

# INTOXICAÇÕES POR INSETICIDAS

MICRODISSECÇÃO DE NERVOS E HISTOQUÍMICA DE MUSCULOS EM 10 CASOS

*LINEU CESAR WERNECK \**  
*EDISON MATOS NOVAK \*\**

As intoxicações crônicas por inseticidas podem produzir diversas manifestações no sistema nervoso central e periférico, tais como neuropatias motoras puras e mistas, mielopatias e lesões de nervos cranianos<sup>12</sup>. O mecanismo das lesões depende do tipo de inseticida empregado, dose absorvida, tempo de exposição e forma de intoxicação<sup>2,5,13</sup>.

Estudos experimentais de intoxicações por inseticidas demonstraram desmielinização dos nervos periféricos<sup>1,2,14</sup>, porém encontramos poucas descrições de estudos morfológicos de biópsias, apesar do grande número de relatos clínicos<sup>12</sup>.

No presente trabalho nos propomos a estudar os nervos periféricos e músculos de pacientes com intoxicações crônicas e que apresentaram neuropatia. Utilizaremos a técnica de microdissecção de nervos a fim de tentar verificar o tipo de desmielinização e se a mesma é secundária à degeneração axonal ou segmentar, além de estudos rotineiros em parafina e histoquímica de músculos.

## MATERIAL E METODOS

O estudo abrangeu 10 pacientes que apresentavam intoxicação crônica por inseticidas e cujas manifestações clínicas já foram descritas em trabalho anterior<sup>12</sup>. Nenhum destes doentes apresentava sinais clínicos e/ou alterações laboratoriais compatíveis com outra etiologia para a sua neuropatia. Os critérios utilizados para o diagnóstico também já foram descritos em trabalho anterior<sup>12</sup> (contacto frequente com inseticidas, sintomatologia diretamente relacionada à exposição aos compostos, exclusão de outras etiologias, evidência de melhora dos sintomas quando os doentes são afastados do meio ambiente original e presença de níveis elevados de inseticidas em sangue, urina e/ou gordura). A idade, sexo, tipo de inseticida encontrado e as manifestações clínicas estão relacionados na tabela 1. Dos 13 pacientes originais<sup>12</sup>, somente oito foram submetidos a biópsia do nervo sural. Ulteriormente foram incluídos dois novos casos.

Em todos os pacientes foi realizada biópsia do nervo sural na região supra-maleolar, conforme técnica descrita por Dyck e Lofgren<sup>8</sup>. O fascículo do nervo foi fixado em glutaraldeído a 2% durante 10 minutos sendo, a seguir, lavado repetidas vezes em solução tampão de fosfato com pH 7,4 e posteriormente fixado em tetróxido de ósmio a 1% por 3 horas. Logo após o nervo foi mergulhado em glicerina a 33%

---

Trabalho realizado na Disciplina de Neurologia do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba: \*Professor-Assistente de Neurologia; \*\*Médico voluntário. Trabalho apresentado no VIII Congresso Brasileiro de Neurologia (Brasília, setembro de 1978).

por 24 horas e mantido em estufa a 45°C. Após este período, foi trocada a concentração da glicerina para 66% e mantido nas mesmas condições por mais 24 horas. Finalmente passou para glicerina a 100% por mais 24 horas a 45°C sendo, a seguir, armazenado a 0°C em glicerina a 100% ou dissecado em seguida.

A microdissecção foi realizada com pinças curvas especiais, com auxílio de microscópio estereoscópico, sendo o nervo dissecado até se obter somente uma ou duas fibras, as quais foram transferidas para uma lâmina de vidro e montadas em meio de Zeiss G. Para a classificação das fibras utilizou-se os parâmetros descritos por Dyck G.

Os nervos dos casos 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 e 10 foram também submetidos a cortes após inclusão em parafina e corados pela hematoxilina-eosina, tricromo de Gomori e hematoxilina-fosfotúngstica.

Foram também estudados os músculos dos pacientes 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, corados pela hematoxilina-eosina, tricromo de Gomori modificado por Engel e Cunningham, "oil red O", P.A.S. e submetidos aos estudos histoquímicos pela DPNH-diaforase, fosfatase ácida e alcalina, ATPase alcalina (pH 9,4) e ácidas (pH 4,3 e 4,6), esterase inespecífica e miofosforilase, conforme técnicas rotineiras de histoquímica utilizadas em nosso laboratório e descritas na literatura 4.

## RESULTADOS

Foram estudados 7 nervos pela histologia rotineira, sendo que três deles foram normais. Em quatro pacientes (casos 2, 7, 8 e 10) existia fibrose fascicular, com fascículos totalmente desmielinizados e alargamento das bainhas de mielina em certas áreas, o que corresponde a fibra tipo G encontrada na microdissecção (Tabela 2 e figura 1).

Em 9 casos em que foi possível efetuar a microdissecção, seguindo a classificação de Dyck, encontramos anormalidades em todos os nervos. O caso 7 apresentava fibrose total do nervo e não encontramos qualquer estrutura semelhante a bainhas de mielina, sendo inviável a microdissecção. Este caso corresponde ao doente mais afetado clinicamente. Nos casos restantes encontramos as seguintes alterações: diminuição de fibras A + B em 9 casos; fibras C aumentadas em 8 casos; fibras D aumentadas em 7 casos; fibras E aumentadas em 3 casos; fibras F aumentadas em 4 casos; fibras G aumentadas em 6 casos.

Encontramos grande proporção de fibras tipo C em 8 casos, o que traduz alteração nos internodos, bem como do tipo D, com significado semelhante (regeneração). Somente em três casos verificamos alterações de fibras tipo E (degeneração axonal) e em quatro casos, alterações de fibras tipo F (que corresponde a degeneração segmentar). O aspecto mais importante foi o encontro de seis casos com aumento de fibras do tipo G, significando regeneração e proliferação importante da bainha de mielina e, possivelmente, alargamento do axônio (Figs. 2, 3, 4 e 5).

