

# SISTEMA OLIVOCOCLEAR MEDIAL E GENOTOXICIDADE EM ESCOLARES DE REGIÃO FUMICULTORA

## *Medial olivocochlear system and genotoxicity in students of the tobacco-producing region*

Letícia Regina Kunst<sup>(1)</sup>, Michele Vargas Garcia<sup>(1)</sup>, Alencar Kolinski Machado<sup>(1)</sup>,  
Fernanda Barbisan<sup>(1)</sup>, Aron Ferreira da Silveira<sup>(2)</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** avaliar a associação entre a função do sistema olivococlear medial e biomarcadores genotóxicos em escolares residentes de região fumicultora. **Métodos:** trata-se de um estudo observacional, prospectivo e transversal. O grupo estudo foi composto por 21 escolares normo-ouvintes residentes de região fumicultora e o grupo controle por 25 escolares normo-ouvintes que não residiam na zona rural. O sistema olivococlear medial foi avaliado por meio da supressão das Emissões otoacústicas produto de distorção, e os biomarcadores genotóxicos foram: ensaio cometa, teste de micronúcleos e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística. **Resultados:** ao comparar a ocorrência do efeito de supressão das emissões entre os grupos, não foi detectada associação significativa. Tanto no ensaio cometa como no ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA a média do grupo estudo mostrou-se significativamente mais elevada que a do grupo controle. No teste de micronúcleos, verificou-se diferença significativa quanto ao somatório de células alteradas e à frequência de células binucleadas, sendo a média do grupo estudo mais elevada que a do grupo controle. Já referente à frequência de células com micronúcleo, não se observou diferença significativa entre os grupos. Não foi detectada associação entre ocorrência do efeito de supressão e os resultados dos biomarcadores genotóxicos. **Conclusão:** o grupo estudo não apresentou alterações no sistema olivococlear medial, evidenciado pela presença de supressão das emissões, porém apresentou índices de dano significativamente mais elevados dos biomarcadores genotóxicos. Entretanto, não se verificou associação entre supressão das emissões e genotoxicidade.

**DESCRITORES:** Praguicidas; Tabaco; Audição; Vias Eferentes; Genotoxicidade; Criança

### ■ INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de fumo do mundo, sendo a fumicultura uma atividade de grande importância social e econômica no país. Geralmente, é realizada por pequenos agricultores que obtêm auxílio dos familiares, residindo próximos à plantação. Por isso

acabam expostos a diversas substâncias tóxicas. Na fumicultura, diversos tipos de agrotóxicos, de classes e toxicidades variadas, são amplamente utilizados, principalmente os organofosforados. O uso indiscriminado dessas substâncias químicas garante maior produtividade e reduz as perdas da safra, porém os malefícios à saúde a curto, médio e longo prazo são desconsiderados<sup>1</sup>. Além dos agrotóxicos, a população está exposta a outros compostos orgânicos altamente tóxicos presentes nas folhas do fumo, dentre eles, destaca-se a nicotina.

As crianças constituem um grupo com características particulares de exposição e especial vulnerabilidade a tóxicos ambientais. Além de estarem em fase de desenvolvimento, diferem dos

<sup>(1)</sup> Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>(2)</sup> Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e Programa de Pós-graduação Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Conflito de interesses: inexistente

adultos por apresentarem relativa imaturidade das funções fisiológicas e bioquímicas dos sistemas na proporção dos componentes corporais (água, proteínas, gordura e minérios), na estrutura anatômica dos órgãos, na capacidade de metabolizar e excretar substâncias tóxicas<sup>2</sup>. Também apresentam certos hábitos mais frequentes, como “levar a mão à boca”, que aumentam as chances de ingerir compostos tóxicos presentes na água, solo e poeira domiciliar<sup>3</sup>.

Agama de efeitos adversos à saúde, decorrentes dos agrotóxicos, incluem danos agudos e crônicos<sup>3</sup>. Atualmente, vários estudos têm demonstrado estreita relação entre perda auditiva e exposição a agrotóxicos<sup>4,5</sup>. Os agrotóxicos organofosforados induzem as alterações do sistema auditivo e vestibular, tendo sido evidenciado também seu potencial neurotóxico<sup>4</sup>, podendo afetar inclusive o sistema auditivo central. A respeito dos efeitos crônicos causados à saúde decorrente da exposição dermal à nicotina da folha do tabaco ainda não há muitas informações. A principal discussão acerca dos efeitos ototóxicos da nicotina no fumo está relacionada ao hábito de fumar. Alguns estudos reportam que a nicotina pode ter efeito ototóxico direto e causar isquemia coclear<sup>6</sup>, bem como interferir na transmissão neural da informação auditiva<sup>7</sup>.

