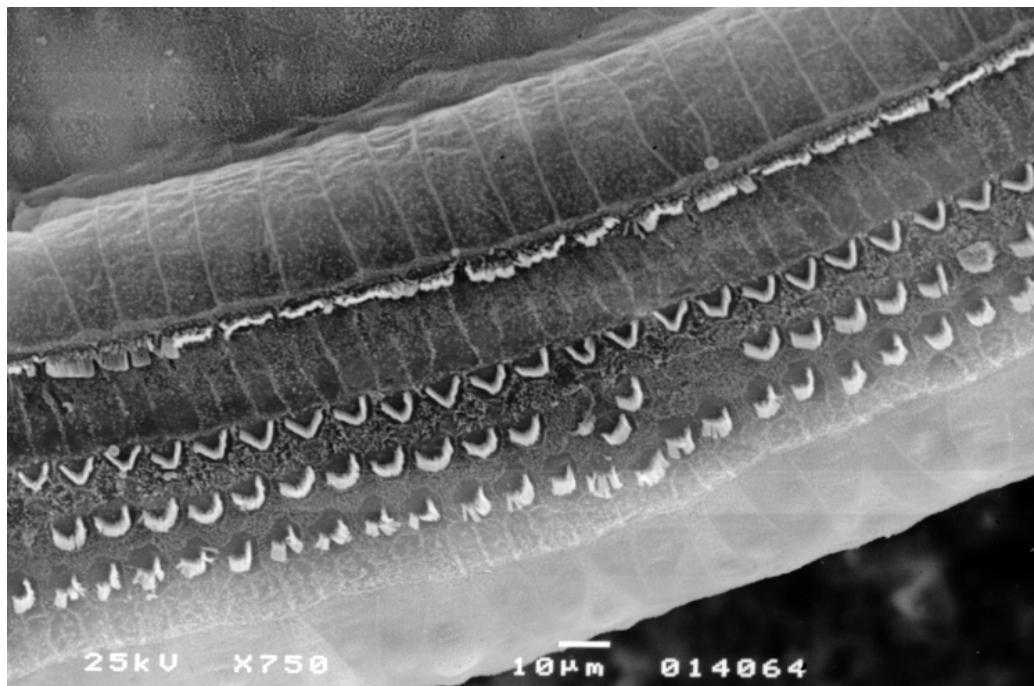


**Figura 18** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2, em “close” da E3. Aumento de 750 vezes.

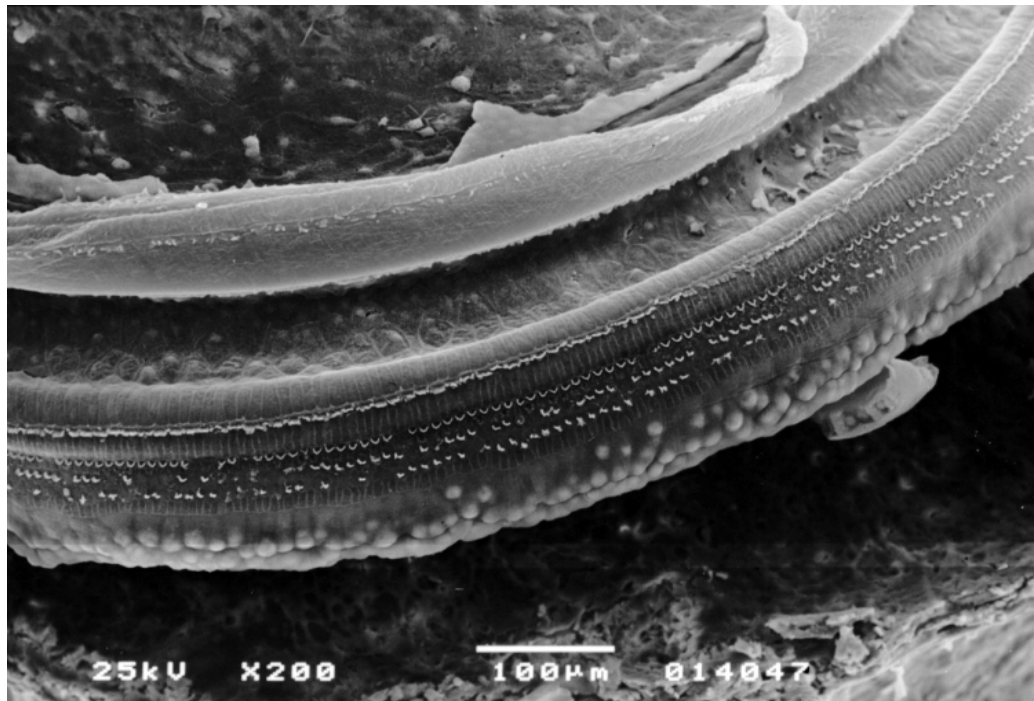
As alterações morfológicas encontradas no grupo 3, que recebeu doses de 3 mg/Kg/dia do agrotóxico, foram mais extensas e caracterizadas por ausência dos cílios das CCE, desarranjo no padrão em W, cílios dobrados e ausência parcial de um dos braços do W. As alterações morfológicas encontradas na espira basal acometeram somente a 3ª fileira das CCE, enquanto que na E2 a 2ª e 3ª fileira foram mais atingidas. Já na E3 observou-se lesão severa nas três fileiras das CCE. Os cílios das CCI também mostraram irregularidades na sua conformação, estando encurtados e fundidos nas três espiras analisadas. As alterações encontradas estão demonstradas nas Figuras 19, 20, 21 e 22.