A maioria dos casos apresentava intoxicação por inseticidas do grupo organoclorado (8 em 10 casos), um caso de organofosforado (1 em 10) e um caso de ambos (1 em 10). Neste último, os níveis de organofosforados eram muito maiores que de organoclorados. Pelo número reduzido de pacientes não foi possível comparar as alterações produzidas pelos dois tipos de inseticidas separadamente.

Em 8 pacientes (casos 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 10) foram estudados os músculos, com as biópsias incluídas em parafina e por histoquímica, tendo sido encontrado excesso de fibras angulares, variação no diâmetro das fibras, agrupamento de fibras atroficas, discreta reação inflamatória focal, presença de "grouping" de fibras do mesmo tipo e fibras em alvo ("targets") (Fig. 6). Em alguns casos (os mais comprometidos) existia atrofia importante, mostrando agrupamento de fibras atroficas, infiltração por tecido adiposo e proliferação de tecido conjuntivo (Fig. 7). Estes achados são compatíveis com denervação e, eventualmente, reinervação. Dos 8 músculos examinados, 6 estavam alterados e 2 foram normais (escolhido músculo proximal para a biópsia, que estava pouco ou nada alterado clinicamente).

Caso	Idade (anos)	Sexo	Inseticida		Clínica
			OF	OC	
1	36	M	+++S +++U	+S +U	Parestesias, parestias, atrofia muscular e hipoestesia distal.
2	25	M		+++S +++U	Tetraparesia flácida, atrofia muscular proximal e distal.
3	44	M		+++S +++U	Hipoestesia distal nos quatro membros.
4	51	F		+++S +++U	Paresia e hipoestesia distal nos quatro membros.
5	48	M		+++S +++U +++G	Paresia distal nos quatro membros, com envolvimento dos III, VIII e X pares cranianos.
6	43	M		+++S +++U	Monoparesia e hipoestesia de membro superior direito, lesão de ulnar esquerdo e paralisia de III par craniano esquerdo.
7	46	M	+++S +++U		Tetraparesia flácida, atrofia muscular proximal e distal dos quatro membros.
8	42	M		+S +U +++G	Fasciculações, tetraparesia flácida e hipoestesia distal nos quatro membros.
9	33	M		++S ++U	Tetraparesia flácida sensitivo motora com atrofia muscular de predomínio distal.
10	30	M		++S ++U +G	Paresia motora de predomínio distal, lesão de VIII par craniano bilateral, atrofia muscular e hipoestesia distal.

Tabela 1 — Dados clínicos e tipo de inseticida em 10 pacientes com intoxicação crônica: OF = inseticida organofosforado; OC = inseticida organoclorado; + = traços; ++ = quantidade moderada; +++ = grande quantidade; ++++ = nível letal; S = sangue; U = urina; G = tecido adiposo

Caso	Parafina	Nervo							Músculos
		Microdissecção: % tipo de fibras							
		A+B	C	D	E	F	G		
1	Normal	77	3	3	4	13	2	NR	
2	Fibrose de fascículos Alargamento das bainhas de mielina e axônios. Redução de fibras mieli- nizadas	48	18	16	0	2	16	Denervação	
3	Normal	86	7	2	0	5	0	Normal	
4	NR	56	25	4	0	11	4	NR	
5	Normal	19	8	12	1	4	56	Normal	
6	NR	25	18	0	11	1	45	Denervação	
7	Fibrose difusa. Ausência de mielina							Denervação	
8	Fibrose de fascículos Redução de fibras mieli- nizadas.	48	1	10	1	4	56	Denervação	
9	NR	55	8	3	2	26	6	Denervação	
10	Alargamento das bainhas de mielina e axônios. Redução de fibras mieli- nizadas	56	7	1	29	7	0	Denervação	
Normal (Dyck)		93	1	1	3	6	3		

Tabela 2 — Resultados dos exames de nervos e músculos em 10 pacientes com intoxicação crônica por inseticidas: NR == não realizada.