O sistema auditivo central é constituído por vias auditivas aferentes e eferentes. A via auditiva eferente dividi-se em dois feixes: sistema olivococlear lateral e sistema olivococlear medial (SOCM). O SOCM é constituído por fibras mielinizadas e predominantemente cruzadas, que vão inervar as células ciliadas externas (CCE)<sup>8</sup>. O funcionamento normal do SOCM pode ser evidenciado pela supressão ou redução das EOA com a aplicação de um ruído competitivo ipsilateral ou contralateralmente<sup>9</sup>. O registro das EOA e a análise do efeito de supressão podem ser utilizados na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear e para a elaboração de ações preventivas em audiologia<sup>10</sup>.

O biomonitoramento humano é a forma mais eficiente de prevenir e diagnosticar precocemente danos decorrentes da exposição humana a agentes químicos com potencial genotóxico<sup>11</sup>. O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo que é definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes (espécies reativas de oxigênio) e antioxidantes, em favor dos primeiros<sup>12</sup>, causando danos em muitos constituintes celulares, como lipídios insaturados, proteínas e DNA<sup>13</sup>. Vários agrotóxicos foram submetidos a testes e revelaram possuir potencial genotóxico<sup>14</sup>. O fumo também vem sendo reportado como fator causal de aumento dos índices de genotoxicidade<sup>15</sup>. Genotoxicidade

é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético (DNA) de organismos a elas expostos<sup>16</sup>; Essa alteração é considerada um fator de risco primário para efeitos de longo prazo.

Embora exista uma variedade de biomarcadores disponíveis para avaliar os danos genotóxicos, tanto transitórios como permanentes, a maioria dos estudos de biomonitoramento tem utilizado os testes de micronúcleos (MN) e ensaio cometa. Essas duas técnicas têm sido amplamente utilizadas para investigar danos ao DNA em populações ocupacionalmente expostas e estão demonstrado serem testes rápidos e sensíveis<sup>3</sup>. Atualmente o uso de sondas fluorescentes, como no Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA com a utilização do reagente Picogreen, vem se destacando. Essa é uma técnica objetiva e altamente sensível, a qual detecta pequenas quantidades de DNA em solução. Ademais, desempenha um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, sendo bastante empregada na biologia molecular<sup>17</sup>, podendo ser usada também para analisar o efeito genotóxico ou genoprotetor de um determinado composto.

A partir do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre a função do sistema olivococlear medial (SOCM) e biomarcadores genotóxicos em escolares residentes de região fumicultora.

## ■ MÉTODOS

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

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

Os escolares, para participar da presente pesquisa, apresentaram como critérios de inclusão: idade entre sete e 14 anos, ser normo-ouvintes, presença de EOAPD, não estarem expostos continuamente a ruídos intensos e à fumaça de cigarro. Como critérios de exclusão, foram usados os seguintes fatores: apresentar histórico de alterações otológicas, apresentar alterações

audiológicas, conforme critério adotado para este estudo, e apresentar doenças crônicas e/ou fazer uso de medicação continuada.

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

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

A amostra de conveniência deste estudo contou inicialmente com 48 voluntários. Desses, dois apresentaram alterações na avaliação audiológica básica, sendo excluídos da pesquisa e encaminhados aos atendimentos necessários. A amostra final ficou constituída de 46 escolares, sendo 21 pertencentes ao GE e 25 pertencentes ao GC.

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

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

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

As medidas de imitância acústica foram realizadas com o equipamento AT 235, da marca *Interacoustics* e tom-sonda 226 Hz, para pesquisa da curva timpanométrica e dos reflexos acústicos. Esses foram pesquisados nas frequências de 500

a 4000Hz bilateralmente, no modo contralateral. Foram incluídas na amostra somente crianças com timpanograma tipo A e reflexos acústicos presentes.

