

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Departamento de Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica**

**Indicadores biológicos e manifestações de neurotoxicidade em  
agricultores com exposição crônica a níveis baixos de  
pesticidas organofosforados**

Rosane Maria Salvi

Orientador: Professor Dr. Renato Dutra Dias  
Co-Orientador: Professor Dr. Diogo Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas - Bioquímica, como requisito parcial à obtenção do  
grau de Doutor em Bioquímica

Porto Alegre  
2003

## AGRADECIMENTOS

“O mundo não é humano simplesmente por ser feito por seres humanos, e nem se torna humano simplesmente porque a voz humana nele ressoa, mas quando se torna objeto de discurso” (*Hannah Arendt*).

Agradeço aos colegas e amigos que me conduzem nesta direção:

Ao amigo e Professor Dr. Renato Dutra Dias pela sua orientação e capacidade de ser agente transformador.

Ao amigo e Professor Dr. Diogo O. Souza pela sua orientação e incentivo incansável na realização do estudo.

Aos amigos Dr. Diogo R. Lara, Dr. Eduardo S. Ghisolfi, Dr. Luis V. Portela e Dr. Flávio Kapczinski pela convivência e aprendizado proporcionados durante a elaboração dos artigos.

Aos Professores Dr. Urbano Zilles e Dr. Diógenes S. Santos pelo apoio à realização do trabalho.

Às colegas Carolina M. de Abreu e Flavia V. Thiesen pela amizade e atenção sempre presentes.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica do ICBS / UFRGS pelo profissionalismo e amizade.

Aos colegas e amigos do Centro de Informação Toxicológica (CIT /RS) pelo apoio na busca de dados.

À comunidade de Novo Cabrais e EMATER/RS pela organização e participação no grupo de trabalho.

À minha Família de quem recebi carinho e motivação.

## RESUMO

### **Indicadores biológicos e manifestações de neurotoxicidade em agricultores com exposição crônica a níveis baixos de pesticidas organofosforados.**

A exposição crônica a níveis baixos de pesticidas é acompanhada por processos adaptativos orgânicos responsáveis por quadros de tolerância, onde manifestações clínicas e laboratoriais perdem a sua validade como parâmetro de exposição. Na amostra foram analisados 25 trabalhadores rurais na região central do Estado do Rio Grande do Sul, de ambos os sexos, com idade de  $37 \pm 13$  anos, investigados em dois momentos: durante e no intervalo de aplicação de pesticidas. Os resultados evidenciaram exposição diária aos produtos (durante  $17.8 \pm 11.8$  anos) e baixo índice de utilização de Equipamentos de Proteção Individual.

Em vigência da exposição, foram identificados sintomas extrapiramidais significativos em 12 indivíduos, medido pelo escore total de parkinsonismo (ESRS). Mesmo que este número tenha diminuído após 3 meses da exposição aos OPs, 9 indivíduos permaneceram com o escore elevado. Este número é significativo, levando-se em conta a faixa etária da população investigada.

Da mesma forma, o número de diagnósticos psiquiátricos Axis I durante a exposição aos OPs foi mais prevalente que o esperado, principalmente relacionados à ansiedade e depressão. Durante a exposição, 18 pacientes (48%) apresentaram diagnóstico de ansiedade generalizada e 8 (21%) de episódios de depressão maior. Na

entrevista que correspondeu ao período de exposição, 11 indivíduos apresentaram 24 diagnósticos psiquiátricos. Na segunda entrevista (sem exposição), este número foi reduzido para 7 pessoas com um total de 11 diagnósticos psiquiátricos. Entre os indivíduos que completaram ambas as avaliações (durante e no intervalo da exposição), o total de diagnósticos psiquiátricos foi reduzido de 24 para 13 e houve decréscimo no número de indivíduos com qualquer diagnóstico psiquiátrico, de 11 para 7, que é próximo ao esperado para grupos locais, de acordo com dados epidemiológicos realizados no Estado do RS.

A medida da atividade da acetilcolinesterase não apresentou diferença significativa quando comparados os dados obtidos em presença e fora da exposição.

No estudo, 52% dos trabalhadores desenvolveram episódios anteriores de intoxicação e, no momento da avaliação, apresentavam índices elevados de efeitos extrapiramidais e de diagnósticos psiquiátricos (depressão e ansiedade). Estes fatos conduzem para neurotoxicidade que envolve o uso destes compostos, mesmo que transitória, e determina a necessidade de busca de parâmetros indicativos de intoxicação a compostos potencialmente neurotóxicos, em indivíduos submetidos a exposições prolongadas a baixas doses.

Dados adicionais da investigação consistiram no estudo dos níveis plasmáticos das proteínas S100B (marcadora de lesão de astrócitos) e da enolase específica de neurônios (NSE), em 24 agricultores, obtidos durante e no período pós-exposição aos pesticidas organofosforados. No estudo, não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos da proteína S100B, quando comparados os dois momentos. Entretanto,

estes mesmos indivíduos apresentaram diferença nos níveis plasmáticos da NSE, mostrando-se mais elevada no período correspondente ao pós-exposição, quando comparados ao mesmo grupo, durante a exposição, e ao controle. Uma hipótese proposta pelos autores consiste na possibilidade de que a elevação da NSE, após término da exposição aos OPs, reproduza os fenômenos observados em quadros de isquemia cerebral, onde é observada morte neuronal tardia.

## ABSTRACT

### **Biological indicators and manifestations of neurotoxicity in farmers chronically exposed to low levels of organophosphorus pesticides.**

Chronic exposure to low levels of pesticides is accompanied by organic adaptive processes which cause tolerance, in which clinical and laboratory manifestations lose their validity as a parameter of exposure. In the sample, 25 rural workers were analyzed, from the central region of the State of Rio Grande do Sul, of both sexes, aged 37 +/- 13 years, investigated at two points in time: during and after the use of pesticides. The results showed daily exposure to the products (for 17.8 +/- 11.8 years) and a low rate of use of Individual Protection Equipment.

During exposure, significant extrapyramidal symptoms were identified in 12 individuals, measured by the total score of Parkinsonism (ESRS). Even though this number diminished 3 months after exposure to OPs, 9 individuals continued to have a high score. This is a significant number, if the age group of the population investigated is taken into account.

Equally, the number of Axis 1 psychiatric diagnoses during exposure to OPs was more highly prevalent than expected, especially as related to anxiety and depression. During exposure, 18 patients (48%) presented a diagnosis of generalized anxiety and 8 (21%) episodes of major depression. Among the individuals who completed both

evaluations (during and after exposure), the total number of psychiatric diagnoses decreased from 24 to 13, and the number of individuals with any psychiatric diagnosis decreased from 11 to 7, which is close to the expected for local groups according to epidemiological data from the state of Rio Grande do Sul.

The measure of acetylcholinesterase activity did not present a significant difference when the data obtained in the presence of and without exposure were compared. Equally, there was no significant difference in relation to the levels of protein S100B, including the control group in this comparison.

In the study, 52% of the workers developed previous episodes of poisoning and, at the time of evaluation, presented high rates of extrapyramidal effects and psychiatric diagnoses (depression and anxiety). These facts are a reflection of neurotoxicity, even though transiently, and establish the need to seek parameters which will indicate poisoning in individuals who undergo chronic exposures to low doses.

Additional data on the investigation consisted in studying the plasma levels of the S100B proteins (astrocyte lesion markers), and the specific neuronal enolase (NSE), in 24 rural workers, obtained during and after exposure to organophosphate pesticides. In the study, no significant difference was found in the plasma levels of S100B, when the moments during and post-exposure, and even the control group were compared. However, the same individuals presented a significant difference in the NSE plasma levels, higher during the period corresponding to post-exposure, as compared to the same group during exposure, and to the control. A hypothesis proposed by the authors consists of the possibility that the rise in NSE after exposure has ended, will reproduce

the phenomena observed in pictures of brain ischemia, where late neuronal death is observed.



