

Letícia Regina Kunst¹
 Michele Vargas Garcia²
 Alencar Kolinski Machado³
 Fernanda Barbisan³
 Aron Ferreira da Silveira²

Descritores

Praguicidas
 Tabaco
 Audição
 Estresse oxidativo
 Criança

Keywords

Pesticidas
 Tobacco
 Hearing
 Oxidative Stress
 Child

Endereço para correspondência:

Letícia Regina Kunst
 Avenida Itaimbé, 655, apto 307, Centro,
 Santa Maria (RS), Brasil, CEP: 97050-331.
 E-mail: leticiakunst@yahoo.com.br

Recebido em: 10/04/2013

Aceito em: 25/03/2014

Emissões otoacústicas e biomarcadores do estresse oxidativo em escolares de região fumicultora

Otoacoustic emissions and biomarkers of oxidative stress in students of a tobacco-producing region

RESUMO

Objetivo: Verificar a associação entre a amplitude das Emissões Otoacústicas Produto de Distorção (EOAPD) e biomarcadores do estresse oxidativo (EO) em escolares residentes de região fumicultora. **Métodos:** Participaram do grupo estudo (GE) 21 escolares normo-ouvintes residentes de região fumicultora, e do grupo controle (GC), 25 escolares normo-ouvintes que não residiam na zona rural. O sistema auditivo foi avaliado por meio das EOAPD, e os biomarcadores do EO foram: Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) e teste de micronúcleos (MN). **Resultados:** Os dois grupos apresentaram EOAPD presentes em ambas as orelhas. Detectou-se diferença significativa entre os grupos — na orelha direita, a frequência foi 4.000 Hz, e na esquerda, 2.000 Hz —, sendo a média de amplitude das EOAPD do GE menor que a do GC. Quanto às duas orelhas, o GE apresentou média inferior em todas as frequências, verificando-se diferença significativa em 2.000 e 4.000 Hz. Na média geral das EOAPD por orelha não foi observada diferença significativa. Na taxa de produção de radicais livres, a média do GE mostrou-se significativamente mais elevada que a do GC. Quanto à frequência de células alteradas no teste de MN, a média do GE também se apresentou significativamente mais elevada que a do GC. **Conclusão:** O GE apresentou nível de resposta das EOAPD menor em todas as frequências e índices elevados dos biomarcadores do EO, porém não foi verificada associação entre as avaliações.

ABSTRACT

Purpose: To verify the association between the amplitude of distortion-product otoacoustic emissions (DPOAE) and biomarkers of oxidative stress (OS) in resident students of the tobacco-producing region. **Methods:** Participated in the study group (SG) 21 normal-hearing students from the tobacco-producing region, and in the control group (CG) 25 normal-hearing students who did not live in the countryside. The auditory system was assessed by DPOAE and the following biomarkers: dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and micronucleus test (MN). **Results:** Both groups showed DPOAE present in both ears. Significant difference was detected between groups — in the right ear in the frequency of 4.000 Hz and in the left ear in the frequency of 2.000 Hz — with the mean amplitude of the DPOAE of the SG lower than the one found in the CG. Considering both ears, the SG presented lower mean across all frequencies and it was found a significant difference in the frequencies of 2.000 and 4.000 Hz. The overall mean of DPOAE, by ear, no significant differences were observed. In relation to the rate of production of free radicals, the mean of the SG was significantly higher than that of the mean of the CG. For the frequency of abnormal cells in the MN test, the mean of the SG was also considerate significantly higher than the mean of the CG. **Conclusion:** The SG showed a lower response level of DPOAE at all frequencies and high levels of biomarkers of EO, however there was no association between assessments.

Trabalho realizado no Departamento de Fonoaudiologia, Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria (RS), Brasil.

(1) Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria (RS), Brasil.

(2) Departamento de Fonoaudiologia, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, (RS), Brasil.

(3) Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria (RS), Brasil.

Conflito de interesses: nada a declarar.

INTRODUÇÃO

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

O efeito da exposição continuada a agrotóxicos por crianças e jovens é pouco conhecido. Por estarem em desenvolvimento, os seus organismos são mais vulneráveis à ação dos produtos químicos. Além disso, apresentam certos hábitos mais frequentes, como “levar a mão à boca”, os quais aumentam as chances de ingerir compostos tóxicos presentes na água, no solo e na poeira domiciliar⁽¹⁾.