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

A estimulação acústica contralateral foi um ruído branco, na intensidade de 60 dBNA (25), gerado pelo audiômetro já citado (*Interacoustics*, modelo AC 40, via fone auricular TDH-39). A fim de evitar a manipulação da sonda das EOAPDs, o fone foi acoplado na orelha contralateral à captação das EOAPDs antes do início do teste. Nesta pesquisa, obedeceu-se a seguinte ordem de testagem: EOAPD na orelha direita (OD) sem ruído, EOAPD na OD com ruído, EOAPD na orelha esquerda (OE) sem ruído, EOAPD na OE com ruído.

O cálculo da supressão das EOAPD foi feito pela subtração do nível de resposta das EOAPD sem estimulação acústica contralateral do nível de resposta das EOAPD com estimulação acústica contralateral. A análise do efeito de supressão foi por *response* (resposta geral). O *response* é calculado a partir da média geométrica das frequências sob teste. Neste estudo, foi considerado efeito de supressão presente quando houve redução das amplitudes das EOAPD de pelo menos 0,5 dB e efeito de supressão ausente quando diferença foi menor que 0,5 ou negativa. De acordo com Collet et al.<sup>18</sup>, um efeito de supressão de 0,5 a 1,0 dB revela a integridade do SOCM.

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

Os testes de genotoxicidade realizados neste estudo foram: ensaio cometa, teste de micronúcleos (MN) e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. A coleta do material biológico (sangue e células epiteliais da mucosa oral), para a execução desses testes, foi efetuada por uma técnica de enfermagem capacitada. Após a coleta, o sangue foi imediatamente armazenado em um tubo com

anticoagulante de heparina sódica e utilizado no ensaio cometa e ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA. As células epiteliais, para o teste de MN, foram depositadas em um tubo cônico tipo *Falcon*, contendo 2 mL de solução fisiológica ou solução PBS pH 7,4.

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al.<sup>19</sup> e modificado por Collins Ma e Duthie<sup>20</sup>. Para cada indivíduo, foram confeccionadas lâminas em duplicata. Todos os passos foram conduzidos sem luz direta para prevenir danos adicionais ao DNA. Para execução da técnica, foram misturados 5µL de amostra (leucócitos) com 90µL de 0,75% Agarose em um *ependorf*. A solução foi adicionada em uma lâmina pré-coberta com 1% de agarose normal e coberta por uma lamínula, ficando na geladeira por cinco minutos. Após, a lamínula foi retirada e a lâmina colocada em uma cuba com solução de lise por um dia, a 4°C. As lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas com água destilada. Em seguida, foram colocadas em uma cuba horizontal contendo solução de eletroforese. As lâminas ficaram nessa solução por 20 minutos em repouso para permitir o desenovelamento do DNA, posteriormente foi realizada a eletroforese por 20 minutos a 25 Voltz (V) e 300 microAmperes (mA). Então, as lâminas foram colocadas em uma cuba com

solução neutralizadora por cinco 45 minutos, foram lavadas três vezes com água destilada e ficaram secando até o outro dia em temperatura ambiente. As lâminas foram reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução fixadora por dez minutos. A seguir, foram lavadas três vezes e postas para secar em temperatura ambiente. Foram novamente reidratadas por cinco minutos e colocadas em uma cuba contendo solução corante por 25 minutos a 37°C. Depois da coloração, as lâminas foram lavadas por três vezes em água destilada e novamente colocadas para secar em temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular da marca *Olympus*®, modelo CX40, com aumento de 400 vezes. Foi feita uma contagem, para cada amostra, de 100 células (50 por lâmina). As lâminas foram analisadas por dois observadores independentes e, para o índice de dano (ID), foi considerada a média dos danos das duas lâminas analisadas. O cálculo do índice de dano (ID) foi feito a partir da fórmula proposta por Cavalcanti et al.<sup>21</sup>:  $ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$ , onde n = número núcleos de cada classe analisada.

As cinco categorias que foram usadas para classificação do Cometa são aquelas propostas por García et al.<sup>22</sup> e mostradas na Figura 1.