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
1 Pesticidas Organofosforados	02
1.1 Acefato e Clorpirifós	03
a) Toxicocinética	03
b) Toxicodinâmica e manifestações clínicas	04
c) Diagnóstico e tratamento da intoxicação	07
1.2 Glifosato	09
a) Toxicocinética	09
b) Toxicodinâmica e manifestações clínicas	10
c) Diagnóstico e tratamento da intoxicação	11
2 Marcadores periféricos de lesão cerebral	14
2.1 Proteína S100B	14
2.2 Enolase específica de neurônios (NSE)	17
3 Objetivos	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
<b>ASPECTOS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS DOS AGRICULTORES SUBMETIDOS À EXPOSIÇÃO CRÔNICA A PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS</b>	20
<b>Capítulo I</b> – Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides	21
<b>Capítulo II</b> – Serum biochemical marker S100B in workers exposed to organophosphate pesticides	27
<b>Capítulo III</b> – Medida da enolase específica de neurônios (NSE) em trabalhadores expostos a pesticidas organofosforados	42
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	48

<b>PERSPECTIVAS</b>	53
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	54
<b>ANEXOS</b>	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Síndrome Colinérgica Aguda (SCA) decorrente de exposição a Acefato e Clorpirifós	05
<b>Tabela 2</b> – Classificação de gravidade da intoxicação aguda após ingestão de Glifosato	10
<b>Tabela 3</b> – Publicações a respeito do papel dos pesticidas Organofosforados Acefato, Clorpirifós e Glifosato na instalação de efeitos neurocomportamentais	12
<b>Tabela 4</b> – Referências da literatura sobre variações dos níveis da proteína S100B	17
<b>Tabela 5</b> – Referências da literatura sobre variações dos níveis da enolase específica de neurônios (NSE)	18

# **INTRODUÇÃO GERAL**

## **PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

(Referências na página 53)

## **1. Pesticidas Organofosforados**

Na cultura do fumo, na região central do Estado do Rio Grande do Sul, são aplicadas diversas classes de pesticidas. Atualmente, um esquema padrão é constituído por compostos organofosforados (acefato, clorpirifós e glifosato), imidaclopride, flumetralina, iprodione e clomazone. Destes, os pesticidas organofosforados são sabidamente substâncias neurotóxicas, tanto em exposições agudas quanto crônicas (Barbosa e Leite, 2001).

Os pesticidas organofosforados são caracterizados pela presença de ligação estável carbono-fósforo na molécula (Obojska et al, 2002). Classicamente, estes compostos foram agrupados de acordo com a sua capacidade em determinar inibição da enzima acetilcolinesterase e, neste sentido, caracterizados como inibidores reversíveis e irreversíveis. Entretanto, existe uma tendência atual de redefinir o grupo de organofosforados, a qual indicaria compostos que potencialmente atuam como fonte de fósforo, mesmo que não possuam toxicocinética e toxicodinâmica semelhantes (Austin et al, 1991; Obojska et al, 2002; Axelrad et al, 2003). Esta será a linha adotada por este estudo, quando as referências a organofosforados incluirão os compostos Acefato, Clorpirifós e Glifosato.

## 1.1 Acefato e Clorpirifós

Os pesticidas organofosforados (OPs) permanecem como problema de saúde nos países do terceiro mundo. Os dados obtidos no Centro de Informações Toxicológicas do Estado do Rio Grande do Sul (CIT/RS), referentes ao período de 2000 a 2002, indicam 923 registros de intoxicação, sendo que, destes, 18 evoluíram para o óbito. Cabe salientar que as informações refletem somente os casos notificados, não incluindo as condições em que a intoxicação foi tratada sem a necessidade de apoio do referido Centro. As propriedades fito e zoossanitárias dos OPs têm determinado a persistência do uso destes na agropecuária, no combate a vetores de doenças e em ambientes domésticos, com preparados de baixa toxicidade (CIT/RS, 2003).

Existe mais de uma centena de OPs que diferem entre si de acordo com a lipossolubilidade, meia-vida, conversão a metabólitos ativos, ligação ao antídoto e sua capacidade de instalar quadros neuropsiquiátricos tardios. Acefato e Clorpirifós são pesticidas utilizados no controle de pragas de plantas, atuando como inseticidas e acaricidas, classicamente caracterizados como inibidores da acetilcolinesterase.

### *a) Toxicocinética*

Acefato e Clorpirifós penetram no organismo através das vias oral, cutânea e respiratória. A via oral está envolvida em casos de ingestão acidental ou intencional. Nas situações de exposição ocupacional, as vias de absorção mais comuns são respiratória e dérmica. Quando na circulação, estes inseticidas são amplamente distribuídos no organismo, ultrapassando as barreiras placentária e hematoencefálica. Estes OPs são biotransformados por enzimas microsossomais hepáticas e por

paraoxonases. Os metabólitos formados após a biotransformação são excretados pelo rim, sendo detectados na urina até 12 a 48 horas após a exposição. Uma pequena quantidade pode ser eliminada do organismo através das fezes (Ellenhorn, 1997).

*b) Toxicodinâmica e manifestações clínicas na intoxicação*

A toxicidade aguda de Acefato e Clorpirifós se deve à inibição da acetilcolinesterase. Este efeito resulta em elevação da acetilcolina na sinapse, o que leva à ativação persistente de seus receptores: i) nicotínicos ionotrópicos, localizados nos gânglios parassimpáticos e simpáticos, placa motora e cérebro e ii) receptores muscarínicos metabotrópicos, presentes nas glândulas de secreção externa, coração, musculatura lisa e cérebro. Assim, as manifestações iniciais seguem um padrão parassimpaticomimético, descrito como Síndrome Colinérgica Aguda (SCA). A SCA se instala em um período de até 24 horas após a exposição aos OPs. Os efeitos listados na **Tabela 1** são observados com a redução de, pelo menos, 30% da atividade enzimática. Entretanto, publicações recentes apontam para a presença de sintomas, como cefaléia, irritabilidade, insônia, fraqueza muscular e alterações da libido, sem a alteração simultânea da atividade enzimática (Nava et al, 1999).

**Tabela 1** - Síndrome Colinérgica Aguda (SCA) decorrente de exposição a Acefato e Clorpirifós

Receptores muscarínicos	Receptores nicotínicos	Receptores centrais
<u>Cardiovascular</u> bradicardia hipotensão	<u>Cardiovascular</u> taquicardia hipertensão	ansiedade cansaço ataxia
<u>Respiratório</u> rinorréia broncorréia broncoespasmo tosse	<u>Músculo-esquelético</u> fraqueza fasciculações paralisia	insônia disartria tremores coma
<u>Gastrointestinal</u> sialorréia náuseas e vômitos dor abdominal diarréia incontinência fecal		
<u>Gênito-urinário</u> incontinência urinária		
<u>Ocular</u> borramento visual lacrimejamento miose		
<u>Outros</u> sudorese aumentada		

Fontes: London et al (1998); Nava et al (1999); Peter e Cherian (2000).

A Síndrome Intermediária (SI) consiste em uma entidade clínica distinta da anterior, que se desenvolve 24 a 96 horas após a SCA. Neste período os efeitos colinérgicos já regrediram. Em 70% dos casos, a insuficiência respiratória é significativa, determinando a necessidade de ventilação mecânica. Diferentes níveis de paralisia de nervos cranianos, como facial e ocular externo, e dos flexores do pescoço são igualmente observados. Esta última é responsável por fraqueza marcada da musculatura do pescoço, incapacitando o paciente de elevar a cabeça do travesseiro. A SI persiste por 4 a 18 dias (He et al, 1998; Sudakin et al, 2000). Até o momento, se



desconhece a toxicodinâmica deste quadro. Os compostos implicados na instalação de SI são Fention, Dimetoato, Monocrotofós, Metamidofós e Clorpirifós (Peter e Cherian, 2000; Guadarrama e Naveda, 2001; Bastidas, 2001).