No meio rural, o uso de agrotóxicos ainda é a principal estratégia dos agricultores para combater e prevenir as pragas agrícolas e garantir maior produtividade e rendimento das culturas⁽²⁾. Apesar de conhecerem os danos desses produtos, os agricultores fazem uso indiscriminado e sem devida proteção individual, o que acarreta significativamente o aumento das intoxicações agudas e crônicas por esse tipo de produto⁽³⁾. Na fumicultura, além dos riscos à saúde devido à exposição aos agrotóxicos, essa população está sujeita a problemas decorrentes do contato com a folha do tabaco, podendo ser absorvida alta quantidade de nicotina pela pele⁽⁴⁾, o que provoca quadro de intoxicação. Contudo, os efeitos crônicos à saúde provocados pela exposição dermal da nicotina, bem como sobre o sistema auditivo, ainda não são conhecidos.

Nos últimos anos, os agrotóxicos organofosforados, mais utilizados na fumicultura, foram introduzidos no grupo de alta prioridade para pesquisa de ototoxicidade devido à exposição ocupacional⁽⁵⁾. Ototoxicidade é definida como dano aos sistemas coclear e/ou vestibular resultante de exposição a substâncias químicas. Referente à ototoxicidade da nicotina, são limitados os estudos que relacionam a nicotina apenas à perda auditiva. Em geral, a discussão se atém aos efeitos ototóxicos da nicotina no fumo relacionado ao hábito de fumar.

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo (EO), definido como o desequilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes em favor dos primeiros. São geradas inúmeras espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas os radicais livres que, diferentemente das demais, apresentam um elétron desemparelhado na sua camada eletrônica, favorecendo a ocorrência de danos oxidativos⁽⁶⁾. Essas EROs podem ser formadas a partir de fontes exógenas como fumo, radiações, luz ultravioleta, solventes, alguns fármacos⁽⁷⁾ e agrotóxicos⁽²⁾ ou de fontes endógenas. As EROs estão envolvidas em um número cada vez maior de patologias, dentre elas a perda da audição (alteração de funcionamento coclear)^(8,9).

Uma forma de prevenir precocemente os danos causados pela exposição a substâncias tóxicas é por meio do biomonitoramento humano, que permite identificar fatores de risco para o desenvolvimento de determinadas patologias⁽¹⁰⁾, podendo estar entre elas a perda auditiva. A monitorização biológica da exposição a agentes químicos é uma medida das substâncias ou seus metabólitos em vários meios biológicos, como sangue, urina,

saliva e ar exalado. Esses parâmetros biológicos são denominados indicadores biológicos ou biomarcadores⁽¹¹⁾.

Os biomarcadores podem ser usados para indicar os danos às macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA) causados pelo EO⁽¹²⁾. Existem diferentes biomarcadores para avaliar o EO: alguns verificam os resultados nos alvos especificamente como danos ao DNA, que podem ser avaliados, por exemplo, pelo teste de micronúcleos (MN), ou quantificados pelos níveis de produção de EROs no organismo utilizando os métodos fluorescentes.

O teste MN é utilizado no monitoramento de populações ocupacionalmente expostas há muitos anos⁽¹³⁾. MN são fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros deixados para trás durante a divisão celular mitótica e aparecem no citoplasma das células em interfase como um pequeno núcleo adicional⁽²⁾. Atualmente, esse teste em células da mucosa oral tem sido utilizado para avaliar múltiplos fatores, incluindo exposições ambientais e ocupacionais, como aos agrotóxicos, estilos de vida (alcoolismo, tabagismo, estresse, etc.) câncer e outras doenças⁽¹⁴⁾.

Recentemente, os métodos fluorescentes vêm se destacando devido à maior sensibilidade e têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de EROs em células de diferentes tecidos. Outra grande vantagem desses métodos está na sua alta sensibilidade de detecção das espécies, permitindo uma análise quantitativa⁽¹⁵⁾. Dentre os métodos fluorescentes, encontra-se a Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), referente à taxa de produção de radicais livres.

A avaliação da função coclear ainda pode ser realizada por meio das emissões otoacústicas evocadas (EOA). Esse exame é um método eficaz de detecção precoce de alterações auditivas. Segundo Kemp⁽¹⁶⁾, observam-se alterações nas respostas das EOA antes que sejam registradas alterações no limiar auditivo (mínimo som percebido pela orelha humana). Esse tipo de avaliação é usado também para o monitoramento de perdas auditivas. O registro das EOA é um método específico e sensível para identificar alterações nas células ciliadas externas (CCE), pois essas lesões provocam diminuição da amplitude das EOA e da relação sinal/ruído, podendo, inclusive, haver ausência de resposta na região de maior dano⁽¹⁷⁾.