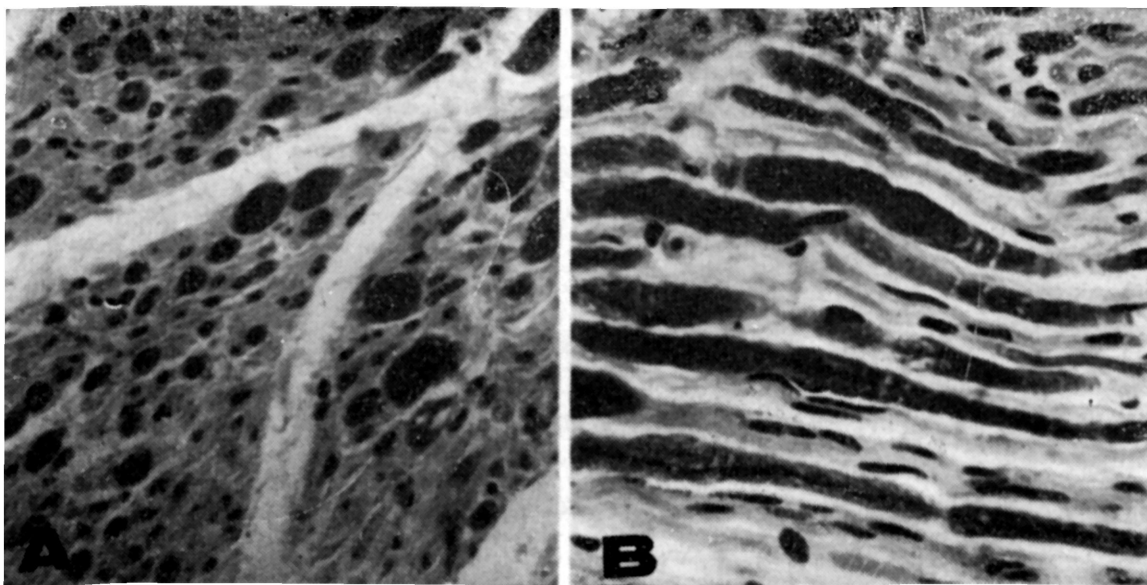
## COMENTARIOS

No estudo de nervos em neuropatias através dos métodos histológicos rotineiros há dificuldade em visualizar uma mesma fibra por um segmento adequado. Como um neurônio sensitivo periférico pode ter até 1,8 m de comprimento por 0,00001 m de diâmetro, o estudo convencional não permite avaliar mais do que alguns micrometros em corte transversal e raramente um segmento adequado em corte longitudinal; além disso esta metódica não permite apreciar quantitativamente as alterações que se produzem nos internodos e regiões paranodais das fibras menores.

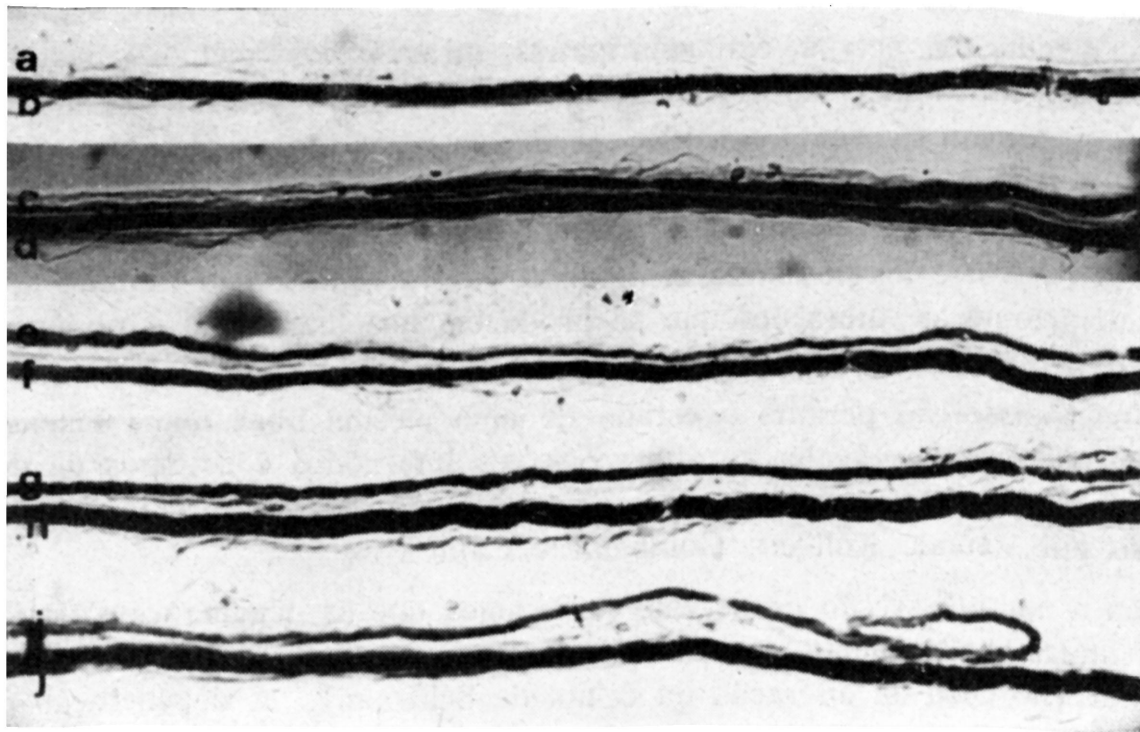
A microdissecção permite o estudo de uma mesma fibra numa extensão de até 2000 micrometros, avalia as alterações nos internodos e os tipos de desmielinização que ocorrem nestes nervos; este método não é recente, tendo sido utilizado por Remak, Kölliker, Gombault e Cajal <sup>6</sup>.

Com a microdissecção de nervos, verificamos que as degenerações da mielina são divididas basicamente em axonal (quando o distúrbio é no axônio) e segmentar (no caso de alteração da célula de Schwann). A degeneração axonal é devida a uma degeneração neuronal que determina a formação de "ovóides" e fragmentação da mielina. Ocorre nas doenças do neurônio motor inferior, herpes zoster, neuropatias dos carcinomas, diabetes mellitus, pelagra, mieloma múltiplo, intoxicações por tri-orto-cresil-fosfato, deficiência de vitamina B12, de tiamina, ácido pantotênico e vitamina E <sup>6</sup>. Este tipo de degeneração é representado na microdissecção por aumento de fibras dos tipos B, C e, especialmente, E.