A Neuropatia Tardia (NPT) induzida por estes inseticidas se instala 2 a 3 semanas após a SCA, caracterizada por axonopatia distal motora e sensitiva e descrita após a ingestão de doses elevadas de pesticidas, como Clorpirifós, Leptofós, Fention, Fenosulfon, Metamidofós e Triclorfon. A NPT tem sido relacionada à capacidade dos OPs em promover inibição da esterase neurotóxica (NTE), presente no cérebro, medula espinhal e nervos periféricos (Ellenhorn e Barceloux, 1997; Peter e Cherian, 2000, Lascala et al, 2000; Sudakin et al, 2000; Chuang et al, 2002). A recuperação ocorre em torno de 6 a 12 meses após a intoxicação, entretanto algumas manifestações podem ser irreversíveis.

Considerando-se sintomas psiquiátricos, Amr et al (1997) observaram que, comparado a grupos controles, indivíduos expostos a inibidores da acetilcolinesterase (40 h/semana, 9 meses/ano) apresentam aumento significativo na frequência de desordens psiquiátricas, principalmente depressão e ansiedade. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos de Stallones e Beseler (2002), onde compostos como Clorpirifós e Diclorvós estavam presentes. Estas manifestações podem persistir por meses após término da exposição. Outros achados neuropsiquiátricos foram identificados em pacientes intoxicados, como perda de apetite, dificuldade de concentração, alteração da memória, redução do tempo de reação, labilidade afetiva, confusão e irritabilidade (Levin et al,1976).

Exposições agudas a inibidores da acetilcolinesterase, devido à ingestão intencional de alguns produtos, evoluíram para instalação de manifestações extrapiramidais transitórias. Nos casos relatados, estes efeitos tiveram a duração de um período que oscilou entre 4 a 40 dias. As alterações citadas incluíam distonia, coreoatetose, tremores e rigidez em roda denteadas (Senanayake e Johnson, 1982; Joubert, 1988; London et al, 1998; Peter e Cherian, 2000; Shahar e Andraws, 2001).

### *c) Diagnóstico e tratamento da intoxicação*

O diagnóstico de intoxicação aguda à Acefato e Clorpirifós é fundamentado na história de exposição, avaliação clínica e provas laboratoriais. Uma vez que estas substâncias produzem inibição da atividade da acetilcolinesterase, a medida desta, no plasma ou eritrócito, confirmará a intoxicação aguda.

A acetilcolinesterase eritrocitária (verdadeira) é encontrada no tecido nervoso, eritrócitos, pulmão e baço. Após inibição, a acetilcolinesterase verdadeira se regenera de forma lenta e, em intoxicações severas, pode permanecer alterada por um período acima de 3 meses. Pacientes portadores de anemia perniciosa ou em uso de fármacos antimaláricos apresentaram redução da atividade desta enzima (Ellenhorn e Barceloux, 1997).

O fígado produz a maior parte da acetilcolinesterase plasmática (butirilcolinesterase, pseudocolinesterase), mas esta é igualmente encontrada no tecido nervoso, pâncreas e coração. Reduções na sua atividade podem ser observadas em patologias hepáticas parenquimatosas, insuficiência cardíaca acompanhada de hepatomegalia, câncer metastático, dermatomiosite, infecções crônicas, desnutrição,

reações de hipersensibilidade, uso de morfina, codeína, succinilcolina e anovulatórios, entre outros. A acetilcolinesterase plasmática se regenera de forma mais rápida do que a eritrocitária, não necessitando mais do que 3 semanas para retornar à atividade normal. Durante as fases iniciais da gestação pode ocorrer redução da atividade da acetilcolinesterase plasmática (17 a 46%), a qual normaliza no terceiro trimestre (Ellenhorn e Barceloux, 1997).

Devido à ampla variação interindividual na atividade da acetilcolinesterase plasmática e eritrocitária, é recomendado que os indivíduos tenham, pelo menos, 1 medida antes da exposição aos OPs. Este parâmetro poderá fornecer um perfil para comparação em estimativas subseqüentes. Quando da inibição, os sintomas agudos usualmente se desenvolvem após 30% de decréscimo da atividade da linha de base. Entretanto, não parece existir uma relação entre o grau de inibição e surgimento de manifestações clínicas. No Brasil, a Norma Regulamentadora - NR 7 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabelece que o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP), para a colinesterase plasmática e eritrocitária, consiste na depressão de até 25% em relação à atividade inicial da enzima, sendo o intervalo normal de 3,2 a 9kU/L, conforme técnica colorimétrica de Ellman et al (1961).

No tratamento da SCA devem ser adotadas medidas de descontaminação (cutânea, gástrica ou ocular) e estabilização do paciente (com cuidados voltados principalmente ao aparelho respiratório e sistema cardiovascular). O sulfato de atropina atua como antagonista dos efeitos muscarínicos da acetilcolina responsáveis, na maioria dos casos, pela gravidade da intoxicação. As oximas (pralidoximas) exercem um ataque

nucleofílico sobre o fósforo; o oxima-fosfonato é então clivado, deixando a enzima regenerada (Taylor, 2001).

A Síndrome Intermediária, Neuropatia Tardia e demais manifestações neuropsiquiátricas não apresentam melhora com uso de atropina, sendo recomendada abordagem específica para cada quadro.

## **1.2 Glifosato**

O glifosato (n-fosfometil-glicina) é um herbicida organofosforado, derivado da glicina, aplicado na agricultura para erradicação de ervas daninhas em culturas do tabaco, café, soja e pastagens, entre outras. O potencial neurotóxico do glifosato, decorrente de exposições crônicas, ainda não é amparado por evidências experimentais. A toxicidade reconhecida em humanos se deve a acidentes que ocorreram após a ingestão intencional do produto (Ellenhorn e Barceloux, 1997). O glifosato frequentemente vem associado ao composto polioxietilenoamina (POEA) que atua sinergicamente devido ao seu efeito surfactante.

### *a) Toxicocinética*

Existem poucos dados disponíveis a respeito da toxicocinética do glifosato. A absorção através do trato digestivo é parcial. Estudos em ratos, dirigidos à medida da avaliação da absorção gastrointestinal do herbicida, evidenciaram uma passagem de 20 a 36% do produto. A absorção cutânea é baixa. O ácido fosfônico é o metabólito mais importante formado no organismo e surge no plasma em torno de 3 horas após a

ingestão do herbicida. O glifosato e seus metabólitos são eliminados do organismo através dos rins (Williams et al, 2000).

*b) Toxicodinâmica e manifestações clínicas*

Alguns dados *in vitro* indicam que o glifosato interfere na fosforilação oxidativa mitocondrial. Relatos evidenciam igualmente o efeito cardiotoxico direto. Em casos de ingestão, ocorrem inicialmente efeitos sobre o trato digestivo (**Tabela 2**). Indivíduos que sobreviveram à tentativa de suicídio com glifosato ingeriram doses que não ultrapassaram 120 ml do produto. Estudo conduzido por Barbosa e Leite (2001) aponta para a possibilidade de que efeitos extrapiramidais apresentados por um paciente, após exposição ocupacional, possam ter relação com o uso do herbicida.

**Tabela 2** - Classificação da gravidade da intoxicação aguda após ingestão de Glifosato.

Classificação	Manifestações clínicas
assintomático	ausência de anormalidades clínicas e laboratoriais
leve	alterações gastrointestinais (GI): náuseas, vômitos e diarreia que desaparecem em 4h. Sinais vitais estáveis
moderada	alterações GI que permanecem por mais de 24 horas, hemorragia GI, esofagite, úlceras GI, hipotensão, alterações pulmonares, alterações ácido-básicas, evidências de dano hepático e renal transitório
grave	disfunção pulmonar requerendo ventilação mecânica, insuficiência renal com necessidade de hemodiálise, hipotensão severa, insuficiência cardíaca, coma, convulsões, óbito

adaptado de Ellenhorn e Barceloux, 1997

c) *Diagnóstico e tratamento da intoxicação*

A história da exposição consiste em dado fundamental para estabelecer o diagnóstico da intoxicação aguda. Glifosato e ácido fosfônico podem ser quantificados na urina por cromatografia gasosa e HPLC (Ellenhorn e Barceloux, 1997). Na Legislação Brasileira não existem recomendações para monitorização biológica de exposição ao Glifosato. O tratamento da intoxicação aguda consiste em descontaminação e estabilização do paciente, não existindo antídoto específico.