A integridade do sistema auditivo, periférico e central, reflete-se diretamente no desenvolvimento normal da linguagem, da fala e da leitura e escrita. Por isso, é importante identificar precocemente danos auditivos em escolares expostos a diversas substâncias ototóxicas a fim de prevenir possíveis efeitos dessa exposição sobre o desenvolvimento/aprendizado dos jovens.

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

MÉTODOS

O presente 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. Esta pesquisa foi realizada em parceria com o Centro de Referência em Saúde

do Trabalhador (CEREST) de Santa Maria. Todos os sujeitos concordaram em participar da pesquisa, receberam cópia e apresentaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelos responsáveis. Trata-se de um estudo observacional, prospectivo e transversal.

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

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

Na seleção do GE, 103 escolares residentes em região fomicultora foram convidados a fazer parte da pesquisa, entretanto apenas 25 demonstraram interesse, sendo que 22 participaram. Para o recrutamento do GC, foram visitadas três escolas públicas, sendo convidados em média 250 alunos, porém demonstraram interesse apenas 57 sujeitos, dos quais somente 26 participaram.

A amostra de conveniência 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 com idade entre sete a 14 anos, divididos em dois grupos:

- Grupo estudo (GE): 21 escolares, 12 do gênero feminino e nove do masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, residentes da zona rural fomicultora; e
- Grupo controle (GC): 25 escolares, 17 do gênero feminino e oito do masculino, com idades entre sete a 14 anos, normo-ouvintes, não residentes da zona rural.

Tanto as avaliações audiológicas quanto as coletas dos materiais biológicos de ambos os grupos foram realizadas no CEREST.

Com o intuito de identificar alguns critérios de inclusão e/ou exclusão do estudo, aplicou-se um questionário aos pais e/ou responsáveis e ao próprio sujeito, no qual foram pesquisadas as informações referentes aos dados pessoais, histórico otológico e de saúde geral, queixas auditivas e aspectos socioambientais como exposição continuada a cigarro e ou ruídos intensos, local onde reside, tempo que reside, etc. Ressalta-se que nenhum sujeito, de ambos os grupos, vive exposto a fumaça do cigarro e/ou ruídos intensos diariamente. Ou seja, apenas os sujeitos do GE estão expostos a substâncias ototóxicas, sendo exclusivamente os agrotóxicos organofosforados e a nicotina da folha do tabaco. Portanto, todos se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo.

Para verificar a condição auditiva, os escolares foram submetidos à inspeção visual do meato acústico externo, utilizando

o Otoscópio Clínico da marca *Klinic Welch-Allyn*, para, então, realizar a audiometria tonal limiar (ATL).

A ATL foi feita em cabina acusticamente tratada com o audiômetro da marca *Interacoustics*, modelo AC40 e fone de ouvido TDH-39. Por se tratar de apenas uma triagem audiológica, nela foram pesquisados somente os limiares de via aérea nas frequências de 500, 1.000, 2.000 e 4.000 Hz. A técnica utilizada foi descendente-ascendente e consideraram-se indivíduos normo-ouvintes aqueles que apresentaram média tritonal (500, 1.000 e 2.000 Hz) menor ou igual a 25 dBNA (decibel Nível de Audição).

As medidas de imitância acústica foram realizadas por meio do analisador de orelha média da marca *Interacoustics*, modelo AT 235 e tom-sonda 226 Hz, para pesquisa da curva timpanométrica e dos reflexos acústicos, pesquisados nas frequências de 500 a 4.000 Hz 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. Foram pesquisadas as EOAPD, pois elas avaliam uma faixa mais ampla de frequências, incluindo as altas, importantes na avaliação de sujeitos expostos a ruído e/ou substâncias tóxicas.

O registro das EOAPD foi realizado utilizando o analisador coclear da marca *Interacoustics*, modelo *Otoread Screening*. Para a obtenção das EOAPD (2F1-F2), foram utilizados dois tons puros na razão de $F2/F1=1,22$, em que F1 é apresentada na intensidade de $L1=65$ dBNPS e F2 em $L2=55$ dBNPS. Para medida das EOAPD, foram testadas as frequências de 1.500, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 e 6.000 Hz. Consideraram-se EOAPD presentes quando a relação sinal/ruído foi igual ou superior a 6 dBNPS em pelo menos três frequências⁽¹⁸⁾.