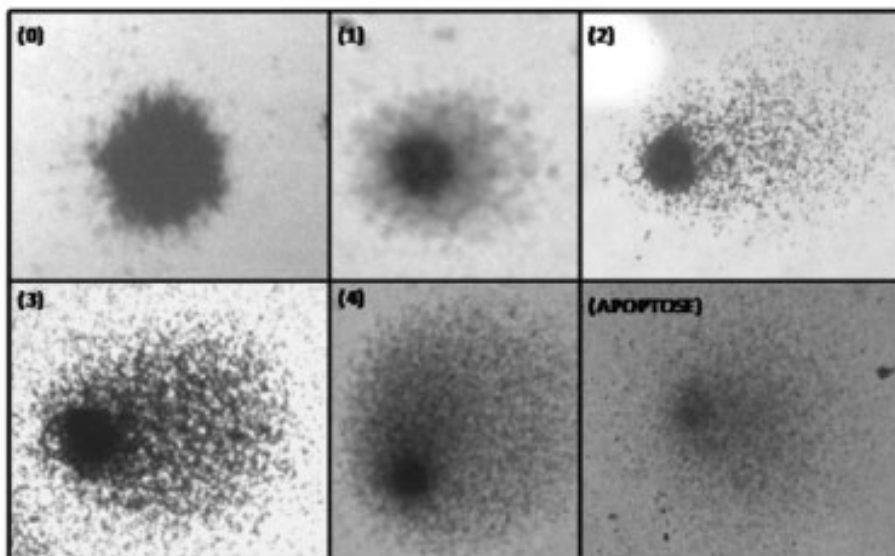


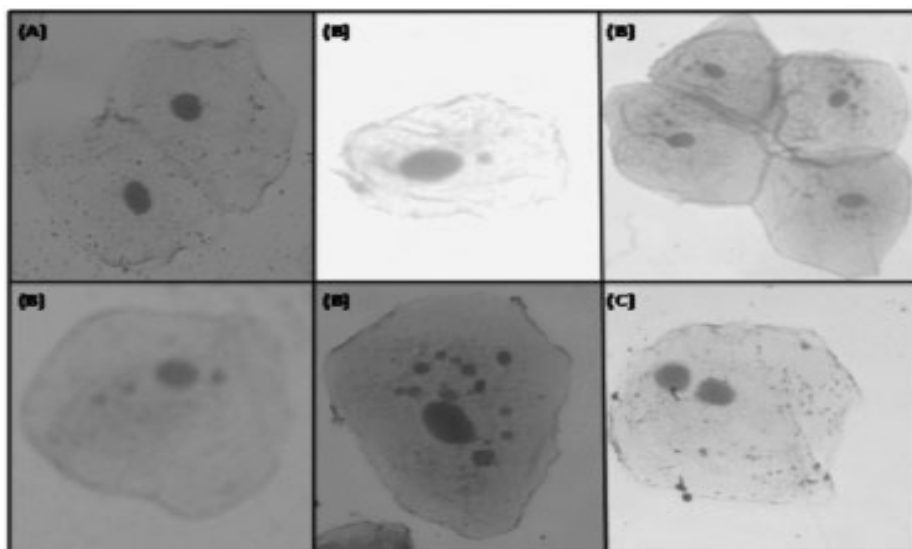
Figura 1 - Classificação do Dano ao DNA. (Fronza et al., 2011)



No teste de MN, as amostras de células epiteliais da mucosa oral foram centrifugadas a 1000-1500 RPM por dez minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante usando pipetas *Pauster* individuais, com cuidado para não remover o *pellet* de células. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de solução fixadora e centrifugado novamente a 1000-1500 RPM durante 1-2 minutos. Novamente foi desprezado o sobrenadante, mantendo um pouco da solução fixadora no tubo, e então homogeneizado o conteúdo com pipetas *Pauster* para ressuspender as células. O conteúdo foi depositado em lâminas limpas e previamente identificadas, as quais foram colocadas para secar em temperatura ambiente por

10-15 min. Depois foi realizada a coloração utilizando coloração panótica. Para finalizar, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas novamente para secar em temperatura ambiente durante 20-25 min.

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



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

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

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

Antes de iniciar o experimento fez-se a leitura da placa de Elisa vazia. Em seguida, pipetou-se 10µL do plasma em placa de Elisa preta em, no mínimo, quadruplicatas. Na sequência foi adicionado 10µL do reagente PicoGreen®<sup>23</sup>. Após o término das pipetagens, a placa foi mantida em

repouso (incubação) durante 5 min, em temperatura ambiente e de forma protegida da luz (pois o reagente PicoGreen é fotossensível). Passado o período de incubação, realizou-se a leitura da placa em fluorescência, com 480nm de excitação e 520 nm de emissão. A interpretação dos valores obtidos é dada de forma que, quanto maior o valor de fluorescência mais DNA livre há no meio, indicando morte celular.