Com base no exposto e com ênfase na neurotoxicidade dos compostos Acefato, Clorpirifós e Glifosato, a **Tabela 3** traz um resumo de referências obtidas da literatura a respeito do comportamento destes produtos quanto à instalação das diferentes síndromes clínicas e de efeitos neurocomportamentais.

**Tabela 3** - Publicações a respeito do papel dos pesticidas organofosforados Acefato, Clorpirifós e Glifosato na instalação de efeitos neurocomportamentais.

Clínica	Referência	Compostos	Estudo	Forma/via de exposição
SCA				
	Ray e Richards (2000)	clorpirifós	epidemiológico	Ocup
	Guadarrama e Naveda (2001)	clorpirifós	relato de caso	VO
	Spasova et al (2000)	acefato	experimental	SC
SI				
	Guadarrama-Naveda (2001)	clorpirifós	relato de caso	VO
NPT				
	Aiuto et al (1993)	clorpirifós	relato de caso	VO
	Steenland et al (1994)	clorpirifós	relato de caso (2)	Ocup
	Richardson (1995)	clorpirifós	relato de caso (2)	VO
	Stokes et al (1995)	clorpirifós	epidemiológico	Ocup
	Moretto e Lotti (1998)	clorpirifós	relato de caso	VO
	Kaplan et al (1993)	clorpirifós	relato de caso (8)	Ocup
Parkinsonismo				
	Joubert (1988)	clorpirifós	relato de caso	VO
	Shahar e Andraws (2001)	clorpirifós	relato de caso	VO
	Barbosa e Leite (2001)	glifosato	relato de caso	Dérmica
Alterações neuropsiquiátricas (ansiedade/depressão)				
	Bushnell et al (1993)	clorpirifós	experimental	SC
	Sánchez-Amate et al (2001)	clorpirifós	experimental	SC
	Stallones e Beseler (2002)	clorpirifós	relato de caso (69)	Ocup

SCA: síndrome colinérgica aguda; SI: síndrome intermediária; NPT: neuropatia tardia; VO: via oral; Ocup: ocupacional, que pode ser respiratória e/ou dérmica; SC: sub-cutânea; experimental: estudo em ratos; (n): número de casos relatados

O diagnóstico da intoxicação aguda por pesticidas, caracterizada por exposições a doses elevadas em período inferior a 24 horas, é amparado por manifestações clínicas sindrômicas e/ou provas laboratoriais específicas, as quais favorecem o estabelecimento

de nexos causais definidos. Entretanto, em exposições crônicas a níveis baixos de pesticidas, o diagnóstico da intoxicação sofre limitações. Os processos adaptativos orgânicos que surgem nestas populações podem interferir nos parâmetros clínicos e laboratoriais empregados para monitorização biológica. Estudo em frangos, submetidos à dose diária de clorpirifós, evidenciou que estes animais desenvolveram tolerância quanto à instalação de quadro colinérgico após 2 semanas de tratamento com o pesticida (Richardson, 1995). Este efeito tem sido atribuído a mecanismos de *down-regulation* de receptores muscarínicos e nicotínicos. Um fator adicional que explica a tolerância consiste na degeneração da placa motora decorrente de despolarização prolongada subsequente ao acúmulo de acetilcolina na sinapse (Prendergast et al, 1998; Ray e Richards, 2001).

O diagnóstico da intoxicação fundamentado na medida da atividade da acetilcolinesterase é válido para condições em presença de SCA. Este fato foi claramente relatado por Nava et al (1999), onde havia atividade enzimática normal em pacientes que apresentavam alterações psicomotoras, redução da atividade mental, da capacidade de concentração e de memória e uma maior incidência de alterações psiquiátricas. Esta observação evidencia para a presença de outros mecanismos tóxicos, não relacionados à inibição enzimática.

Na exposição crônica, os fenômenos adaptativos que ocorrem na sinapse podem ser responsáveis pela redução, ou mesmo pela ausência de manifestações clínicas colinérgicas, em indivíduos sabidamente expostos a pesticidas inibidores da colinesterase. Estes mecanismos colocam em discussão o valor da presença ou não de síndrome colinérgica e da medida da atividade da acetilcolinesterase, como parâmetros únicos para monitorização de populações submetidas a exposições prolongadas. A



tolerância conduz a uma evolução silenciosa de lesão cerebral que somente poderá ser detectada quando as manifestações neurológicas irreversíveis estiverem presentes (Ray e Richards, 2001).

## **2. Marcadores periféricos de lesão cerebral**

### **2.1 Proteína S100B**

Moore (1965), há mais de três décadas, isolou uma classe de proteínas de 21 kDa, denominada de S100 em virtude de sua solubilidade em solução saturada de sulfato de amônio a 100%. A S100 corresponde a uma família de proteínas diméricas, ligadoras de cálcio, com 2 sub-unidades definidas como  $\alpha$  e  $\beta$ . Até o momento foram identificadas 3 isoformas da proteína S100: i) S100a ( $\alpha\beta$ ) presente nas células gliais e melanócitos, ii) S100b ( $\beta\beta$ ) encontrada em altas concentrações nas células gliais, células de Schwann dos Sistemas Nervoso Central e Periférico, bem como nas células de Langerhans e da hipófise anterior e iii) S100a0 ( $\alpha\alpha$ ) que corresponde a menor parcela da S100 cerebral (5%), presente fora do Sistema Nervoso, como coração, rim e músculos esqueléticos (Jordan et al, 2002). Consideram-se proteínas S100B aquelas formadas por, pelo menos, um monômero  $\beta$ , como  $\alpha\beta$  ou  $\beta\beta$  (Basile et al, 2001).

Alguns autores, como Nygaard et al (1997), aventaram para a possibilidade de que parâmetros como idade e sexo pudessem interferir nas concentrações líquóricas da proteína S100B. Estudos subseqüentes realizados por Wiesmann (1998), em 200 indivíduos hígidos, dos sexos masculino e feminino, agrupados em diferentes faixas etárias (18 a 65 anos), demonstraram que a concentração de S100B no plasma independe de fatores como idade e sexo. Entretanto, Portela et al (2002b), em estudo

comparativo entre 85 adultos, 25 pacientes na faixa etária de 4 a 16 anos e 19 recém-nascidos observaram que estes últimos apresentavam níveis plasmáticos mais elevados da proteína S100B. Indivíduos pertencentes à faixa entre 4 a 16 anos evidenciaram níveis mais elevados quando comparados a adultos. Segundo os autores, o aumento da S100B pode refletir o andamento dos processos de desenvolvimento neurológico, presentes nas faixas etárias mais precoces.

As ações fisiológicas da proteína S100B não estão relacionadas à atividade enzimática, mas resultam da interação proteína - proteína, com diferentes moléculas intracelulares ou de membrana. A modulação exercida pela proteína S100B pode ser inibitória ou excitatória (Zimmer et al, 1995). As repercussões biológicas das ações da proteína S100B, resumidamente, são descritas como interações com proteínas do citoesqueleto, proteínas da membrana citoplasmática, proteína p53, ação sobre o metabolismo energético e efeito neurotrófico (Kligman e Marshal, 1985; Donato, 1991; Zimmer et al, 1995; Tagliaferro et al, 1997; Ziegler et al, 1998; Beaudeau et al, 1999). A proteína S100B tem sido relacionada à modulação do aprendizado e memória. A administração do anti-soro antiproteína S100B no cérebro de ratos promoveu prejuízo na memória (Zimmer et al, 1995). À S100B tem sido atribuídas ações tróficas em neurônios e astrócitos, com reflexos no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso.