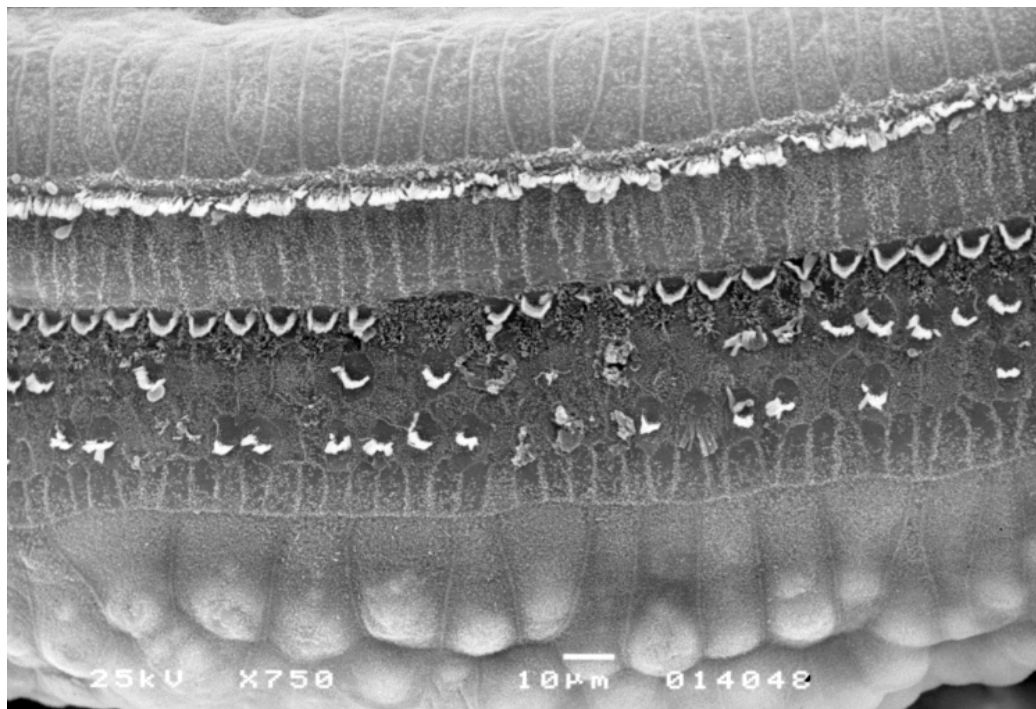
**Figura 19** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3, em “panorâmica” da E2. Observam-se alterações ciliares nas 2ª e 3ª fileiras de CCE. Aumento de 350 vezes.



**Figura 20** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3, em “close” da E2. Aumento de 750 vezes.



**Figura 21** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3, em “panorâmica” da E3. Observa-se extensa lesão de CCE, com deformação e ausência de cílios. Aumento de 200 vezes.



**Figura 22** Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3, em “close” da E3. Aumento de 750 vezes.

## 5 DISCUSSÃO

Neste capítulo, com a finalidade de cumprir com o objetivo anteriormente proposto, de estudar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados no sistema auditivo periférico de cobaias, foi realizada uma análise crítica dos resultados obtidos na presente pesquisa.

Quando possível, realizou-se também correlações com resultados compilados e descritos por outros pesquisadores da área de Audiologia que buscam esclarecer as relações entre as alterações no sistema vestibulococlear e a exposição aos agrotóxicos em seres humanos. Foram feitas correlações ainda com dados apresentados por estudiosos cujas metodologias de pesquisas estão concentradas no manejo com animais de laboratórios, principalmente cobaias. Essas duas áreas estão descritas na maioria das vezes de forma independente, uma vez que não foram encontrados trabalhos cujo objetivo fosse semelhante ao desse estudo.

O presente estudo buscou pela primeira vez analisar a ação do uso de um agrotóxico diretamente sobre as estruturas que desempenham funções primordiais no sistema auditivo, sendo este o ponto divergente em relação às outras pesquisas realizadas por autores anteriormente citados, nas quais foram observadas alterações somente à nível sintomático e funcional.

Na avaliação funcional do sistema auditivo, as EOAPD se mantiveram presentes em todas as cobaias dos três grupos analisados, mesmo àquelas que sofreram intoxicação pelo organofosforado durante sete dias consecutivos (grupos 2 e 3), conforme demonstrado na Tabela 1.