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

Além disso, executou-se a coleta do material biológico, no entanto, apenas 18 sujeitos do GE e 18 do GC realizaram o procedimento, diminuindo a amostra para essas avaliações.

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

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

A diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) é um método baseado na utilização da sonda não fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), a qual atravessa facilmente a membrana celular e sofre desacetilação por ação de enzimas esterases intracelulares,

formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este metabólito não fluorescente, por sua vez, quando em contato com EROs, transforma-se em diclorofluoresceína (DCF), que é altamente fluorescente⁽¹⁹⁾. Assim, a base deste ensaio é atribuída à emissão de fluorescência que está diretamente relacionada de forma proporcional à presença de EROs⁽²⁰⁾. Logo, quanto maior a fluorescência emitida, maior a presença de compostos oxidantes. Essa avaliação foi realizada conforme Da Costa Krewer et al.⁽²¹⁾. Portanto, para tal prática experimental utilizaram-se placas pretas de ELISA e 96 poços e para todas as amostras testada foi realizada a determinação em quatro replicatas. Em cada poço da placa em uso foram adicionados 50 µL da devida amostra, juntamente com 65 µL do tampão Tris HCl 10 mM pH 7,4 e 10 µL do reagente DCFH-DA 0,1 mM. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente e sob proteção da luz direta, as amostras foram lidas quanto à fluorescência a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão em aparelho espectrofluorímetro SpectraMax Plus 384.

O teste de MN foi realizado de acordo com Fronza et al.⁽⁹⁾. Para o teste foram coletadas células epiteliais da mucosa oral, por meio do esfregaço (raspagem) da mucosa da bochecha. Na sequência, o material foi depositado em um tubo cônico tipo *Falcon*, contendo 2 mL de solução fisiológica ou solução PBS pH 7,4, sendo mantido refrigerado em caixa de isopor até o processamento. As amostras foram centrifugadas a 1.000–1.500 RPM por dez minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante usando pipetas *Pauster* individuais. Então, foi adicionado 1,5 mL de solução fixadora e centrifugado novamente a 1.000–1.500 rotações por minuto (RPM) durante um a dois minutos. Novamente foi desprezado o sobrenadante, mantendo um pouco da solução fixadora no tubo, de forma a homogeneizar o conteúdo para ressuspender as células e dispô-las em lâminas limpas e previamente identificadas. Após a devida secagem, realizou-se coloração utilizando corantes panóxicos. Para finalizar, as lâminas foram lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante e mantidas em temperatura ambiente para secagem.

Depois de seco, o material foi observado em microscópio óptico binocular da marca *Olympus*[®], modelo CX40, com magnificação de 400x para contagem das células presentes e posterior análise dos dados. Foram contadas 1 mil células, classificadas como: 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 1. Para efeitos comparativos, foi utilizado o somatório de células anormais de todos os tipos no total das 1 mil células avaliadas.

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

Para todas as análises comparativas, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. Para avaliar a associação entre variáveis (EOAPDs e os biomarcadores do EO)

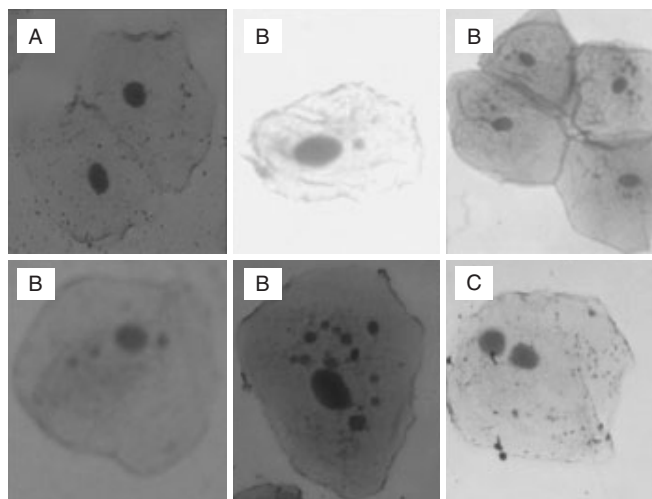


Figura 1. Classificação das células do teste de micronúcleos: (A) célula sem alteração; (B) célula com micronúcleo; (C) célula binucleada⁽⁹⁾

utilizou-se o coeficiente de correlação de *Pearson*. Foi adotado nível de significância de 5%.