O aumento dos níveis plasmáticos da proteína S100B pode significar gliose reativa e alterações na barreira hematoencefálica (Lara et al, 2001). Portadores de diferentes doenças neurológicas degenerativas crônicas e neuropsiquiátricas apresentaram níveis elevados da proteína S100B, tanto no soro como no fluido

cerebroespinal (Ingebrigtsen e Rommer, 1996; Wiesmann,1998). Conforme Beaudeau et al (1999), foi observada expressão gênica elevada, com subsequente aumento da liberação da proteína pelas células do tecido cerebral em portadores de Trissomia do 21, Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, melanoma maligno e Lupus eritematoso sistêmico (Portela et al, 2002a). Nas doenças de Creutzfeldt-Jacob e esclerose em placa, bem como em casos de traumatismo craniano, hemorragia meningéia, isquemia cerebral e complicações neurológicas pós-operatórias, foi constatado aumento da liberação da proteína S100B para o espaço extracelular, com medidas realizadas no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR). A elevação dos níveis da proteína S100B foi vista igualmente em portadores de meningoencefalite viral e traumatismo craniano. Dados obtidos em humanos demonstraram aumento nos níveis da proteína S100B no LCR em torno de 7 a 8 horas após indução de contusão cortical (Beaudeau et al, 1999; Walz et al, 2000).

O perfil da proteína S100B tem sido igualmente avaliado em portadores de doenças neuropsiquiátricas. Em estudo conduzido por Lara et al (2001), foi observado aumento nos níveis séricos da proteína S100B em portadores de esquizofrenia, não submetidos a medicamentos.

Diversos trabalhos demonstraram a importância da medida periférica dos níveis da S100B como marcador de atividade cerebral, refletindo dano de astrócitos, estando os mais recentes listados na **Tabela 4**.

**Tabela 4 - Referências da literatura sobre variações dos níveis da proteína S100B**

Referências	Amostra	n	Implicações clínicas	Resultado
Portela et al (2000)	LA	09	síndrome de Down	↑
Walz et al (2000)	soro	11	HAM/TSP *	↑
Lara et al (2001)	soro	20	esquizofrenia	↑
Basile et al (2001)	soro	16	<i>bypass</i> arteri coronariano	↑
Pleines et al (2001)	soro/LCR	13	traumatismo craniano	↑
de Kruijk et al (2001)	soro	104	traumatismo craniano	↑
Hermann et al (2001)	soro	69	traumatismo craniano	↑
Suttner et al (2001)	soro	42	hipotensão induzida	↑
Rasmussen et al (2002)	soro	15	<i>bypass</i> arteri coronariano	↑
Portela et al (2002a)	soro	32	lupus eritematoso sistêmico	↑
Machado-Vieira et al (2002)	soro	20	transtorno bipolar	↑

LA: líquido amniótico; LCR: líquido cefalorraquidiano; S.: síndrome; HAM/TSP: Human T-cell lymphotropic virus-I (HTLV-I) associated myelopathy /tropical spastic paraparesis

O interesse despertado na clínica consiste no fato de que a proteína S100B é liberada para o meio extracelular no curso de algumas patologias envolvendo astrócitos, expressando um estado de atividade do tecido cerebral. Este fenômeno possibilita a utilização da proteína S100B como marcador biológico periférico em procedimentos ou doenças que comprometem o Sistema Nervoso Central.

## 2.2 Enolase Específica de Neurônios (NSE)

A estimativa de comprometimento cerebral por substâncias ou procedimentos que, potencialmente, possam causar neurotoxicidade, consiste em processo de grande importância clínica. Neste sentido, diversos autores voltam-se ao estudo de enolases em condições de dano cerebral. A enolase é uma enzima glicolítica que existe nas formas  $\alpha$ ,

$\beta$  e  $\gamma$ . A isoforma  $\gamma$  é denominada de enolase específica dos neurônios (NSE) por estar presente principalmente no citoplasma destas células. Em diversos estudos, foi observado que a enolase é liberada para o plasma e LCR após eventos que determinam dano neuronal, como traumatismo cerebral, encefalopatia isquêmica, choque e anóxia sistêmica. Verdú et al (2001) demonstraram que a NSE encontra-se aumentada em recém-nascidos que apresentaram dano cerebral devido à asfixia grave, hemorragia e infecção intracraniana. A NSE pode ser medida no LCR e sangue, entretanto, por ser encontrada em eritrócitos e trombócitos em quantidade considerável, a hemólise decorrente de punção venosa para retirada de sangue poderá interferir no resultado da quantificação enzimática (Basile et al, 2001; Jordan et al, 2001; Tanabe et al, 2001). Diversos estudos têm quantificado a NSE em condições clínicas relacionadas a doenças do SNC e na vigência de procedimentos diagnósticos que podem refletir em comprometimento do SNC (**Tabela 5**).

**Tabela 5** - Referências da literatura sobre variações dos níveis da enolase específica de neurôniosNSE

Referências	amostra	n	implicações clínicas	resultado
Basile et al (2001)	soro	16	<i>bypass</i> arteriocoronariano	↑
Pleines et al (2001)	soro/LCR	13	traumatismo craniano	↑
de Kruijk et al (2001)	soro	104	traumatismo craniano	↑
Verdú et al (2001)	soro	06	asfixia perinatal	↑
Hermann et al (2001)	soro	69	traumatismo craniano	↑
Tanabe et al (2001)	soro/LCR	53	convulsão febril	↑
Rasmussen et al (2002)	soro	15	<i>bypass</i> arterocoronariano	↑

LCR: líquido cefalorraquidiano

A determinação da NSE como marcador de dano cerebral tem sido avaliada em diversas doenças neurológicas e, de forma geral, tem demonstrado boa correlação entre níveis plasmáticos ou liquóricos com a intensidade do dano presente (Verdú et al, 2001).

### **3. Objetivos**

Diante do potencial efeito neurotóxico dos pesticidas, da limitação no uso exclusivo da medida da acetilcolinesterase para monitorização de indivíduos expostos, bem como da tolerância que ocorre em exposições crônicas a baixas doses, os objetivos deste estudo consistem em:

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar alterações neurocomportamentais e parâmetros bioquímicos (atividade da acetilcolinesterase, medida da proteína S100B e da NSE no plasma) em populações que praticam a agricultura familiar na região central do Estado do Rio Grande do Sul, caracterizadas por exposição prolongada a níveis baixos de pesticidas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Traçar um perfil demográfico e clínico da população cronicamente exposta aos pesticidas organofosforados;
- Avaliar parâmetros neurocomportamentais na amostra;
- Investigar a atividade da acetilcolinesterase plasmática;
- Investigar os níveis séricos da proteína S100B;
- Investigar os níveis séricos da proteína NSE;

**ASPECTOS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS  
DOS AGRICULTORES SUBMETIDOS À  
EXPOSIÇÃO CRÔNICA A PESTICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS**

# **CAPÍTULO I**

## **NEUROPSYCHIATRIC EVALUATION IN SUBJECTS CHRONICALLY EXPOSED TO ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES**



## Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides

Rosane Maria Salvi,\* Diogo R. Lara,\* Eduardo S. Ghisolfi,\*<sup>1</sup> Luis V. Portela,\* Renato D. Dias,\* and Diogo O. Souza†<sup>2</sup>

\*Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; and † Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035–003 Porto Alegre, RS, Brazil

Received November 12, 2002; accepted January 6, 2003

Long-term exposure to low levels of organophosphate pesticides (OP) may produce neuropsychiatric symptoms. We performed clinical, neuropsychiatric, and laboratory evaluations of 37 workers involved in family agriculture of tobacco from southern Brazil who had been exposed to OP for 3 months, and in 25 of these workers, after 3 months without exposure to OP. Plasma acetylcholinesterase activity levels of all subjects were within the normal range (3.2 to 9.0 U/l) and were not different between on- and off-exposure periods ( $4.7 \pm 0.9$  and  $4.5 \pm 1.1$  U/l, respectively). Clinically significant extrapyramidal symptoms were present in 12 of 25 subjects, which is unexpected in such a population. There was a significant reduction of extrapyramidal symptoms after 3 months without exposure to OP, but 10 subjects still had significant parkinsonism. Mini-mental and word span scores were within the expected range for this population and were not influenced by exposure to OP. Eighteen of the 37 subjects (48%) had current psychiatric diagnoses in the first interview (13 with generalized anxiety disorder and 8 with major depression). Among the 25 subjects who completed both evaluations, the total number of current psychiatric diagnoses, after 3 months without using OP, dropped from 24 to 13 and the number of affected individuals with any psychiatric diagnosis dropped from 11 to 7. In conclusion, this study reinforces the need for parameters other than acetylcholinesterase activity to monitor for chronic consequences of chronic low-dose OP exposure, and it suggests that subjects have not only transient motor and psychiatric consequences while exposed, but may also develop enduring extrapyramidal symptoms.