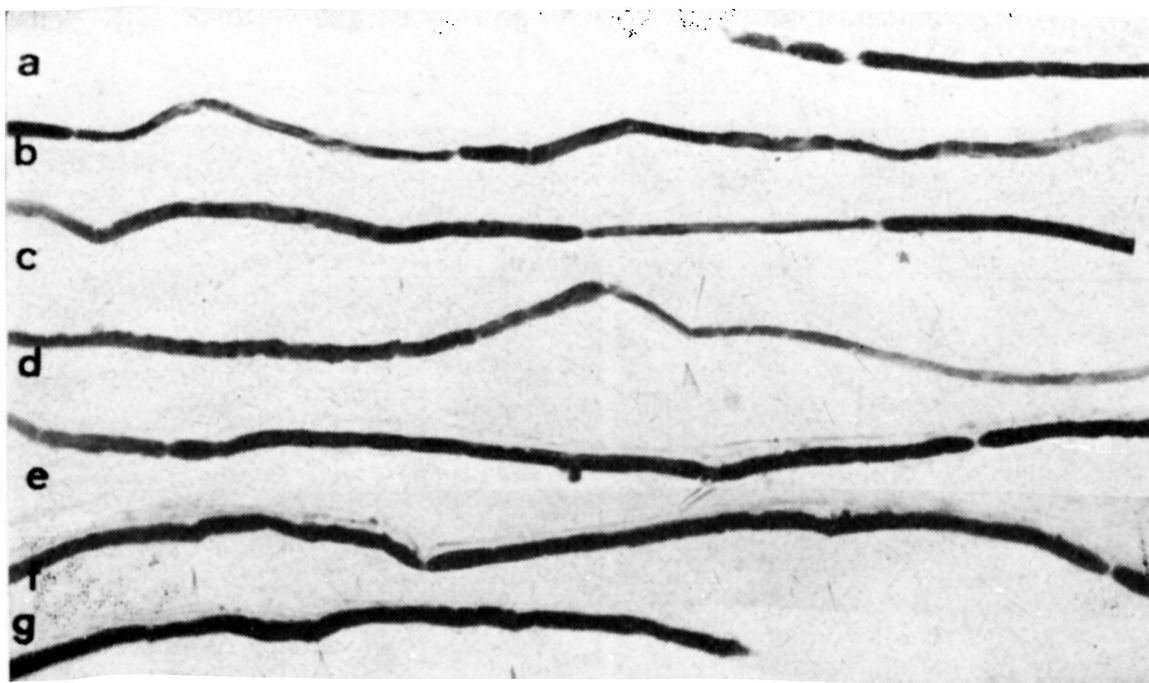
Com a cronicidade do processo ocorrerá desaparecimento progressivo das bainhas de mielina, determinando atrofia axonal distal. Pode ocorrer remielinização e proliferação de células de Schwann, formando fibras em "casca de



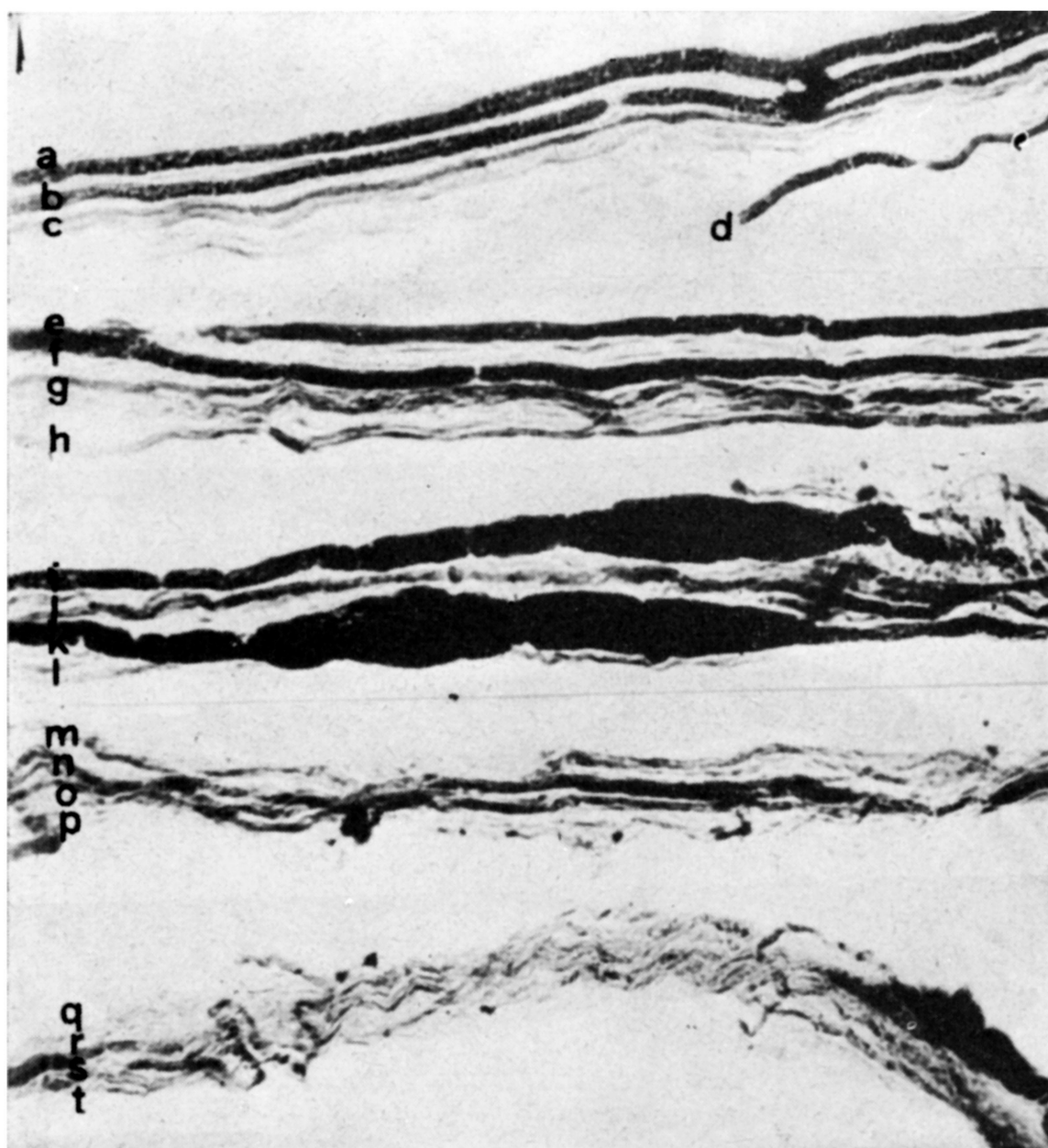
*Fig. 1 — Caso 10. Corte histológico de nervo sural (tricromo de Gomori, 400X, observando-se aumento do tecido conjuntivo intersticial e alargamento das bainhas de mielina. A = corte transversal; B = corte longitudinal).*