RESULTADOS

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

Ao comparar a amplitude de resposta das EOAPD entre os grupos por frequência, foi detectada diferença estatisticamente significativa na orelha direita (OD) para a frequência de 4.000 Hz ($p < 0,05$), indicando que a média do GE ($18,0 \pm 6,3$) mostrou-se menor que a do GC ($21,7 \pm 5,6$). Na orelha esquerda (OE), a diferença significativa se configurou na frequência de 2.000 Hz, quando novamente a média do GE ($21,0 \pm 7,1$) mostrou-se menor que a do GC ($25,3 \pm 5,1$) (Tabela 1).

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

Considerando a OD e OE, o GE apresentou média inferior ao GC em todas as frequências. Observou-se que, para a média na frequência de 2.000 Hz, foi detectada diferença significativa ($p < 0,05$), de forma que o GE ($21,2 \pm 6,7$) registrou média menor que o GC ($25,4 \pm 4,4$). Outra diferença significativa ($p < 0,05$) foi evidenciada na média da frequência de 4.000 Hz, em que novamente a média do GE ($18,2 \pm 4,9$) foi inferior que a do GC ($21,1 \pm 4,9$) (Tabela 1).

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

Na comparação da taxa de produção de radicais livres (DCFH-DA) entre os grupos, observou-se que a média do GE ($23.144,2 \pm 2.726,5$) mostrou-se significativamente ($p < 0,01$) mais elevada que a média do GC ($20.532,9 \pm 2.447,1$) (Tabela 2). Esses resultados indicam que o grupo de escolares expostos apresenta número maior de EROs.

Tabela 1. Análise comparativa dos valores médios (média e desvio-padrão) da amplitude de resposta das Emissões Otoacústicas Produto de Distorção, por frequência e média geral da orelha direita, orelha esquerda e média da orelha direita e orelha esquerda, entre os grupos estudo e controle (n=46)

EOAPD	Grupos						Valor de p
	Estudo (n=21)			Controle (n=25)			
	Média	Desvio-padrão	Amplitude (Mínimo-Máximo)	Média	Desvio-padrão	Amplitude (Mínimo-Máximo)	
Orelha direita							
1.500 Hz	21,4	6,8	8-32	21,4	7,0	3-30	0,993 [¶]
2.000 Hz	21,4	7,6	10-37	25,4	5,9	11-35	0,051 [¶]
3.000 Hz	22,4	6,2	8-31	22,4	5,1	13-31	0,990 [¶]
4.000 Hz	18,0	6,3	0-27	21,7	5,6	11-32	0,043 ^{¶*}
5.000 Hz	21,8	9,7	0-34	22,3	7,0	9-34	0,837 [¶]
6.000 Hz	20,8	10,5	0-34	23,7	6,7	9-36	0,288 [§]
Média geral	20,9	6,7	5-31	22,8	4,7	12-32	0,251 [¶]
Orelha esquerda							
1.500 Hz	20,1	6,2	6-28	20,6	7,7	-5-33	0,814 [¶]
2.000 Hz	21,0	7,1	6-34	25,3	5,1	17-36	0,020 ^{¶*}
3.000 Hz	21,0	7,9	1-33	22,9	3,6	16-34	0,322 [§]
4.000 Hz	18,3	6,4	0-27	20,4	5,5	4-29	0,224 [¶]
5.000 Hz	22,6	7,6	2-32	24,4	5,5	9-35	0,362 [¶]
6.000 Hz	24,0	8,3	0-35	25,2	5,9	12-36	0,584 [¶]
Média geral	21,2	5,8	6-29	23,2	4,0	12-32	0,169 [¶]
Média Orelha esquerda – Orelha direita							
Média 1.500 Hz	20,8	5,8	7,5-29,0	21,0	6,7	1,0-30,0	0,891 [¶]
Média 2.000 Hz	21,2	6,7	8,0-34,5	25,4	4,4	17,5-35,0	0,019 ^{§*}
Média 3.000 Hz	21,7	6,4	4,5-31,0	22,6	3,7	14,5-31,0	0,561 [§]
Média 4.000 Hz	18,2	4,9	6,5-27,0	21,1	4,9	10,0-30,5	0,049 ^{¶*}
Média 5.000 Hz	22,2	7,6	1,0-32,5	23,3	5,3	9,0-34,5	0,563 [§]
Média 6.000 Hz	22,4	7,8	0,0-33,0	24,4	5,6	10,5-36,0	0,331 [§]
Média geral	21,0	5,6	5,9-30,7	23,0	4,1	12,3-31,9	0,171 [¶]