Collet et al. (1989) observaram que, nos seres humanos, as emissões otoacústicas se tornam ausentes quando uma perda auditiva em 1 KHz for superior a 40 dB NA e quando a média audiométrica de 0,5; 1; 2 e 4 KHz exceder 45 dB NA, indicando assim que a presença de EOA indica a integridade funcional - total ou parcial - das CCE.

Já em investigação realizada por Collet et al. (1993), na qual foram analisadas 931 orelhas com perda auditiva coclear de diversas patologias, sem comprometimento retrococlear ou de orelha média, os achados mostraram que a presença das emissões refletia o limiar auditivo da melhor frequência auditiva e não somente das frequências médias. Este fato



reforçou a teoria de que a presença das emissões não dependia da integridade da cóclea inteira ou de audição normal, mas que, pelo menos, uma frequência entre 2,5 e 8 KHz tivesse limiar igual ou menor que 40 dB NA.

Conforme preceitos de Azevedo (2003), as EOAPD podem estar presentes em perdas auditivas de grau leve a moderado (de até 50 dB). Dessa maneira, a presença de respostas no teste de EOA pode ter ocorrido em função da não dependência da integridade total da cóclea e sugere que a exposição aguda ao organofosforado, nas condições da presente pesquisa, não provoca alterações nos limiares auditivos superiores a 50 dB. Confirmando tal constatação, pôde-se encontrar em estudo com trabalhadores expostos a agrotóxicos do grupo dos organofosforados, realizado por Ernest (1995), uma alta incidência de neuropatias periféricas e presença de perdas auditivas do tipo neurossensorial de grau leve a moderado.

No entanto, divergindo dos achados do presente estudo, com relação à exposição aguda ao organofosforado, Harell, Shea e Ermett (1987) relataram um caso no qual foram verificados, após oito a nove horas da intoxicação, sintomas como visão turva e náusea e, decorridos quatro dias da intoxicação, foi constatada perda auditiva bilateral de grau profundo.

No que se refere à análise da relação sinal/ruído, as Tabela 2 e 3 mostram os valores encontrados para cada uma das frequências avaliadas, numa comparação com as EOAPD realizadas antes e após o período de exposição ao organofosforado, apresentando os resultados dessa comparação tanto para o grupo 2 como para o grupo 3. Para ambos os grupos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores da variável relação sinal/ruído em nenhuma frequência, indicando que uma exposição aguda pelo período de sete dias, apesar de provocar lesões cocleares, não acarretou em danos funcionais do sistema auditivo. Este achado reforça o fato de que a integridade parcial das estruturas do órgão de Corti seja suficiente para desencadear uma resposta ao estímulo sonoro evocado.

Já na análise comparativa da relação sinal/ruído feita entre os achados das EOAPD pós exposição do grupo 2 e o grupo controle, observou-se diferença estatística altamente significativa nas frequências de 1.500 e 6.000 Hz da orelha direita, conforme apresentado na Tabela 4. Resultados semelhantes foram observados na comparação realizada entre os valores da relação sinal/ruído do grupo 3 com o grupo controle, na qual verificou-se correlação estatística significativa nas mesmas frequências do grupo 2. Porém, neste grupo que recebeu dose mais elevada do agente tóxico, a significância para 1.500 Hz foi observada na orelha direita, enquanto que 6.000 Hz apresentou diferença significativa na orelha esquerda.

A diferença estatisticamente significativa observada nos valores médios da relação sinal/ruído das cobaias dos grupos intoxicados quando comparadas aos animais do grupo controle pode ser um indicativo de início de sofrimento das CCE por agressão na estrutura ciliar das mesmas, provocada pela inserção do agrotóxico no organismo, o que futuramente acarretaria em alteração na função destas células.

De acordo com Brownell et al (1985), as CCE têm capacidade de dois tipos de contração, rápida e lenta, sendo efetores cocleares ativos devido à eletromotilidade, ou seja, suas propriedades mecânicas. Seriam estas células, devido à energia mecânica liberada na contração rápida, responsáveis pelas EOA. Assim, pode-se supor que uma diminuição da relação sinal/ruído poderia advir da redução na amplitude das respostas de energia de audiodiferença da cóclea, uma vez que as CCE, responsáveis por esta geração de resposta, estaria em processo de alteração estrutural.

Segundo Patuzzi (1993), qualquer lesão coclear que interrompa a micromecânica da cóclea por alterações da morfologia ou do processo eletromecânico das CCE reduziria a vibração do órgão de Corti e conseqüentemente da EOA.

Somado a essas considerações, encontra-se o fato de que as EOA são controladas pelo sistema eferente olivococlear medial cruzado que chega às CCE, alterando as contrações rápidas através de contrações lentas, tipo muscular (actina e miosina), sendo a acetilcolina o mediador liberado (OLIVEIRA, 2003). Devido ao organofosforado ser conhecido por seu efeito anticolinesterásico, influenciando sobre o mecanismo de liberação da enzima acetilcolinesterase, alterações na hidrólise da acetilcolina poderiam estar contribuindo para a redução das respostas das CCE.