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

Para a análise da ocorrência do efeito de supressão das EOAPD, foi utilizado o teste Exato de Fisher. Na comparação dos resultados do Ensaio Cometa, ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA e teste de micronúcleos (MN), utilizou-se o teste t-Student para amostras independentes. E, para comparação entre ocorrência de efeito de supressão e os testes genotóxicos, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

## ■ RESULTADOS

Todos os sujeitos, de ambos os grupos, apresentaram EOAPD nas duas as orelhas.

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

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

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

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

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

Na comparação da média do índice de dano no Ensaio Cometa, os resultados apontaram que a média do GE ( $48,4 \pm 3,2$ ) mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC ( $37,1 \pm 17,2$ ). A diferença significativa também se configurou na

comparação do escore do teste Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, em que a média no GE foi mais elevada que no GC ( $46,1 \pm 18,9$  vs.  $24,5 \pm 4,9$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

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

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

Legenda: Min-Max = mínimo e máximo;

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

\* $p < 0,05$ ;

No teste de MN, ao comparar o somatório de células anormais entre os grupos, foi detectada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), de forma que a média do GE ( $24,9 \pm 9,8$ ) mostrou-se mais elevada que a média do GC ( $14,9 \pm 7,8$ ) (Tabela 2). Nos resultados referentes à comparação entre grupos da frequência de células binucleadas, foi detectada diferença estatística significativa ( $p < 0,01$ ),

de forma que o grupo estudo ( $12,2 \pm 6,5$ ) apresentou média mais elevada que o grupo controle ( $6,3 \pm 2,2$ ). Na comparação da frequência de células com MN o GE também apresentou a taxa de células com MN maior que o GC, porém a diferença significativa não se configurou ( $p > 0,05$ ), apontando que as variações das médias entre os GE e GC se devem ao acaso (Tabela 3).

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

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

Legenda: MN = micronúcleos

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

\* $p < 0,05$ ;

Tomando como base de comparação a presença e a ausência do efeito de supressão das EOAPD, foi comparado, em cada grupo, o índice de dano do Ensaio cometa e Ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, bem como a frequência de células anormais do teste de MN. Conforme os resultados da Tabela 4, não foram detectadas

diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ), indicando que as médias das variáveis comparadas independem da supressão no GE. Nas informações referentes ao GC, não foram registrados caso de ausência de supressão das EOAPD, o que impediu a realização da análise comparativa (Tabela 4).

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

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

E: Teste de Mann Whitney; \* $p < 0,05$ ;

## ■ DISCUSSÃO

Os potenciais efeitos na saúde associados à exposição de crianças a agrotóxicos são objeto de preocupação constante. No entanto, os efeitos crônicos da exposição continuada a agrotóxicos, bem como a nicotina (folha do tabaco), sobre o corpo humano em desenvolvimento ainda são pouco conhecidos.

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

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

Os agrotóxicos organofosforados, mais utilizados na lavoura de fumo, apresentam um mecanismo de ação, baseado na inibição da acetilcolinesterase, que conseqüentemente aumenta o nível do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses<sup>24</sup>. Segundo Harkrider, Champlin, McFadden<sup>7</sup> a nicotina também apresenta efeito sobre o neurotransmissor acetilcolina. Os mesmos pesquisadores avaliaram os resultados das EOA e PEATE de dez sujeitos normo-ouvintes e não fumantes, após a administração da nicotina, perceberam que ela interfere na transmissão neural da informação auditiva. O efeito da nicotina nos centros neurais altos pode ter efeito inibitório eferente sobre as CCE. Isso se deve à aceleração da acetilcolina, que é o neurotransmissor da eferência do sistema auditivo, o que implicaria no aumento do efeito da supressão das EOA.

Outra pesquisa avaliou o efeito do cigarro sobre o sistema auditivo, comparando os resultados da audiometria convencional e de alta frequência das EOAT e do efeito supressão entre fumantes e não fumantes, concluindo que o cigarro tem um efeito nocivo sobre a audição. Especificamente sobre a avaliação do SOCM, os estudiosos observaram

uma redução no nível de resposta das emissões otoacústicas (supressão) em 100% dos casos em ambos os grupos, sendo que o grupo de fumantes apresentou valores maiores de supressão quando comparado ao grupo não fumante<sup>25</sup>. Os resultados desta pesquisa discordam dos dois estudos anteriormente referidos, pois não se verificou aumento no efeito de supressão das EOAPD dos escolares expostos a agrotóxicos e nicotina.