*p<0,05; [¶]Teste t de Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; [§]Teste t de Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias

Legenda: EOAPD = emissões otoacústicas produto de distorção

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

Variável	Grupos						Valor de p
	Estudo (n=18)			Controle (n=18)			
	Média	Desvio-padrão	Amplitude (Mínimo-Máximo)	Média	Desvio-padrão	Amplitude (Mínimo-Máximo)	
Taxa de produção de radicais livres	23.144,2	2.726,5	16.899,5-27.850,5	20.532,9	2.447,1	16.525,3-25.236,6	0,005 ^{¶*}
Frequência de células anormais – teste MN	24,9	9,8	3,0-42,0	14,9	7,8	7,0-40,0	0,002 ^{§*}

*p<0,05; [¶]Teste t de Student para grupos independentes assumindo homogeneidade de variâncias; [§]Teste t de Student para grupos independentes assumindo heterogeneidade de variâncias

Nos resultados referentes à comparação de médias da frequência de células anormais no teste de MN, foi detectada diferença estatisticamente significativa (p<0,01), de forma que a média do GE (24,9±9,8) mostrou-se mais elevada que a do GC (14,9±7,8) (Tabela 2). Isso nos mostra que o grupo de escolares expostos apresenta índice de dano a nível nuclear (células alteradas) maior que o grupo não exposto. Na análise que envolveu a comparação entre a amplitude das EOAPD, por frequência e por orelha, e os biomarcadores do estresse oxidativo (a frequência de células alteradas no teste MN e a taxa de produção de radicais livres) não foram detectadas relações significativas de linearidade (p>0,05).

DISCUSSÃO

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

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

As EOA captam o funcionamento da cóclea por meio das respostas das CCE, e o teste pode revelar a integridade ou a alteração dessas estruturas antes de elas apontarem irregularidades no exame de audiometria tonal liminar⁽²²⁾.

A perda auditiva devido à exposição a agrotóxicos apresenta configuração semelhante à decorrente de medicação ototóxica e ruído, ou seja, caracteriza-se por ser uma alteração neurosensorial que acomete inicialmente as altas frequências⁽²³⁾. Vários autores têm demonstrado a importância das EOA no monitoramento audiológico de sujeitos ocupacionalmente expostos, sendo útil no diagnóstico precoce dos danos auditivos em estágios iniciais. Dentre os tipos de EOA, encontram-se as Emissões Otoacústicas Transientes (EOAT) e a EOAPD. Essas duas técnicas têm-se demonstrado eficazes para avaliar alterações precoces no funcionamento coclear de populações ocupacionalmente expostas (ruídos e/ou químicos). A desvantagem das EOAT é que essa técnica não alcança as frequências acima de 4.000 Hz, diferentemente das EOAPD, que são mais eficazes para detectar frequências mais altas, importantes na avaliação de sujeitos ocupacionalmente expostos a ruído, pesticidas e/ou solventes pelo fato de atingirem inicialmente as frequências altas⁽²²⁾. Por esse motivo, nesta pesquisa optou-se por realizar as EOAPD para abranger um número maior de altas frequências. Com isso, pode-se ter deixado de captar alterações que já podem estar na cóclea (CCE), pois as EOAT são mais sensíveis para captar alterações de CCE que as EOAPD.

Como referido anteriormente, as alterações audiológicas causadas pela exposição a agrotóxicos têm configuração semelhante às causadas pelo ruído. Segundo Frota e Iório⁽²⁴⁾, alterações cocleares decorrentes da exposição a níveis elevados de pressão sonora devem provocar mudanças precoces na amplitude das EOA. Assim, acredita-se que as alterações cocleares causadas pelos agrotóxicos, bem como pela nicotina, podem gerar precocemente alterações na amplitude das EOA. Nesta pesquisa, os escolares expostos aos agrotóxicos e nicotina apresentaram alterações na amplitude das EOA precocemente.