*Fig. 2 — Caso 4. Microdissecção do nervo sural (200X) de duas fibras. A seqüência da fibra (a, c, e, g, i) mostra alterações do tipo D; a seqüência da outra fibra (b, d, f, h, j) mostra alterações do tipo B.*

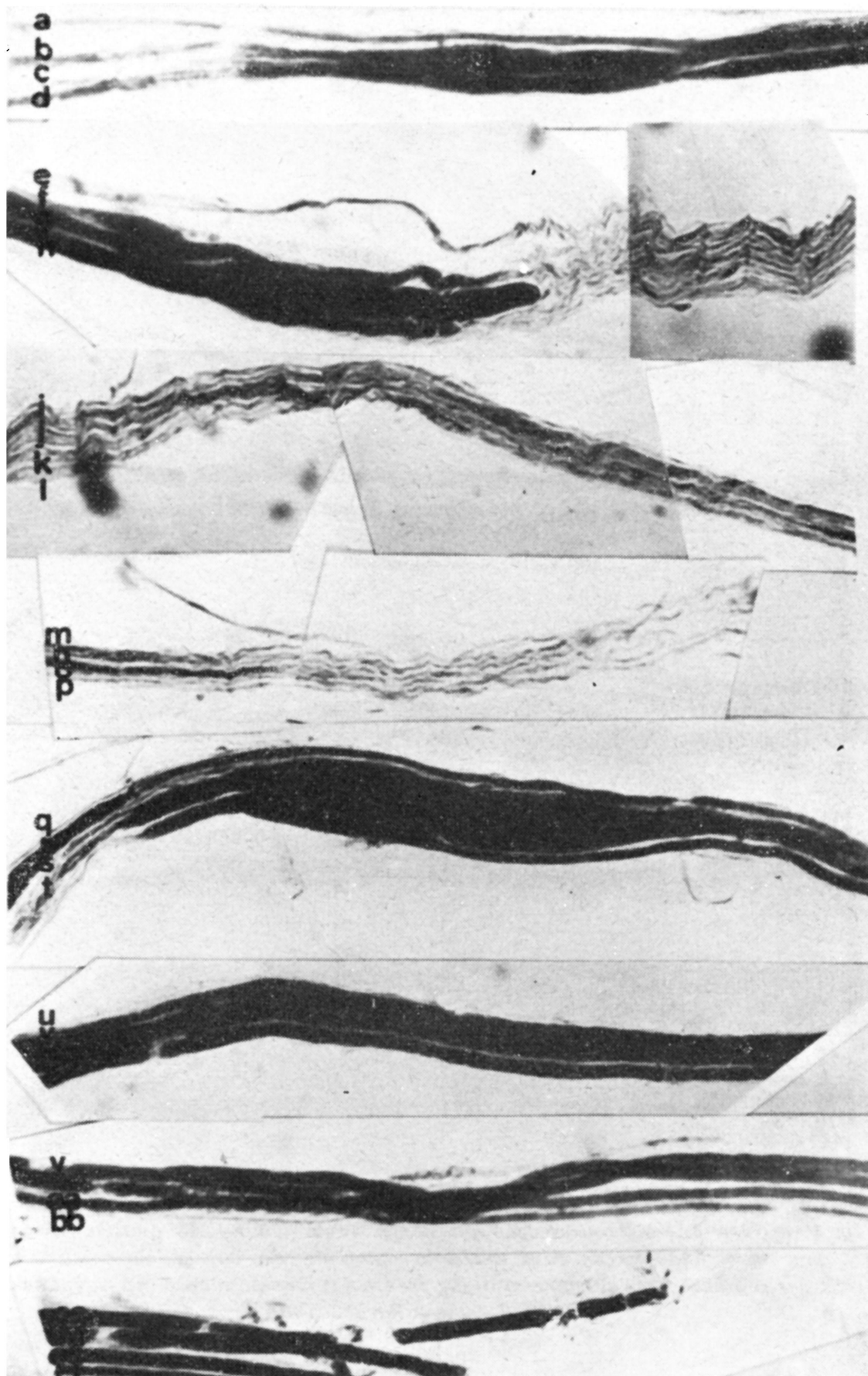


*Fig. 3 — Caso 3. Microdissecção do nervo sural (200X) de uma mesma fibra, mostrando a seqüência de a-g com alterações do tipo F, bem evidente no segmento c, com diminuição da distância entre os nódulos de Ranvier e redução do calibre.*