Um estudo que avaliou a condição do SOCM de sujeitos expostos a solventes orgânicos por meio do efeito de supressão das EOAT observou que a presença do efeito supressor das EOAT foi maior no grupo controle (72%) em comparação ao grupo estudo (58%), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa<sup>26</sup>. Na presente pesquisa, a presença do efeito supressor também foi maior no GC (100%) quando comparado ao GE (90%), mas essa diferença foi ainda menos expressiva.

Outros autores<sup>1</sup> investigaram o efeito dos organofosforados sobre a audição de cobaias. Foi realizado EOAPD, PEATE e análise histológica da cóclea de três grupos de cobaias (controle, submetidos à baixa e alta dosagem de agrotóxicos). Os autores não observaram alteração funcional da cóclea e nervo auditivo, apenas verificaram que os dois grupos que receberam agrotóxicos apresentaram alterações na citoarquitetura das CCE, com maior prejuízo das cobaias que receberam alta dosagem. Nesta pesquisa, também não foi observado alteração funcional do SOCM.

A perda auditiva pode ser uma manifestação precoce da intoxicação a agrotóxicos, lesionando tanto o componente periférico, quanto a audição central<sup>27</sup>. O registro das EOA e a análise do efeito de supressão podem ser utilizados na detecção precoce das alterações auditivas de origem coclear e retrococlear<sup>10</sup>. O presente estudo não demonstrou alteração no sistema auditivo, evidenciado pela presença das EOAPD e efeito de supressão.

Outra forma de prever riscos de desenvolvimento de diversas doenças decorrente da exposição a substâncias tóxicas é por meio do biomonitoramento. Essa é uma ferramenta útil para estimar o risco genético a partir de uma exposição integrada a uma complexa mistura de produtos químicos<sup>14</sup>. Neste estudo, os biomarcadores genotóxicos utilizados foram: ensaio cometa, ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA e teste de MN.

No ensaio cometa, o grupo de escolares expostos apresentou índice de dano significativamente mais elevado que o grupo não exposto. Esses achados vão ao encontro dos resultados de outros autores<sup>28</sup>, que, ao estudarem os efeitos genotóxicos em fumicultores por meio do teste cometa, também demonstraram que o grupo



exposto apresentou um aumento significativo de danos ao DNA quando comparados ao GC. Da Silva et al.<sup>29</sup> também observou aumento de dano ao DNA pelo ensaio cometa três vezes maior em fumicultores comparado ao grupo não exposto.

Os possíveis danos genotóxicos ocasionados pela nicotina são ainda desconhecidos<sup>30</sup>. Outros autores<sup>31</sup> observaram efeito genotóxico da nicotina por meio do ensaio cometa.

No ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, o grupo de escolares expostos também apresentou média mais elevada que o GC, essa diferença foi altamente significativa ( $p < 0,001$ ). O ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA é um teste que utiliza o reagente fluorescente ultrasensível Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen), o qual detecta pequenas quantidades de fita dupla de DNA em solução<sup>32</sup>. O PicoGreen (PG) se liga ao DNA e, ao ligar-se, aumenta sua fluorescência > 1000 vezes, e essa é proporcional à quantidade de DNA presente (circulante)<sup>33,34</sup>.

Na literatura consultada, os estudos que utilizam o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA como biomarcador de exposição a pesticidas são limitados. Entretanto, é uma técnica que desempenha um papel cada vez mais importante em diversos estudos e aplicações biológicas, como técnicas de biologia molecular e de diagnóstico<sup>17</sup> como biomarcador para doenças severas, como a Dengue Hemorrágica<sup>35</sup>.

No presente estudo, o ensaio fluorimétrico de quantificação de DNA, utilizando o reagente Picogreen, mostrou-se ser uma técnica eficaz e altamente sensível para analisar o efeito genotóxico dos pesticidas sobre a população exposta. Esses resultados vão ao encontro dos achados de Parra, Sánchez-Fortún e Castañó<sup>36</sup>, apesar de as análises terem sido feitas em diferentes tipos de células (linfócitos e células teciduais). Eles estudaram a aplicabilidade do reagente Picogreen na quantificação de DNA para determinar o efeito genotóxico induzido por agrotóxicos organofosforados em células teciduais de peixes. Eles concluíram que essa metodologia foi capaz de colocar em evidência o grau de danos ao DNA induzidos por esses agrotóxicos. Portanto, pode ser utilizada para prever a genotoxicidade de pesticidas nesse tipo de células. Também ressaltam que a quantidade de produtos químicos necessários, o custo e o tempo requerido para o teste é drasticamente reduzido, podendo substituir outros testes de genotoxicidade.