**Key Words:** organophosphate pesticides; parkinsonism; occupational exposure; acetylcholinesterase; psychiatry.

Long-term exposure to relatively low levels of organophosphate pesticides (OP) agents occurs in a variety of environments. Pesticides are often applied in a combination with several classes of compounds featuring synergistic interactions. In southern Brazil, agricultural workers involved in

tobacco plantation use a combination of OP (chlorpyrifos and acephate), herbicides (glyphosate and clomazone), plant growth regulators (flumetralin), fungicides (iprodione), and insecticides (imidacloprid). Exposure to OP is known to induce clinical syndromes and biochemical alterations in humans. Besides acute cholinergic symptoms, which are related to the inhibition of acetylcholinesterase activity, acute or chronic OP exposure can also induce delayed toxic and behavioral effects not clearly related to the inhibition of esterases (Brown and Brix, 1998; Jamal, 1997; Mileson *et al.*, 1998; Peter and Cherian, 2000; Sudakin *et al.*, 2000). Most of the actions of OP on the nervous system seem to be related to organophosphorylation of protein targets, as acetylcholinesterase and neuropathy target esterase, or directly to binding of OP to nicotinic receptors (Mileson *et al.*, 1998).

The clinical syndromes regarding organophosphorus toxicity are:

- Acute cholinergic syndrome, due to the inhibition of acetylcholinesterase activity, which occurs within minutes or hours following exposure, usually subside within days or weeks, and plasma or erythrocytic acetylcholinesterase activity are used for monitoring acute exposure to OP (Lessenger and Reese, 1999);
- Intermediate syndrome, which usually starts 24 to 96 hours after the acute syndrome and is characterized by respiratory paresis, weakness, depressed tendon reflexes, and transient extrapyramidal symptoms, without response to treatment with the cholinergic receptor antagonist atropine (Bhatt *et al.*, 1999; Guadarrama-Naveda *et al.*, 2001; Mileson *et al.*, 1998; Müller-Vahl *et al.*, 1999; Senanayake and Johnson, 1982; Shahar and Andraws, 2001);
- Organophosphate-induced delayed neuropathy, which is a symmetric distal neuropathy, usually occurring weeks following an acute exposure probably related to the inhibition of the enzyme neuropathy-target esterase present in the nervous system (Aiuto *et al.*, 1993; Moretto and Lotti, 1998; Ray and Richards, 2001).

Chronic organophosphate-induced neuropsychiatric disorders (COPIND) are a less well-characterized syndrome in

<sup>1</sup> Present address: Departamento de Ciências de Saúde da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI), Frederico Westphalen, RS, Brazil.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Fax: (55 51) 3316–5540. E-mail: diogo@ufrgs.br.

chronic OP poisoning. COPIND may be caused by chronic low-level exposure to OP, without cholinergic symptoms (Ray and Richards, 2001). The underlying mechanisms are not established, but are not dependent on inhibition of esterases (Levin *et al.*, 1976; Prendergast *et al.*, 1998). The most common clinical symptoms include impairment in memory, concentration, and learning; anxiety, depression, psychotic symptoms, chronic fatigue, peripheral neuropathy, autonomic dysfunction and extrapyramidal symptoms such as dystonia, resting tremor, bradykinesia, postural instability and rigidity of face muscles; and nonresponsiveness to levodopa treatment. Regarding psychiatric symptoms, Amr *et al.* (1997) found that, compared to controls, subjects heavily exposed to pesticides (40 h/week, 9 months/year) had a significant increase in the frequency of psychiatric disorders, especially depressive neurosis and dysthymic disorder (DSM-III-R). These results left unresolved the issue of reversibility of psychiatric symptoms after a pesticide-free period and the occurrence of the syndrome in subjects not so heavily exposed to OP compounds. Another confounding factor in these studies has been the exposure to several types of pesticides, including pyridine compounds, which have been shown to reproduce features of Parkinson's disease (Betarbet *et al.*, 2000).

Among OP commonly used in our population, chlorpyrifos has been reported to induce these syndromes, including anxiety, depression, and transient parkinsonism (Aiuto *et al.*, 1993; Guadarrama-Naveda *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 1993; Moretto and Lotti, 1998; Richardson, 1995; Steenland *et al.*, 1994; Stokes *et al.*, 1995). Other pesticides currently used (glyphosate, clomazone, flumetralin, iprodione, and imidacloprid) have not been related to neurotoxicity. The present study was undertaken at two different moments (under current use of OP for 3 months, and after 3 months without OP exposure) to evaluate clinical, psychiatric, and extrapyramidal symptoms, as well as plasma acetylcholinesterase activity, in a sample of workers chronically exposed to these OP.

## MATERIALS AND METHODS

This observational study was approved by the Ethics Committee of Hospital São Lucas from Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

The first clinical and laboratory evaluation was conducted in a sample of 37 workers from southern Brazil involved in family agriculture of tobacco in December 2001, when they had been working with OP for 3 months. At the time of evaluation, all subjects had been exposed to OP within the last day. The second evaluation was conducted in 25 workers from the initial sample who returned in March 2002, when they had been off exposure for 3 months.

**Clinical evaluation.** Demographic features, alcohol and tobacco use, OP exposure (time and type of exposure, use of protective equipment, and history of acute toxicity) were evaluated using a structured questionnaire by RMS. Two trained psychiatrists (D.R.L. and E.S.G.) assessed the presence of:

- Psychiatric symptoms using the Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) (Sheehan *et al.*, 1998), which is a structured interview that allows rapid diagnosis of the main psychiatric disorders;
- Parkinsonism using the Extrapyramidal Symptom Rating Scale (ESRS)

TABLE 1  
Characteristics of Subjects Evaluated

Characteristics	Values
Sex (%)	
Females	13 (52)
Males	12 (48)
Age, years	37.0 ± 13.5
Smokers	8 (32)
Exposure (years)	17.8 ± 11.8
Working hours per day	5.4 ± 0.9
Activities with OP	
Preparation	21 (84)
Utilization	22 (88)
Transport	21 (84)
Collecting	25 (100)
Use of protection	
Gloves	4 (16)
Mask	1 (4)
Clothes	3 (12)
Boots	1 (4)
History of acute intoxication	
>1 year	13 (52)
<1 year	0 (0)

Note. Data presented as number (percentage) or mean ± SD (*n* = 25).

(Chouinard *et al.*, 1980), which includes a questionnaire for complaints and a physical examination concerning parkinsonian symptoms;

- Cognitive ability using the mini-mental and word span tests, which address major cognitive function such as orientation, immediate and short-term memory, and naming and sequencing (Folstein *et al.*, 1975).

**Cholinesterase monitoring.** Acetylcholinesterase activity was measured in a blood sample (10 ml) collected in tubes containing EDTA. The activity was determined in plasma by using a colorimetric technique previously described by Ellman *et al.* (1961) and Kolf-Clauw *et al.* (2000).

**Statistical analysis.** Comparisons between the two evaluations were performed with ANOVA for symmetric variables and the Wilcoxon test for asymmetric variables such as the scales scores. Statistical significance was defined as *p* < 0.05.

## RESULTS

The demographic characteristics and exposure history of subjects are listed in Table 1. Importantly, although all subjects had a clear exposure to OP, only a minority used individual protection, which was considered unimportant, expensive, or uncomfortable to use for many hours. The OPs chlorpyrifos and acephate were the predominant pesticides used by this group of workers for the past 4 years.