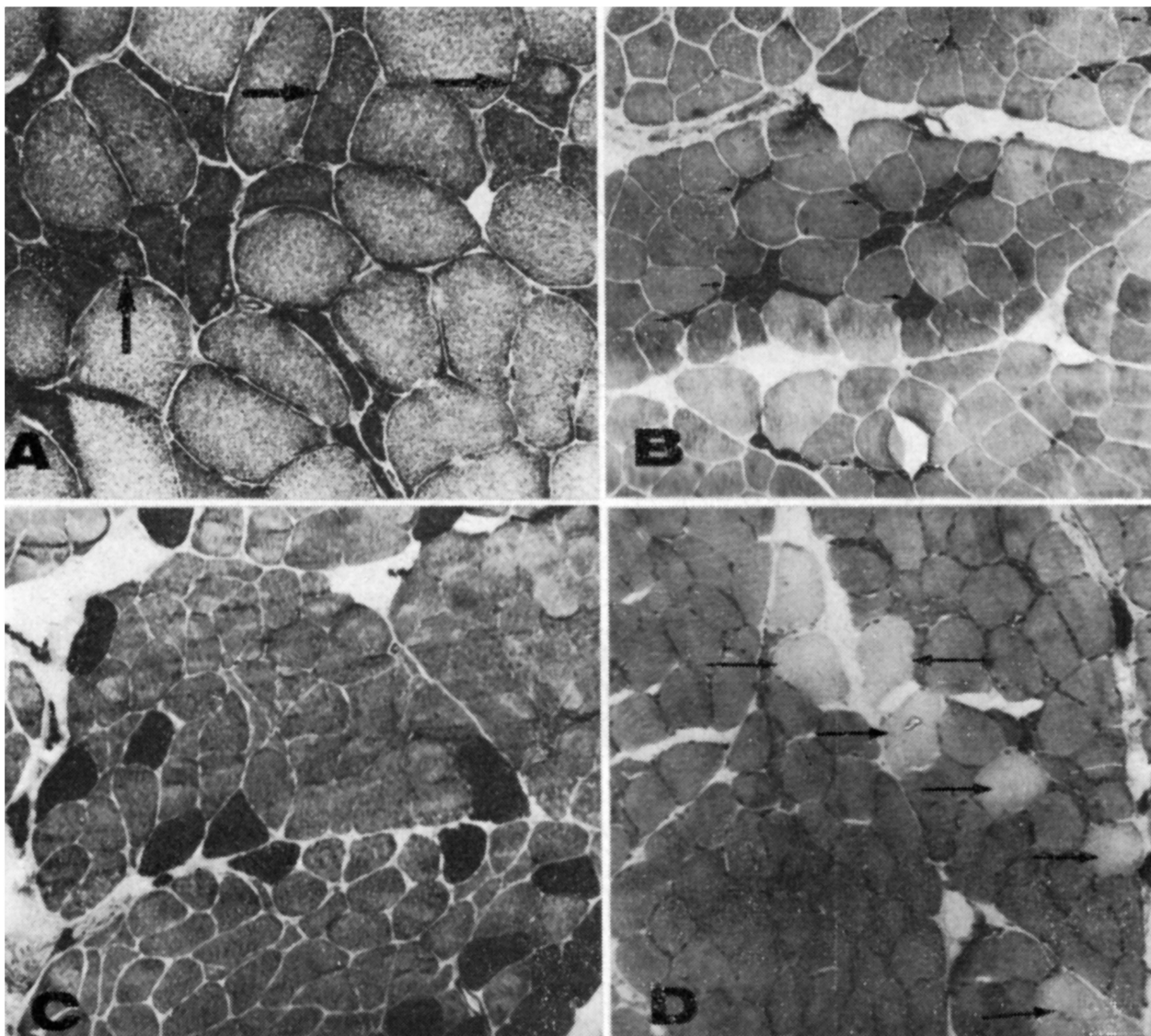
*Fig. 4 — Caso 5. Microdissecção do nervo sural (200X) de quatro fibras, mostrando areas com ausência completa de bainha de mielina e regiões com alargamento da mesma, principalmente na sequência i, j, k, l, com alterações do tipo G.*