A correlação estatística encontrada na frequência de 6.000 Hz encontra respaldo na literatura, uma vez que diversas pesquisas indicam perda auditiva nas altas frequências decorrentes da exposição aos ototóxicos. De acordo com Morata e Little (2002), a configuração da perda auditiva provocada por substâncias químicas industriais, tais como os organofosforados, pode ser muito semelhante àquela observada em drogas ototóxicas, bem como àquela relacionada ao ruído, nas quais se observa perda auditiva neurossensorial para frequências de 3 a 6 Khz, com lesão principalmente em células ciliadas da cóclea.

Teixeira e Brandão (1998), em estudo realizado com trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos do tipo organofosforado e piretroide, sem exposição a ruído, foi constatado que 57% apresentaram perda auditiva neurossensorial nas frequências altas. Resultados

semelhantes foram observados por Hoshino et al. (2008), que encontraram uma incidência 38,8% de perda auditiva do tipo neurossensorial, sendo que 22,22% dos trabalhadores apresentaram queda nas frequências de 6.000 e 8.000 Hz.

Da mesma forma como foi constatada diferença estatisticamente significativa nos valores médios da relação sinal/ruído em 6.000 Hz, a frequência de 1.500 Hz também apresentou significância estatística quando comparados os valores da relação sinal/ruído das cobaias dos grupos intoxicados com os animais do grupo controle. Estudos sugerem que, além das frequências agudas, a intoxicação por agrotóxicos também pode acometer outras frequências, conforme verificado por Manjabosco, Morata e Marques (2004). Os autores, em uma pesquisa com trabalhadores agrícolas expostos a diversos tipos de agrotóxicos, encontraram perda auditiva neurossensorial bilateral como a alteração mais frequente, com elevação dos limiares na faixa de frequências de 3.000 a 6.000Hz. No entanto, também foram encontradas alterações nas frequências de 1.000 e 2.000 Hz.

Outro fato que pode ter contribuído para o aparecimento desta diferença estatisticamente significativa demonstrada na relação sinal/ruído da frequência de 1.500 Hz é explicado por Azevedo (2003). De acordo com o autor, as EOAPD são mais limitadas nas frequências baixas, nas quais o ruído apresenta maior interferência, sendo o melhor desempenho do teste ocorreria nas frequências acima de 2.000 Hz, pois o ruído diminui com o aumento da frequência.

Neste estudo as EOAPD se mantiveram presentes após período de intoxicação, porém houve redução da amplitude da relação sinal/ruído em determinadas frequências, o que está de acordo com Aquino, Oliveira e Rossato (2008), que administraram drogas ototóxicas em cobaias e também observaram presença das EOAPD, porém com diminuição da amplitude das respostas ao término do experimento. Estes animais com redução da amplitude das EOAPD apresentaram um grau de lesão em CCE maior que aquelas sem esta variação. Em vista do achado, os pesquisadores concluíram que a redução da amplitude correlaciona-se com o aumento do número de CCE lesadas, sendo este achado de grande importância por mostrar correlação entre estas duas variáveis, o que induz que não só a presença mas também a diminuição da amplitude da relação sinal/ruído deve ser observada.

Com relação à avaliação do estado funcional do nervo vestibulococlear, o teste comparativo entre os resultados das variáveis limiar, latência e amplitude da onda I do PEATE pré e pós exposição ao organofosforado tanto do grupo 2 como do grupo 3 encontrou valores de p maiores do que 0,05, não existindo diferença estatisticamente significativa entre

as duas fases do experimento (Tabelas 6 e 7). Portanto, a intoxicação aguda por um período de sete dias consecutivos não ocasionou alterações funcionais no VIII par craniano quando analisado por meio da onda I do PEATE.

Foi realizada ainda uma análise estatística entre os valores das médias de limiar, latência e amplitude da onda I encontrados no PEATE pós intoxicação dos grupos 2 e 3 em comparação ao grupo controle (Tabelas 8 e 9). Da mesma forma, não houve correlação estatística significativa entre as cobaias dos grupos expostos de forma aguda ao organofosforado e as cobaias do grupo controle.

Os achados do presente estudo estão de acordo com a literatura, segundo a qual a perda auditiva nas altas frequências não gera influência, pronunciadamente, nas ondas do PEATE, até atingir 60 dB NA em 4.000 Hz. Quando presente, essa influência se daria, sobretudo, na latência da onda V (HALL, 1992). Musiek et al. (1999) complementa que em perdas auditivas de até 65 dB para frequências a partir de 1.000 Hz, ainda é possível observar a presença de todas as ondas.

Em decorrência da ausência de alterações estatisticamente significativas neste exame, no que diz respeito às variáveis limiar, latência e amplitude, nos grupos cujas cobaias receberam doses diárias de agrotóxico, pode-se inferir que a exposição aguda ao agente tóxico durante o período estabelecido para a pesquisa, ou seja, uma exposição durante sete dias consecutivos, nas doses estabelecidas para cada grupo, não provoca mudanças nos limiares auditivos superiores a 65dB nas frequências acima descritas, sendo, permitindo, portanto, a captação das respostas da onda I do PEATE.