The most common symptoms found in the clinical examination and interview were fatigue (12), headache (5), hypertension (3), and dermatitis (3). Thirteen workers (52%) had a lifetime history of at least mild cholinergic syndrome, with diarrhea, abdominal pain, and sialorrhea, but only one had to be hospitalized and treated pharmacologically. However, none had a history of acute manifestations of cholinergic syndrome within the previous year.

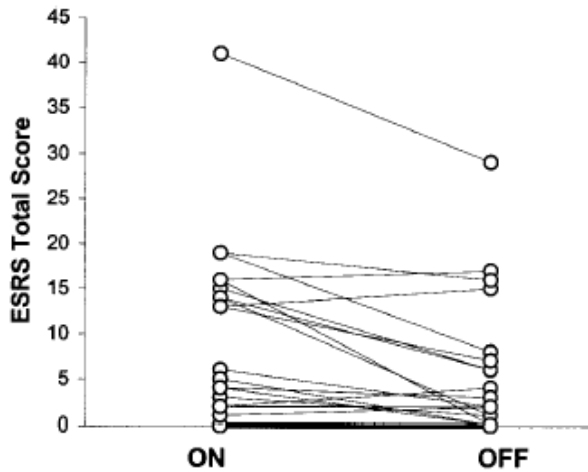


FIG. 1. Scattergram of extrapyramidal symptom rating scale (ESRS) total score in 25 subjects during (ON) and after (OFF) exposure to OP. Seven subjects had a total score of 0 both on and off exposure to OP.

Plasma acetylcholinesterase activity levels of all subjects were within the normal range according to Brazilian policies (3.2 to 9.0 U/l) and were not different between on- and off-exposure periods ( $4.7 \pm 0.9$  and  $4.5 \pm 1.1$  U/l, respectively), although the time off exposure had been sufficient (more than 60 days) to normalize the enzyme activity if it had been inhibited (Cocker *et al.*, 2002).

Clinically significant extrapyramidal symptoms were present in 12 subjects (Fig. 1), as evidenced by a total score of parkinsonism of 5 or more in the ESRS, which can be considered above the normal range, especially in a population of this age. As can be seen in Table 2 and Figure 1, although there was a considerable and statistically significant reduction of extrapyramidal symptoms after 3 months without exposure to OP, 9 subjects still had clinically significant symptoms as evidenced by a total score of 5 or more in the ESRS. Unlike what is observed with antipsychotic treatment, which also induces parkinsonism, significant akathisia was not observed and did not change after washout of OP. Tremor was the predominant

TABLE 3  
Prevalence of AXIS-I Psychiatric Diagnosis (DSM-IV) among 7 Individuals during Chronic Exposure to OP

Diagnosis	Cases (n)
Generalized anxiety disorder	13
Panic disorder	
Current	1
Previous	5
Agoraphobia	5
Social anxiety	4
Obsessive compulsive disorder	1
Post traumatic stress disorder	1
Major depressive episode, current	8
Suicide risk	
Low	2
High	2
Manic episode, previous	3
Hypomanic episode	
Current	1
Previous	1
Psychotic episode	
Current	1
Previous	1
Alcohol abuse	1
Dysthymia; alcohol dependence; illicit drug abuse or dependence; eating disorders	0

symptom in 6 and absent in 3 of these 12 subjects with clinically significant parkinsonism. Facial mask and reduced pendular arm movement were commonly observed. Improvement in the second evaluation was quite uniform for all symptoms. Mini-mental and word span scores were within the expected range for this population and were not influenced by exposure to OP (Table 2).

The number of current AXIS I psychiatric diagnoses (36 for 37 subjects) during exposure to OP was higher than expected, particularly anxiety disorders and depression (Table 3). Eighteen of the 37 subjects (48%) had a current psychiatric diagnosis in the first interview, 13 (35%) with a current diagnosis of generalized anxiety disorder and 8 (21%) with a current

TABLE 2  
Score in Mini-Mental, Word Span, and ESRS Scale

Parameter	ON exposure		OFF exposure (n = 25)	Statistical analysis (p)
	(n = 37)	(n = 25)		
Mini-mental	$24.86 \pm 3.77$	$24.56 \pm 3.71$	$25.16 \pm 2.97$	0.33
Word span	$5.62 \pm 1.32$	$5.92 \pm 2.18$	$5.44 \pm 1.12$	0.37
Parkinson questionnaire	$5.46 \pm 4.25$	$5.64 \pm 4.40$	$3.04 \pm 3.74$	<0.001
Parkinson exam	$5.14 \pm 5.64$	$4.72 \pm 5.72$	$3.04 \pm 4.17$	0.056
Parkinson total	$10.59 \pm 8.70$	$10.36 \pm 9.01$	$6.08 \pm 7.11$	<0.001
Parkinson ICG	$1.35 \pm 1.53$	$1.24 \pm 1.51$	$0.84 \pm 1.18$	0.085
Akathisia	$0.35 \pm 1.06$	$0.40 \pm 1.26$	$0.32 \pm 0.75$	0.666

Note. Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis refers only to the 25 subjects evaluated twice. ON, during exposure; OFF, after exposure.

episode of major depression. Among the 25 subjects who completed both evaluations, the total number with psychiatric diagnoses, after 3 months without OP exposure, declined from 24 to 13, and the number of affected individuals with any psychiatric diagnosis dropped from 11 to 7, which is close to what is expected for this group according to epidemiological studies in our state (Almeida-Filho *et al.*, 1997).

## DISCUSSION

Family agriculture workers are prone to long-term exposure to relatively low levels of OP agents. These workers are daily exposed, use little protection due to cultural and economic reasons, and underestimate the toxicity of OP. In this context, it is expected that adaptations and tolerance to the effects of OP take place. Acetylcholinesterase activity was not a valid parameter for monitoring health consequences of chronic OP exposure, since there was a relatively high rate of extrapyramidal and psychiatric symptoms, which considerably declined after OP washout for 3 months despite unchanged plasma acetylcholinesterase activity. Our results are in accordance with those of Nava *et al.* (1999), who found normal acetylcholinesterase activity in patients exposed to OP who also presented psychomotor alterations, cognitive slowing, memory and attention deficits, and other psychiatric symptoms. Indeed, long-term exposure to relatively low levels of OP may result in the development of tolerance to many clinical effects seen after acute exposures, possibly due to downregulation or functional adaptation of central muscarinic and nicotinic receptors, a compensatory response to elevated acetylcholine levels (Prendergast *et al.*, 1998). However, these alterations are expected to be associated with inhibited acetylcholinesterase activity, which was not found in our study.

Descriptions of enduring parkinsonism following chronic OP occupational exposure are scarce. Despite the reduction in extrapyramidal symptoms seen in the second examination, parkinsonism remained clearly higher than expected for a healthy population of this age, which included mostly subjects under the age of 60, when primary Parkinson's disease is rare. The pathophysiological mechanisms for this condition are unclear, but Bhatt *et al.* (1999) suggested that the absent response to levodopa might indicate striatal dopamine receptor dysfunction. Our results indicate that whatever the mechanism involved, alterations are likely to be permanent. Moreover, although parkinsonism was found in this sample, cognition was not clearly affected and was unchanged after washout of OP, suggesting at least some degree of specificity towards the motor system.

The present results reinforce the previous observations from Stallones and Beseler (2002) of behavioral changes, such as anxiety and depression, as sequelae of OP poisoning in a population exposed to OP agents. Another case-control study (79 subjects) conducted by Jamal *et al.* (2002) found that increasing severity of neuropathy induced by OP was accom-

panied by anxiety and depression as measured with neuropsychological tests. Finally, the study conducted by Sánchez-Amate *et al.* (2001) in rats showed clear behavioral changes as an acute effect of chlorpyrifos poisoning in the absence of any classic sign of cholinergic syndrome.