Já o teste de MN é uma técnica amplamente utilizada nos estudos de biomonitoramento de populações expostas a diversas substâncias tóxicas. No estudo corrente, no teste de MN, foi detectada diferença estatisticamente significativa

ao comparar o somatório de células anormais e a frequência de células binucleadas entre os grupos, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. No entanto, na comparação da frequência de células com MN, a diferença significativa não se configurou, apesar de a média do GE ser maior que a do GC. Esses achados concordam parcialmente com os resultados de outros estudiosos que encontraram diferença significativa em todos os tipos de células anormais ao compararem o grupo exposto com o GC<sup>3,29,37</sup>.

A maioria dos estudos analisa apenas a frequência de células com MN, diferentemente deste estudo. Diversos estudos relataram aumento significativo na frequência de MN em sujeitos expostos a agrotóxicos, quando comparadas com um grupo controle<sup>37,38</sup>. Outros autores estudaram especificamente crianças expostas a agrotóxicos e também observaram aumento significativo na frequência de células com MN no grupo exposto<sup>3,39</sup>. Os resultados deste estudo discordam dos achados dos referidos autores. No entanto, estes resultados vão ao encontro dos achados de Pastor et al.<sup>40</sup> que também não encontraram diferença entre sujeitos expostos e não expostos a agrotóxicos quanto à frequência de MN.

No presente estudo, buscou-se analisar a associação entre as funções do SOCM (presença e ausência da supressão das EOAPD) e os danos genotóxicos. Os resultados desta pesquisa apontam que o índice de dano encontrado nos testes genotóxicos independe da supressão das EOAPD no GE, ou seja, não há associação positiva entre as variáveis. Fronza et al.<sup>18</sup> verificaram que indivíduos tabagistas apresentam índices elevados de genotoxicidade, evidenciado pelo ensaio Cometa, porém, não observaram associações significantes entre a ausência de efeito de supressão das EOAPD e genotoxicidade.

## ■ CONCLUSÃO

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

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

**ABSTRACT**

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

**KEYWORDS:** Pesticides; Tobacco; Hearing; Efferent Pathways; Genotoxicity; Child

**REFERÊNCIAS**

- Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(2):238-44.
- Perry MJ. Children's agricultural health traumatic injuries and hazardous inorganic exposures. *J Rural Health*. 2003;19(3):269-78.
- Benítez-Leite S, Machi ML, Fernandez V, Franco D, Ferro EA, Mojoli A et al. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr*. (Asunción). 2010;37(2):97-106.
- Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(6):912-8.
- Finkler AD, Silveira AS, Munaro G, Zanosso CD. Otoprotection in guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(3):122-8.
- Cocchiarella LA, Sharp DS, Persky VW. Hearing threshold shifts white-cell count and smoking status in working men. *Occup Med*. 1995; 45(4):179-85. In: Oliveira DCCM, Lima MAMT. Da audiometria tonal laminar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(5):738-44.
- Harkrider AW, Champlin CA, Mcfadden D. Acute effect of nicotine on non-smokers: OAEs and ABRs. *Hear Res*. 2011;160:73-88.
- Durante AS. Emissões otoacústicas. In: Bevilacqua MC, Martinez MAN, Balen AS, Pupo AC, Reis ACMB, Frota S (eds). *Tratado de Audiologia*. São Paulo: Santos; 2011, pp. 145-58.
- Muñiz JF, Ventura AM, Algarra JM. Estudio de la correlación existente entre el efecto supresor contralateral y la fatiga auditiva mediante otoemisiones acústicas transitorias. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006;57(5):199-203.
- Bernardi APA. Trabalhadores expostos simultaneamente a ruído e tolueno: estudo das emissões otoacústicas evocadas e efeito de supressão [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública; 2000.
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int. J. Hyg. Environ – Health*. 2007;210(3-4):201-28. In: Da Silva FR. *Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética [tese]*. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004.142(2):231-44.