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

Com relação à neuropatias retardadas, Benedico (2002) relatou que os sinais surgem de duas a quatro semanas após a exposição ao agrotóxico, consistindo em uma degeneração axonal. Dessa forma, pode-se supor que alterações poderiam ser observadas em nível de VIII par craniano e demais estruturas que compõe a via auditiva se houvesse maior período de latência entre a última aplicação do organofosforado e a realização do PEATE para os grupos

2 e 3. A observação a longo prazo da ação do organofosforado no sistema auditivo periférico, porém, não se constituiu em objetivo desse experimento.

Outra explicação para o não aparecimento de alterações em nível de nervo auditivo pode ser a forma na qual foi provocada a intoxicação, sendo a mesma de caráter agudo. Autores remetem ao fato de que as alterações no sistema auditivo surgem a partir de exposições crônicas ao organofosforado. Em pesquisas mais recentes, através de um grupo de trabalhadores expostos a inseticidas do tipo organofosforado e piretroide, foi constatado que as exposições crônicas a estes inseticidas afetam o sistema auditivo nos níveis periférico e central (TEIXEIRA, 2000; TEIXEIRA, AUGUSTO e MORATA, 2002; TEIXEIRA, AUGUSTO e MORATA, 2003).

De acordo com Cantarutti (2005), os efeitos neurotóxicos estão relacionados à intoxicação crônica, e, uma vez que os agentes neurotóxicos alteram a função vestibular e/ou auditiva agindo nas vias auditivas centrais e SNC e periférico (JOHNSON, 1993; MANJABOSCO, 2005), exposições agudas não seriam suficientes para provocar lesões funcionais no sistema auditivo.

Em conformidade com a metodologia descrita na literatura, por pesquisa de KASSE et al., 2008, que buscaram avaliar a ototoxicidade de drogas medicamentosas, realizou-se neste estudo uma análise descritiva dos dados da MEV.

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

Estes achados confirmam a tendência de progressão das lesões morfológicas conforme o grau de intoxicação ocorrido com o organofosforado, visto o maior número de lesões observadas no grupo 3 em relação ao grupo 2, sendo que o primeiro foi aquele cujas cobaias receberam uma dose maior do agrotóxico.

Estudos realizados em cobaias submetidas a drogas ototóxicas revelam resultados divergentes aos do presente estudo, na observação à MEV. Na exposição à amicacina, lesões

ocorreram predominantemente nas duas primeiras espiras que, desta forma, apresentaram um menor número de CCE normais do que na E3. As alterações estruturais foram mais intensas na primeira fileira de CCE, seguidas pela segunda fileira (AQUINO, OLIVEIRA e ROSSATO, 2008). Tais achados concordam com resultados da pesquisa de Oliveira e Bernal (2003), que referiram que os aminoglicosídeos provocam lesões no órgão de Corti predominantemente nas CCE, com progressão da agressão da base para o ápice da cóclea, sendo a primeira fileira de CCE também a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e terceira fileiras.

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

Quanto ao padrão de lesão encontrados no presente estudo, a análise morfológica mostrou como alterações predominantes a ausência de estereocílios e deformidades na conformação em W dos mesmos, o que vem de encontro aos resultados obtidos em pesquisas de Oliveira, Canedo e Rossato (2002), Aquino (2007) e Aquino, Oliveira e Rossato (2008).

Apesar das alterações histológicas encontradas à nível coclear, as EOAPD se mantiveram presentes nas cobaias de ambos os grupos nos quais foi administrado o organofosforado durante o período de sete dias consecutivos. Este fato pode ser explicado observando na microscopia eletrônica dessas cobaias, lesões em um grande número de CCE, porém, em algumas fileiras, células se encontravam conservadas ou somente com alterações estruturais leves, sem perda dos cílios, podendo, neste caso, gerar uma boa resposta em determinadas frequências das EOAPD, como apontado por Kasse et al. (2008), em sua pesquisa relacionada à ototoxicidade da cisplatina em cobaias.

## **Considerações finais**

Este estudo, no qual administrou-se duas concentrações diferentes do agrotóxico organofosforado Tamaron® durante o período de sete dias consecutivos, mostrou que o agrotóxico apresentou uma ação ototóxica sobre o sistema auditivo periférico de cobaias, mesmo a exposição sendo de caráter agudo. Considera-se tal fato uma vez que, na MEV, pôde-se verificar alterações na citoarquitetura das CCE de cobaias pertencentes aos grupos que sofreram intoxicação por organofosforado, sendo que o aumento de tais alterações estruturais acompanhou o aumento da dosagem do agrotóxico aplicada.