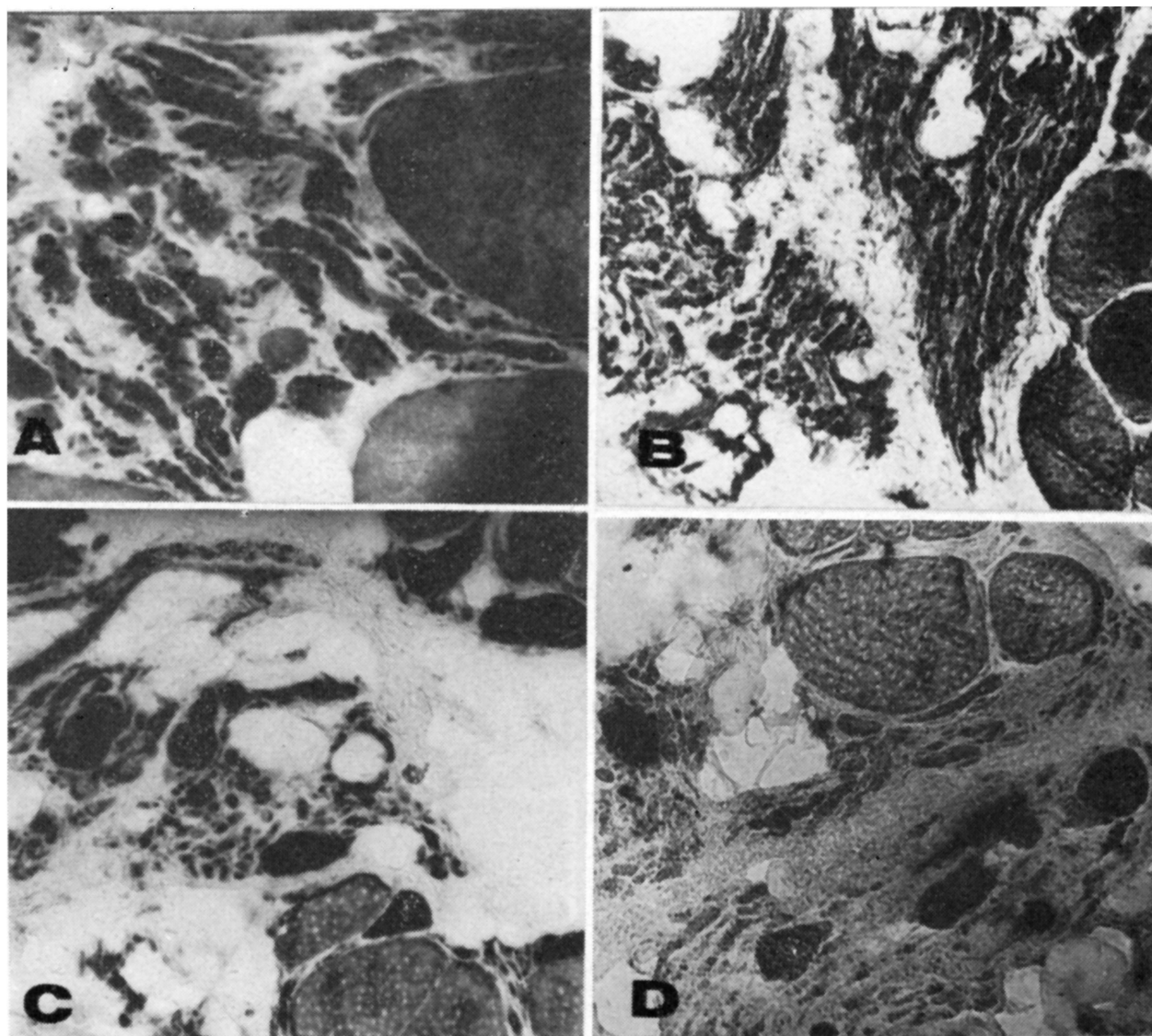


*Fig. 5 — Caso 6. Microdissecção do nervo sural (200X) de quatro fibras mostrando alterações do tipo C nos segmentos e, f, g, h, q, r, s, t. Note-se grandes extensões de axônio desprovido de bainha de mielina e áreas com dilatação e alargamento da mielina.*





*Fig. 6 — Caso 10. Histoquímica de músculo gastrocnêmio: em A (DPNH-diaforase, 200X), mostrando fibras escuras, angulares, com formação de alvos (setas); em B (esterase inespecífica, 100X), mostrando fibras angulares escuras (setas); em C (ATPase pH 9,4, 100X), revelando predominância e “grouping” de fibras tipo I (claras); em D (ATPase pH 4,3, 100X), revelando “grouping” de fibras tipo I (escuras), sendo as fibras tipo II claras nesta reação (setas).*



*Fig. 7 — Caso 8. Histoquímica de músculo quadriceps, notando-se grupos de fibras atróficas, ao lado de fibras hipertróficas, aumento do tecido conjuntivo intersticial e infiltração por tecido adiposo. As fibras hipertróficas apresentam ocasional divisão (splitting). Em A, tricromo de Gomori modificado, 200X; em B, DPNH-diaforase, 100X; em C, ATPase pH 4,6, 100X; em D, fosfatase alcalina, 100X, com ocasional fibra positiva (escura) e atividade normal no tecido conjuntivo intersticial.*

cebola”<sup>15</sup>. Ocorre excessiva variação no comprimento do internodo e no seu diâmetro. De internodo em internodo existe grande variação na espessura da bainha de mielina. Em alguns nervos, cada fibra dissecada pode ter de 4 a 6 mm de extensão com ausência de mielina. Estas alterações estão presentes na atrofia peroneal progressiva, atrofia muscular proximal juvenil, ataxia de Friedreich, degenerações espino-cerebelares, neuropatia sensitiva dominante tipo I, neuropatia sensitiva recessiva tipo II (Riley-Day), neuropatia espástica e atrofia peroneal, doença de Fabry, deficiência de alfa e beta lipoproteínas, doença de Dejerine-Sottas e doença de Refsum<sup>6</sup>. Representam principalmente as fibras dos tipos G e D.

Por outro lado, quando a célula de Schwann é lesada, as alterações na microdissecção são representadas por fibras do tipo F, formando as desmielinizações segmentares. Nestas condições, os internodos são mais curtos, as fibras de diâmetro menor, os segmentos internodais menores, intercalados entre as fibras normais. Existem dois tipos de desmielinização segmentar, sendo que em um a anormalidade é seletiva da célula de Schwann (leucodistrofia meta-cromática, doença de Krabbe, doença de Refsum, doença de Dejerine-Sottas, difteria, encefalites alérgicas experimentais, lesões secundárias a vacinações e desmielinizações dos plexos braquial e lombar); no outro tipo, o processo básico está no próprio axônio, com retração segmentar do mesmo e com diminuição total do volume da bainha de mielina, tudo constituindo a chamada degeneração segmentar secundária a degeneração axonal, que pode ser encontrada na uremia<sup>7,16</sup>. Quando o processo axonal é crônico, este tipo de alteração aparece com maior frequência, ao contrário dos processos agudos, como na degeneração Walleriana.

Baseados nos critérios descritos acima e nos resultados obtidos na microdissecção de nossos casos, podemos afirmar que encontramos atrofia axonal com degeneração segmentar secundária em seis dos nove casos dissecados, pelo excessivo aumento de fibras tipo G, aumento considerável de fibras tipo F e aumento importante de fibras tipos C, D e E. O aumento de fibras tipo F e D refletem regeneração. Portanto, os inseticidas organoclorados parecem atuar principalmente nos axônios, tendo as células de Schwann papel secundário na patogenia.

Não encontramos na literatura consultada estudo semelhante e, portanto, as comparações somente podem ser feitas com os experimentos animais e com estudos histológicos rotineiros. Com o DDT foi verificada a presença de degeneração e destruição das células motoras do corno anterior da medula<sup>2</sup>. Ao usarem compostos organofosforados, alguns autores encontraram desmielinização nos nervos periféricos, mais importante na porção distal dos membros, desmielinização com fragmentação da mielina e moderada degeneração afetando os neurônios do corno anterior da medula<sup>14</sup>.

Nas intoxicações industriais por acrilamida e N-butil-metil-cetona foram relatadas alterações similares às encontradas nos nossos pacientes, referindo intumescimento focal da bainha de mielina, principalmente nas porções paranodais e através de microscopia eletrônica os autores concluindo se tratar de alterações secundárias ao fenômeno de "dying back"<sup>3</sup>. Estas duas substâncias são utilizadas para reproduzir experimentalmente o fenômeno de "dying back", isto é, disfunção distal do axônio por interferência no mecanismo trófico, oriundo de sua porção proximal, que tem origem no corpo do próprio neurônio, células de Schwann, axônio ou no fluxo axoplásmico<sup>3</sup>.