13. Findlay VJ, Tapiero H, Tolunsend DM. Sulfiridoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother.* 2005;59(7):374-9.
14. Kumar LP, Panneerselvam N. Toxic effects of pesticides: a review on cytogenetic biomonitoring studies. *Medicine and Biology.* 2008;15(2):46-50.
15. Fronza AB, Barreto DCM, Tochetto TM, Cruz IBMC, Silveira AF. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. *Braz J Otorhinolaryngol.* (Impr.). 2011;77(1):107-14.
16. Kohatsu AGS, Shimabukuro F, Gattás GJF. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. *Saúde, Ética e Justiça.* 2007;12(1):15-21.
17. Dragan AI, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, Schenerman MA, Geddes CD. Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophys J.* 2010;99(9):3010-9.
18. Collet L, Veuillet E, Bene J, Morgon A. Effects of contralateral white noise on click evoked emissions in normal and sensorineural ears: towards an exploration of the olivocochlear system. *Audiology.* 1992;31(1):1-7.
19. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-91.
20. Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res.* 1995;336:69-77.
21. Cavalcanti BC, Sombra CML, Oliveira JHHL, Berlinck RGS, Moraes MO, Pessoa C. Citotoxicity and genotoxicity of ingenamine G isolated from the Brazilian marine sponge *Pachychalina alcaloidifera*. *Comp Biochem Physiol A.* 2008;147(4):409-15.
22. Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res.* 2004;556:25-34.
23. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits. *Molecular Probes Invitrogen detection technologies.* 2008.
24. Oliveira-Silva JJ, Alves SR, Meyer A, Perez F, Sarcinelli PN, Mattos RCOC et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Rev Saúde Pública.* 2001;35(2):130-5.
25. Paschoal CP, Azevedo MF. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(6):893-902.
26. Quevedo LS, Tochetto TM, Siqueira MA. Condição coclear e do sistema olivococlear medial de frentistas de postos de gasolina expostos a solventes orgânicos. *Arquivos Int. Otorrinolaringol.* 2012;16(1):50-6.
27. Manjabosco CAW, Morata TC, Marques SJM. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. *Arq Int Otorrinolaringol.* 2004;8(4):284-95.
28. Juffo DD, Silva FR, Rohr P, Kvitko K, Da Silva J. Avaliação do dano causado ao DNA de trabalhadores da lavoura de fumo do município de Venâncio Aires RS. In: V Jornada de Iniciação Científica- Meio Ambiente- FZB-RS e FEPAM, 2009, Porto Alegre. *Anais da V Jornada de Iniciação Científica-Meio Ambiente-FZB-RS e FEPAM, 2009.* p. 1.
29. Da Silva FR, Da Silva J, Dias JF, dos Santos CEI, Kahl V, Rohr P et al. Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure of early biological effects and of susceptibility. *J Hazard Mater.* 2012; 225-226:81-90.
30. Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
31. Sobkowiak R, Lesicki A. Genotoxicity of nicotine in cell culture of *Caenorhabditis elegans* evaluated by the comet assay. *Drug Chem Toxicol.* 2009;32(3):252-7. In: Da Silva FR. Risco ocupacional em fumicultores: genotoxicidade associado à suscetibilidade genética [tese]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
32. Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research.* 1996;24(13):2623-5.
33. Ikeda Y, Iwakiri S, Yoshimori T. Development and characterization of a novel host cell DNA assay using ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain "PicoGreen". *J Pharm Biomed. Anal.* 2009;49(4):997-1002.
34. Dragan AI, Bishop ES, Geddes CD. Metal-enhanced PicoGreen fluorescence: application for double-stranded DNA quantification. *Anal Biochem.* 2010;396(1):8-12.
35. Ha TTN, Huy NT, Murao LA, Lan NTP, Thuy TT et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *PLoS ONE.* 2011;6(10):1-7.
36. Parra JM, Sánchez-Fortún S, Castañó A. Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. *Environ Toxicol.* 2010;27(4):238-43.

37. Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ Int.* 2009;35(8):1155-9.
38. Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res.* 2009;675(1-2):1-4.
39. Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D et al. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res.* 2006;612(1):1-13.
40. Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis.* 2003;18:249-58.

<http://dx.doi.org/10.1590/1982-021620147313>

Recebido em: 16/04/2013

Aceito em: 17/12/2013

Endereço para correspondência:

Letícia Regina Kunst

Av. Itaimbé, 655, apto 307 – Centro

Santa Maria – RS – Brasil

CEP: 97050-331

E-mail: leticiakunst@yahoo.com.br