As cobaias dos grupos submetidos ao agrotóxico apresentaram EOAPD presentes após a última administração do agente tóxico, indicando que a intoxicação aguda não causou alteração funcional da cóclea. No entanto, observou-se diferença estatisticamente significativa nos valores médios da relação sinal/ruído das frequências de 1.500 e 6.000 Hz em ambos os grupos intoxicados quando confrontados com os achados das cobaias do grupo controle, indicando um possível sofrimento celular.

Não foi observada alteração funcional do nervo auditivo em decorrência da exposição aguda a agrotóxico do grupo dos organofosforados quando analisada através da onda I do PEATE.

Trabalhos de pesquisa que investiguem a ototoxicidade - cocleotoxicidade e vestibulotoxicidade - utilizando agrotóxicos permitem aprimorar os conhecimentos sobre anatomofisiologia da orelha interna e vias auditivas, sendo este o passo inicial para a descoberta de meios de prevenção e proteção mais eficientes do órgão de Corti.

Acredita-se que pesquisas que investiguem as alterações anatômicas das células ciliadas e demais estruturas do órgão de Corti, concomitantes à avaliação funcional do sistema auditivo, sejam a melhor forma para elucidar os mecanismos de lesão ototóxica dos agrotóxicos e permitir um melhor controle das alterações com medidas de prevenção da toxicidade da orelha interna.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de pesquisas complementares com característica de intoxicação não somente aguda, mas também de caráter crônico, para esclarecer o impacto dos agrotóxicos no organismo, especificamente no sistema auditivo, por meio de trabalhos com animais experimentais com perspectivas de aplicabilidade na espécie humana.

## 6 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos conclui-se que:

- O organofosforado pode ser considerado um agente lesivo agudo das CCCE visto a correlação entre a dosagem aplicada e a quantidade de alterações observadas à microscopia eletrônica, em cobaias.
- As lesões morfológicas da cóclea ocorrem de maneira predominante nos estereocílios das CCE e progridem da E3 para a espira basal.
- A terceira fileira de estereocílios das CCE é a primeira a ser atingida quando da intoxicação por organofosforado, ocorrendo progressão das alterações estruturais para a segunda e primeira fileiras.
- A exposição aguda ao organofosforado Tamaron®, durante o período de sete dias consecutivos de intoxicação, não causou alteração funcional do sistema auditivo periférico das cobaias avaliadas, uma vez que não foram detectadas evidências de alteração nos testes de EOAPD e PEATE.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBUQUERQUE, A.S. **Estudo comparativo da estrutura da orelha interna de ratos e cobaias através da microscopia eletrônica de varredura**. 2006. 59 f. Monografia (Especialização em Ciências Agrárias e Veterinárias) - Universidade de São Paulo, Jaboticabal, 2006.

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

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

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

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

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

AZEVEDO, M.F. Emissões otoacústicas. In: FIGUEIREDO, M.S. (org.). **Conhecimentos essenciais para entender bem: emissões otoacústicas e BERA**. São José dos Campos: Pulso, 2003. p. 35-83.

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

BECKETT, W.; CHAMBERLAIN, D.; HALLMAN, E.A. Hearing conservation for farmers: source apportionment of occupational and environment factors contributing to hearing loss. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 42, p. 806- 813, 2000.

BEDOR, C.N.G.; RAMOS, L.O.; REGO, M.A.V.; PAVÃO, A.C.; AUGUSTO, L.G.S. Avaliação e reflexos da comercialização e utilização de agrotóxicos na região do submédio do Vale do São Francisco. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Bahia, v. 31, n. 1, p. 68-76, 2007.

BENEDICO, E.C. Insecticidas organofosforados: de la guerra química al riesgo laboral y doméstico. **Medifam**, v. 12, n. 5, p. 333-340, 2002.

BERNARDI, A.P.A. Testes utilizados na avaliação de trabalhadores expostos a níveis de pressão sonora elevados e solventes. In: BERNARDI, A.P.A. (org.). **Conhecimentos essenciais para atuar bem em empresas: audiologia ocupacional**. Coleção CEFAC, São José dos Campos: Pulso, 2003. p. 67-80.

BROWNELL, W.E.; BADER, C.R.; BERTRAND, D.; RIBAU-PIERRE, Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. **Science**, v. 227, p. 194, 1985.

CANTARUTTI, T.F.P. **Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos wistar**. 2005. 60 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Melhoramentos, 1962. 305 p.

CASTRO, J.S.M.; CONFALONIERI, U. Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu (RJ). **Ciências de Saúde Coletiva**, v. 10, n. 2, p. 473-482, 2005.

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

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

COLLET, L.; GARTNER, M.; MOULIN, A.; KAUFFMANN, I.; DISANT, F.; MORGON, A. Evoked otoacoustic emission and sensorineural hearing loss. **Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 115, p. 1060-1062, 1989.

COLLET, L.; LEVY, V.; VEUILLET, E.; TRUY, E.; MORGON, A. Click-evoked otoacoustic emissions on hearing thresholds sensorineural hearing loss. **Ear and Hearing**, v. 3, n. 2, p. 141-3, 1993.