Quanto aos músculos, como ocorre em qualquer neuropatia, as alterações são secundárias à denervação. Encontramos na literatura somente uma referência a biópsia muscular em intoxicação por inseticidas<sup>11</sup>, onde Namba e col. relatam atrofia por denervação. Existem trabalhos experimentais utilizando produtos organofosforados não-inseticidas, demonstrando que o excesso de acetilcolina no músculo leva a uma miopatia com necrose de certas fibras, com infiltrado

inflamatório<sup>9,10</sup>. Estas alterações não ocorrem se o nervo é previamente seccionado, postulando a existência de um fator patogênico central, mediado pela acetilcolina<sup>9,10</sup>.

Portanto, acreditamos que as intoxicações crônicas por inseticidas interferem no metabolismo dos neurônios, determinando alterações no seu axônio, o que leva a uma neuropatia periférica distal, com desmielinização e disfunção secundária das células de Schwann. Pela cronicidade do processo pode ocorrer remielinização ou lesão completa do nervo, com fibrose. A lesão muscular é secundária à denervação, como ocorre com qualquer outra polineurite.

#### RESUMO

É relatado o estudo de nervo sural e músculos em 10 pacientes com intoxicações crônicas por inseticidas organoclorados e organofosforados, sendo utilizadas técnicas de microdissecção de nervos e histoquímica de músculos. Foram estudados os nervos surais de 9 pacientes por microdissecção, tendo sido encontrado anormalidades em todos, predominando a presença de fibras dos tipos C, D e grande quantidade de fibras G, conforme a classificação de Dyck; o nervo do décimo paciente apresentava-se totalmente desmielinizado. Em 8 casos foram estudados músculos com inclusão em parafina e por histoquímica, sendo encontrada denervação em seis; os restantes eram músculos normais. Os autores concluem que o processo atua predominantemente nos axônios, provocando degeneração axonal distal, com fenômeno de "dying back".

#### SUMMARY

*Insecticides intoxication: a nerve teased fibers preparation and muscle histochemistry study in 10 cases.*

A sural nerve and a muscle biopsy study of patients with chronic insecticides poisoning, with teased fiber preparations, routine pathologic studies of nerves and histochemistry of muscle is reported.

The sural nerves of ten patients were studied and a teased fiber preparation was done in nine. The tenth patient had only fibrosis and no myelin was found. The sural nerves were abnormal in all patients and the teased fiber preparation resulted in preponderance of type C, D and large amount of G type fibers, according to Dyck's classification. These fibers had enlargement of the axon and myelin sheath, also seen in routine sections. The muscle biopsy with routine and histochemistry methods was done in 8 cases; in 6 there was found signs of denervation; the remaining cases were normal, but these were proximal muscles. The authors conclude that the process primarily interfere with the functions of the axons, with distal axonal degeneration and a dying back phenomenon.

## REFERENCIAS

1. BARNES, J. M. & DENZ, F. A. — Experimental demyelination with organophosphorus compounds. *J. Path. Bact.* 65:597, 1953.
2. CAMERON, G. R. & BURGESS, F. — The toxicity of 2,2-bis(p-chlorophenyl) 1,1,1-trichlorethane (DDT). *Brit. Med. J.* 1:865, 1945.
3. DAVENPORT, J. G.; FARREL, D. F. & SUMI, S. M. — Giant axonal neuropathy caused by industrial chemicals: neurofilamentous axonal masses in man. *Neurology (Minneapolis)* 26:919, 1976.
4. DUBOWITZ, V. & BROOKE, M. H. — *Muscle Biopsy: A Modern Approach*. W. B. Saunders Co. Ltd., Philadelphia, 1973.
5. DURHAM, W. F. & HAYES, W. — Organic phosphorus poisoning and its therapy. *Arch. Environ. Health* 5:21, 1962.
6. DYCK, P. J. — Pathologic alterations of the peripheral nervous system of man. *In* Dyck, P. J., Thomas, P. K. & Lambert, E. H. — *Peripheral Neuropathy*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1975.
7. DYCK, P. J.; JOHNSON, W. J.; LAMBERT, E. H. & O'BRIEN, P. C. — Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. *Mayo Clin. Proc.* 46:400, 1971.
8. DYCK, P. J. & LOFGREN, E. — Nerve biopsy: choice of nerve, method, symptoms and usefulness. *Med. Clin. N. Amer.* 52:885, 1968.
9. FENICHEL, G. N.; DETTBARN, W. D. & NEWMAN, T. M. — An experimental myopathy secondary to excessive acetylcholine release. *Neurology (Minneapolis)* 24:41, 1974.
10. FENICHEL, G. M.; KIBLER, W. B.; OLSON, W. H. & DETTBARN, W. D. — Chronic inhibition of cholinesterase as a cause of myopathy. *Neurology (Minneapolis)* 22:1026, 1972.
11. NAMBA, T.; NOLTE, C. T.; JACKREL, J. & GROB, D. — Poisoning due to organophosphate insecticides. *Am. J. Med.* 50:475, 1971.
12. NOVAK, E. M. & WERNECK, L. C. — Comprometimento neurológico por inseticidas: estudo das manifestações crônicas em 13 casos. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 35:129, 1977.
13. ROCHA, E. E. M.; OLIVEIRA, F.; MORINIGO, F. & HONIGMAN, I. — Intoxicações por inseticidas. *J. Bras. Med.* 23:152, 1972.
14. SMITH, M. I. & LILLIE, R. D. — The histopathology of triorthocresyl phosphate poisoning. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago)* 26:976, 1931.
15. WERNECK, L. C. & MENDONÇA, E. — Neurite hipertrófica intersticial: estudo de três casos. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 36:250, 1978.
16. WERNECK, L. C.; MULINARI, A. S.; LAFITTE, A. & NOVAK, E. M. — Neuropatia urêmica: análise morfológica por microdissecção do nervo sural. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Nefrologia, Curitiba, 1976.