Körbes et al.⁽²⁵⁾ investigaram o efeito dos organofosforados sobre a audição de cobaias. Os autores não observaram alteração funcional da cóclea evidenciada pela presença das EOAPD, apenas verificaram que os dois grupos que receberam agrotóxicos apresentaram alterações na citoarquitetura das CCE, com maior prejuízo das cobaias que receberam alta dosagem. Os resultados do estudo corrente se assemelham aos achados dos autores anteriormente citados — apesar de se tratar de estudo com cobaias, também não se encontrou alteração funcional da cóclea, destacada pela presença das EOAPD.

Quanto à ação da nicotina sobre o sistema auditivo, os estudos encontrados na literatura são relativamente limitados, sendo que a maioria se atém aos efeitos do cigarro sobre a audição, em que a nicotina é uma de suas principais substâncias. Uma pesquisa

que avaliou o efeito do cigarro sobre o sistema auditivo comparou os resultados das EOAT, dentre outros testes, em fumantes e não fumantes. Os autores verificaram que o grupo de fumantes apresentou nível de resposta das EOAT menor nas frequências de 1.000 Hz em ambas as orelhas e 4.000 Hz na OE, concluindo que o cigarro tem efeito nocivo ao sistema auditivo⁽²⁶⁾. Os resultados deste estudo vão ao encontro dos achados dos autores anteriormente citados, apesar da utilização das EOAPD. Observou-se que o GE apresentou nível de resposta das EOAPD menor ou igual ao GC em todas as frequências em ambas as orelhas, apresentando diferença significativa na de 4.000 Hz na OD e na de 2.000 Hz na OE. Considerando a média das duas orelhas, o GE indicou nível de resposta das EOAPD menor em todas as frequências, com diferença significativa nas de 2.000 e 4.000 Hz (Tabela 1).

Na literatura, encontram-se diversos estudos de biomonitoramento humano em populações expostas a agrotóxicos, inclusive de crianças^(1,27,28). Os estudos em questão são ferramentas importantes para estimar os riscos e prevenir e diagnosticar precocemente futuras alterações, decorrentes da exposição a diversas substâncias tóxicas, como agrotóxico e nicotina.

No trabalho corrente, foi detectada, no teste de MN, diferença estatisticamente significativa ao comparar o somatório de células anormais entre os grupos, sendo a média do GE mais elevada que a do GC. Esses achados concordam com os resultados de outros estudos que também encontraram diferença significativa em todos os tipos de células anormais ao compararem o grupo exposto com o GC^(27,28). Outros autores estudaram especificamente crianças expostas a agrotóxicos e também observaram aumento significativo na frequência de células com MN no grupo exposto⁽¹⁾. Diferentemente dos demais autores, Pastor et al.⁽²⁹⁾ não encontraram distinção entre sujeitos expostos e não expostos a agrotóxicos quanto à frequência de MN.

Outro biomarcador empregado neste estudo foi a taxa de produção de radicais livres, método fluorescente que permite a detecção de EROs.

Os efeitos biológicos e toxicológicos atribuídos às EROs são cada vez mais objeto de interesse de pesquisadores de diferentes áreas, principalmente por serem associadas a várias condições patológicas. No entanto, as EROs apresentam algumas características que dificultam a sua detecção, como alta reatividade e meia vida curta⁽³⁰⁾, fato que dificulta a sua determinação *in vivo*. Por esse motivo, as sondas fluorescentes para a detecção de EROs são ferramentas promissoras e excelentes sensores de EROs devido à sua alta sensibilidade e simplicidade na coleta de dados⁽³¹⁾.

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

No presente estudo, buscou-se verificar se há associação entre a amplitude das EOAPD e os biomarcadores do EO em escolares expostos a agrotóxicos e à nicotina. Para que se tenha significado clínico, o resultado dessa associação deve apresentar-se de

modo inverso, ou seja, a redução da amplitude das EOAPD precisa estar relacionada ao aumento dos índices dos biomarcadores do EO e vice-versa. Na presente pesquisa, numa análise qualitativa, essa associação inversa, e do modo esperado em ambos os grupos, foi observada. Os resultados desse estudo revelam que o GE apresentou nível reduzido da amplitude das EOAPD e índice elevado de células alteradas no teste de MN e na taxa de produção de radicais livres ao comparar com o GC. Porém, na análise estatística não ocorreram correlações significativas entre as frequências das EOAPD e os biomarcadores do estresse oxidativo, indicando que estas duas variáveis apresentaram relação de independência em ambos os grupos. Acredita-se que não foi observada associação significativa devido à amostra reduzida. Todavia, ressalta-se que novos estudos devem ser realizados com maior número de sujeitos para confirmar esses achados.