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

ECOBICHON, D.J.; JOY, R.M. Pesticides and neurological diseases. In: CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Toxicology the basic science of poisons**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 565-622.

ERNEST, K. Delayed effects of exposure to organophosphorus compound. **Indian Journal of Medical Research**, v. 101, p. 81-84, 1995.

FERRER, A. Intoxicación por plaguicidas. **Anales Sis San Navarra**, Pamplona, supl 1, v. 26, p.155-171, 2003.

GARCIA, E.G. **Segurança e saúde no trabalho rural com agrotóxico: contribuição para uma abordagem mais abrangente**. 1996. 211 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

GARCIA, A.P.; IÓRIO, M.C.M.; PETRILLI, A.S. Monitoramento da audição em pacientes expostos a cisplatina. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.69, n.2, p. 215-221, 2003.

GODINHO, A.F.; SILVA, D.A.F.; MERCADANTE, A.; SARTORI, A.M.A. Neonatal rat exposure to pyrethroid and organophosphate insecticides: a physiological and biochemical trial of progeny. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 159-167, 2003.

GOLDENBERG, S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, n. 1, editorial, 2000.

HALL, J.W. **Handbook of auditory evoked responses**. Boston: Allyn and Bacon, 1992. 871 p.

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

HE, N.J.; SCHMIEDT, R.A. Fine structure of the 2F1-F2 acoustic distortion product: changes with primary level. **Journal of the Acoustical Society of America**, Lancaster, v. 94, n.5, p. 2659-2669, 1993.

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

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

HYPPOLITO, M.A.; OLIVEIRA, A.A.; LESSA, R.M.; ROSSATO, M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produtos de distorção e microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 268-273, 2005.

INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES, COMMISSION ON LIFE SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório**. Goiânia, GO, 2003.

ISHIYAMA, A.; LOPEZ, I.; WACKYM, P.A. Distribution of efferent cholinergic terminals and alpha-bungarotoxin binding to putative nicotinic acetylcholine receptors in the human vestibular end-organs. **Laryngoscope**, v. 105, p. 1167-1172, 1995.

JAGA, K.; DHARMANI, C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health**, v. 14, n. 3, p. 171-85, 2003.

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

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

KARABAY, N.U.; OGUZ, M.G. Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 653-662, 2005.

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

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

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

LIANG, Y.; ZHAN, N. Determination of normal values and analysis of their relation for distortion product otoacoustic emission in guinea pigs. **Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi**, v. 12, n. 3, p. 124-127, 1998.

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

LINSS, V.; LINSS, W.; EMMERICH, E.; RICHTER, F. The cochleogram of the guinea pig. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck**, v.264, n.4, p.369-375, 2006.

LUKASHKIN, A.N.; RUSSEL, I.J. Dependence of the DPOAE amplitude pattern on acoustical biasing of the cochlear partition. **Hearing Research**, v. 203, p.45-53, 2005.

MANJABOSCO, C.A.W.; MORATA, T.C.; MARQUES, S.J.M. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 284-295, 2004.

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

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

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

MICHAELIS, C.E.; GEHR, D.D.; DEINGRUBER, K.; ARNOLD, W.; LAMM, K. Optimum primary tone level setting for measuring high amplitude DPOAEs in guinea pigs. **Hearing Research**, v. 189, n.1, p. 58-62, 2004.

MORAES, A. C. L. de. **Contribuição para o estudo das intoxicações por carbamatos: o caso do chumbinho no Rio de Janeiro**. 1999. 111 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.

MORATA, T.C. Study of the effect of simultaneous exposure to noise and carbon disulfide on worker hearing. **Scand Audiol**, v. 18, p. 53-58, 1989.

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

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

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

MUSIEK, F.; BOREINSTEIN, S.; HALL, J.; SCHWABER, M. Audiometria de tronco encefálico (ABR): neurodiagnóstico e aplicações intra-operatórias. In: KATZ, J. **Tratado de Audiologia Clínica**. São Paulo: Manole, 1999. p. 349-371.

NUTALL, A.L.; GROSH, K.; ZHENG, J.; DE BOER, E.; ZOU, Y; REN T. Spontaneous basilar membrane oscillations and otoacoustic emission at 15 kHz in a guinea pig. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, v.5, p. 337-348, 2004.

OLIVEIRA, J.A.A. Fisiologia da audição – cóclea ativa. In: FIGUEIREDO, M.S. (org.). **Conhecimentos essenciais para entender bem Emissões Otoacústicas e BERA**. São José dos Campos: Pulso, 2003. p. 11-34.

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

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

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.N.; MATTOS, R.C.O.C.; et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

PALACIOS-NAVAS, M.E.; PAZ-ROMÁN, P.; HERNÁNDEZ-ROBLES, S.; MENDONZA-ALVARADO, L. Sintomatología persistente em trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. **Salud Pública de México**, v. 41, n. 1, p. 55-61, 1999.

PATUZZI, R. Otoacoustic emissions and the categorization of cochlear and retro-cochlear lesions. **Brasílian Journal of Audiology**, São Paulo, v. 27, p. 91-95, 1993.

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

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

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

PROTOCOLOS DE PROCEDIMENTOS MÉDICO-PERICIAIS EM DOENÇAS PROFISSIONAIS E DO TRABALHO. Subsídios para a implementação do ANEXO II do Decreto 3.048/99 pelo INSS. Disponível em: [http://www.mpas.gov.br/periciamedica/01\\_05.asp](http://www.mpas.gov.br/periciamedica/01_05.asp). Acesso em: 15 dez. 2006.

QUILODRÁN, J.; MIRANDA, J.P.; JIMÉNEZ, L. Efecto del agropesticida Cipermetrina en dosis única intraperitoneal sobre el cerebelo del ratón. **International Journal of Morphology**, suppl, v. 24, p. 5-113, 2006.

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

RASMUSSEN, A.N.; POPELKA, G.R.; OSTERHAMMEL, P.A.; NIELSEN, L.H. Clinical significance of relative probe tone levels on distortion products otoacoustic emissions. **Scandinavian Audiology**, Copenhagen, v. 22, n. 4, p. 223-229, 1993.

ROCINHOLI, L.F. **Estudo do Potencial Evocado Auditivo (PEA) e da inibição latente durante o condicionamento CS-US em ratos desnutridos submetidos à estimulação ambiental**. 1998. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

SALLES JUNIOR, C.G.; FARO, L.R.F. Efeitos comportamentais produzidos pela exposição aguda a pesticidas organofosforados. Artigos de Iniciação Científica. **Revista Científica da UFPA**, Pará. Disponível em: <http://www.cultura.ufpa.br/rcientifica/cabecalho.php?conteudo=8.155>. Acesso em: 16 mar. 2007.

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Disponível em <http://fiocruz.br/sinitox> . Acesso em: 02 nov. 2006.

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

SOARES, W.L.; FREITAS, E.A.V. de.; COUTINHO, J.A.G. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis/RJ. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v. 43, n. 4, p. 685-701, 2005.

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

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

TEIXEIRA, C.F. **Exposição ocupacional aos inseticidas e seus efeitos na audição: a situação dos agentes de saúde pública que atuam em programas de controle de endemias vetoriais em Pernambuco**. 2000. 123 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Pernambuco, 2000.

TEIXEIRA, C.F.; AUGUSTO, L.G.; MORATA, C.T. Occupational exposure to insecticides and their effects on the auditorys. **Noise & Health**, London, v. 4, p. 31- 39, 2002.



\_\_\_\_\_. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 417-423, 2003.

VALDEZ, E.C.N. **Monitorização biológica de trabalhadores expostos a inseticida organofosforado neurotóxico: uma proposta de intervenção**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1995.

VASCONCELLOS, L.F.R.; LEITE, A.C.; NASCIMENTO, O.J.M. Organophosphate-induced delayed neuropathy: case report. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, n. 4, p. 1003-1007, 2002.

VASCONCELOS, C.A.C. **Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias**. 2005. 75 f. Dissertação (Mestrado em Neurologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

VASCONCELOS, C.A.C.; BARREIRA, A.A. aspectos da anatomia macro e microscópica do VIII nervo craniano da cobaia. **Neurobiologia**, v. 70, p. 1-4, 2007.

VIBERG, A.; CANLON, B. The guide to plotting a cochleogram. **Hearing Research**, v.197, p.1-10, 2004.

WADA, H.; SUGAWARA, M.; KOBAYASHI, T.; HOZAKA, K.; TAKASAKA, T. Measurement of guinea pig basilar membrane using computer-aided three-dimensional reconstruction system. **Hearing Research**, v.120, p.1-6, 1998.

WITHNELL, R.H.; SHAFFER, L.A.; TALMADGE, C.L. Generation of DPOAEs in the guinea pig. **Hearing Research**, v.178, p.106-117, 2003.

WYSOCKI, J. Topographical anatomy of the guinea pig temporal bone. **Hearing Research**, v. 199, p. 103-110, 2004.

ZHOU, S.L.; PICKLES, J.O. Early hair-cell degeneration in the extreme apex of the guinea pig cochlea. **Hearing Research**, v.79, p.147-160, 1994.

**Fontes Consultadas**

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

VIEIRA, R. M. **A composição e a edição do trabalho científico** - dissertações, monografias e teses. São Paulo: Lovise, 1995.

VOLPATO, G.L. **Ciência: da filosofia à publicação.** 4 ed. Botucatu: Topomic, 2004.

## ANEXO

## ANEXO 1



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 100/2008, sobre o projeto intitulado: “*Agrotóxicos: ação do organofosforado no sistema vestibulococlear*”, 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** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **28 de julho de 2008**.

(We certify that the protocol nº 100/2008, about “*Pesticides: action of the organofosforado in the vestibulococlear 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) in 07/28/2008 meeting).

Ribeirão Preto, 28 de julho de 2008.

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