CONCLUSÃO

Neste estudo, os escolares de ambos os grupos apresentaram EOAPD presentes. Entretanto, o GE indicou média da amplitude de resposta das EOAPD menor em todas as frequências.

O GE registrou índice significativamente mais elevado na taxa de produção de radicais livres e alta presença de células alteradas no teste de MN. Os índices elevados dos biomarcadores do EO também podem estar associados à exposição desses sujeitos aos agrotóxicos e nicotina. Porém, não foi verificada associação significativa entre o nível de resposta das EOAPD e os resultados dos biomarcadores do EO.

**LRK foi a autora da dissertação que gerou o artigo. Foi responsável pela coleta de dados, tabulação e análise dos dados e elaboração do manuscrito. AKM e FM contribuíram na coleta de dados e análise de dados. MVG e AFS contribuíram com a elaboração do projeto, orientação da dissertação e elaboração do artigo.*

REFERÊNCIAS

- Benítez-Leite S, Macchi ML, Fernández V, Franco D, Ferro EA, Mojoli A, et al. Daño celular en una población infantil potencialmente expuesta a pesticidas. *Pediatr*. 2010;37(2):97-106.
- Palani-Kumar L, Panneerselvam N. Toxic effects of pesticides: a review on cytogenetic biomonitoring studies. *Medicine and Biology*. 2008;15(2):46-50.
- Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. A auto-percepção da saúde auditiva e vestibular de trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev CEFAC*. 2009;11(4):681-687.
- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D, Wang J. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farmworkers. *Nicotine Tob Res*. 2003;5(3):315-21.
- Azevedo APM. Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-55.
- Biesalski HK. Free radical theory of aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(1):5-10.
- Arboleda-Moreno Y, Stella Hoyos L, Carvajal S, Sierra-Torres CH. Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Rev Panam Salud Pública*. 2004;15(6):367-72.
- Fronza AB, Barreto DC, Tochetto TM, Cruz IB, Silveira AF. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011;77(1):107-14.
- Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, et al. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227(1):97-107.
- Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação dos agentes químicos ambientais. *Rev Bras Epidemiol*. 2003;6(2):158-170.
- Hwang ES, Kim GH. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. *Toxicology*. 2007;229(1-2):1-10.
- Kohatsu AGS, Shimabukuro F, Gattás GJF. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. *Saúde, Ética & Justiça*. 2007;12(1):15-21.
- Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat Res*. 2009;675(1-2):1-4.
- Silveira LR. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;48(6):812-22.
- Kemp DT. Development in cochlear mechanics and techniques for noninvasive evaluation. *Advanced Audiology*. 1998;5:27-45.
- Souza LCA, Piza MRT, Alvarenga KF, Cóser PL. Emissões otoacústicas (EOA). In: Souza LCA, Piza MRT, Alvarenga KF, Cóser PL (orgs.). *Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas: princípios e aplicações Clínicas*. São Paulo: Tecmedd, 2008. p.109-31.
- Wagner W, Heppelmann G, Vonthein R, Zenner HP. Test-retest repeatability of distortion product otoacoustic emissions. *Ear Hear*. 2008;29(3):378-91.
- Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radic Res*. 2010;44(6):587-604.
- Rota C, Chignell CF, Mason RP. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(7-8):873-81.
- Costa Krewer C, Ribeiro EE, Ribeiro EA, Moresco RN, Ugalde Marques da Rocha MI, Santos Montagner GF, et al. Habitual intake of guaraná and metabolic morbidities: an epidemiological study of an elderly Amazonian population. *Phytother Res*. 2011. Epub ahead of print
- Coelho MSB, Ferraz JRS, Almeida EOC, Almeida Filho N. As emissões otoacústicas no diagnóstico diferencial das perdas auditivas induzidas por ruído. *Rev CEFAC*. 2010;12(6):1050-8.
- 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.
- Frota S, Iório MCM. Emissões otoacústicas por produto de distorção e audiometria tonal liminar: estudo da mudança temporária do limiar. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68(1):15-20.
- Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(2):238-44.
- Paschoal CP, Azevedo MF. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(6):893-902.
- Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Félix-Gastélum R, et al. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ Int*. 2009;35(8):1155-9.
- Da Silva FR, Da Silva J, Allgayer MC, Simon CF, Dias JF, dos Santos CE, 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.
- Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulka-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(3):249-58.
- Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res*. 2006;40(12):1339-49.
- Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods*. 2005;65(2-3):45-80.