Certain methodological issues of our study must be considered. First, this series consisted only of chronically exposed workers, so these findings must be recognized as being limited to a special group of subjects. Second, the study investigators were actively looking for psychiatric and neurologic morbidity; therefore, the inclusion of an unexposed group keeping the interviewers blind to history of pesticide exposure could be useful; on the other hand, the use of structured interview and physical examination attenuated this bias and there was no *a priori* hypothesis regarding the persistence of symptoms in the follow-up examination. Third, affected subjects might have enrolled at a higher rate in the study because of their awareness of potential health problems produced by pesticides. Moreover, the lack of a healthy comparison group without OP exposure in this study precludes more definite conclusions, and it also should be taken into account that subjects in our study frequently used two or more compounds, possibly resulting in drug interactions among these compounds, their metabolites, and also with organic solvents often present in commercial formulations. Finally, subjects may have been exposed to a residual level of OP in clothes, equipment, and food, even after occupational use was halted; and other uncontrolled factors present in only one of the examined subjects might have influenced the results.

In conclusion, this study reinforces the need for parameters other than acetylcholinesterase activity to monitor for chronic consequences of low-dose OP exposure and suggests that subjects have not only transient motor and psychiatric consequences while exposed, but may also present enduring extrapyramidal symptoms. We also emphasize that pesticides other than pyridine-like compounds and rotenone, such as those evaluated in this study, may induce significant neurological and psychiatric symptoms, warranting further investigation and prompting further educational and safety measures for exposed subjects.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by CNPq, PRONEX (#41960904) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). We are grateful for the collaboration of Instituto de Toxicologia and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação of PUCRS, and the communities involved.

## REFERENCES

- Aiuto, L. A., Pavlakis, S. G., and Boxer, R. A. (1993). Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion. *J. Pediatr.* 122, 658–660.
- Almeida-Filho, N., Mari J. de J., Coutinho, E., Franca, J. F., Fernandes, J., Andreoli, S. B., and Busnello, E. D. (1997). Brazilian multicentric study of

- psychiatric morbidity. Methodological features and prevalence estimates. *Br. J. Psychiatry* 171, 524–529.
- Amr, M. M., Halim, Z. S., and Moussa, S. S. (1997). Psychiatric disorders among Egyptian pesticide applicators and formulators. *Environ. Res.* 73, 193–199.
- Betarbet, R., Sherer, T. B., Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., and Greenamyre, J. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306.
- Bhatt, M. H., Elias, M. A., and Mankodi, A. K. (1999). Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: Five cases. *Neurology* 52, 1467–1471.
- Brown, M. A., and Brix, K. A. (1998). Review of health consequences from high-, intermediate-, and low-level exposure to organophosphorus nerve agents. *J. Appl. Toxicol.* 18, 393–408.
- Chouinard, G., Ross-Canard, A., Annable, L., and Jones, B. D. (1980). Extra-pyramidal Symptom Rating Scale. *Can. J. Neurol. Sci.* 7, 233.
- Cocker, J., Mason, H. J., Garfitt, S. J., and Jones, K. (2002). Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 134, 97–103.
- Ellman, G., Courtney, D., and Andres, V. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Folstein, M. F., Folstein S. E., and Mchugh P. R. (1975). Mini-Mental-State: A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12, 189–198.
- Guadarrama-Naveda, M., de Cabrera, L. C., and Matos-Bastidas, S. (2001). Intermediate syndrome secondary to ingestion of chlorpyrifos. *Vet. Hum. Toxicol.* 4, 34.
- Jamal, G. A. (1997). Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 16, 133–170.
- Jamal, G. A., Hansen, S., Pilkington, A., Buchanan, D., Gillham, R. A., Abdel-Azis, M., Julu, P. O., Al-Rawas, S. F., Hurley, F., and Ballantyne, J. P. (2002). A clinical neurological, neurophysiological, and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides. *Occup. Environ. Med.* 59, 434–441.
- Kaplan, J. G., Kessler, J., Rosenberg, N., Pack, D., and Schaumburg, H. H. (1993). Sensory neuropathy associated with Dursban (chlorpyrifos) exposure. *Neurology* 43, 2193–2196.
- Kolf-Claauw, M., Jez, S., Ponsart, C., and Delamanche, I. S. (2000). Acetyl- and pseudo-cholinesterase activities of plasma, erythrocytes, and whole blood in male beagle dogs using the Ellman assay. *Vet. Hum. Toxicol.* 42, 216–219.
- Lessenger, J., and Reese, B. E. (1999). Rational use of cholinesterase activity testing in pesticide poisoning. *J. Am. Board. Fam. Pract.* 12, 307–334.
- Levin, H. S., Rodnitsky, R. L., and Mick, D. L. (1976). Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. *Arch. Gen. Psych.* 33, 225–228.
- Mileson, B. E., Chambers, J. E., Chen, W. L., Deltbarn, W., Ehrlich, M., Eldefrawi, A. T., Gaylor, D. W., Harnemik, K., Hodgson, E., Karczmar, A. G., Padilla, S., Pope, C. N., Richardson, R. J., Saunders, D. R., Sheets, L. P., Sultatos, L. G., and Wallace, K. B. (1998). Common mechanism of toxicity: A case study of organophosphorus pesticides. *Toxicol. Sci.* 41, 8–20.
- Moretto, A., and Lotti, M. (1998). Poisoning by organophosphorus and sensory neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 64, 463–468.
- Müller-Vahl, K. R., Kolbe, H., and Dengler, R. (1999). Transient severe parkinsonism after acute organophosphate poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 253–254.
- Nava, M. E., Román, P. P., Robles, S. H., and Alvarado, L. M. (1999). Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Publica Mex.* 41, 55–61.
- Peter, J. V., and Cherian, A. M. (2000). Organic insecticides. *Anaesth. Intensive Care* 28, 11–21.
- Prendergast, M. A., Terry, A. V., Jr., and Buccafusco, J. J. (1998). Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 20, 115–122.
- Ray, D. E., and Richards, P. G. (2001). The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol. Teratol.* 120, 343–351.
- Richardson, R. J. (1995). Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: A critical review of the literature. *J. Toxicol. Environ. Health* 44, 135–165.
- Sánchez-Amate, M. C., Flores, P., and Sánchez-Santed, F. (2001). Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. *Behav. Pharmacol.* 12, 285–292.
- Senanayake, N., and Johnson, M. K. (1982). Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N. Eng. J. Med.* 306, 155–157.
- Shahar, E., and Andraws, J. (2001). Extra-pyramidal parkinsonism complicating organophosphate insecticide poisoning. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 5, 261–264.
- Sheehan, D. V., Lecrubier, Y., Sheehan K. H., Amorim, P., Janavs, J., Weiller, E., Hergueta, T., Baker, R., and Dunbar, G. C. (1998). The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* 59(Suppl. 20), 22–33.
- Stallones, L., and Beseler, C. (2002). Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. *Ann. Epidemiol.* 12, 389–394.
- Steenland, K., Jenkins, B., Ames, R. G., O'Malley, M., Chrislip, D., and Russo J. (1994). Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. *Am. J. Public. Health* 84, 731–736.
- Stokes, L., Stark, A., Marshall, E., and Narang, A. (1995) Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. *Occup. Environ. Med.* 52, 648–653.
- Sudakin, D. L., Mullins, M. E., Horowitz, B. Z., Abshier, V., and Letzig, L. (2000). Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38, 47–50.

# **CAPÍTULO II**

## **SERUM BIOCHEMICAL MARKER S100B IN WORKERS EXPOSED TO ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES**

**(a ser submetido)**

## Serum Biochemical Marker S100B in Workers Exposed to Organophosphate Pesticides

Rosane Salvi<sup>1</sup>, Diogo O Souza<sup>1</sup>, Diogo R Lara<sup>1,2</sup>, Eduardo S Ghisolfi<sup>1,3</sup>, Renato Dutra Dias<sup>1</sup>, Luis V Portela<sup>1,2\*</sup>,

- 1. Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.**
- 2. Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.**
- 3. Departamento de Farmacologia, URCAMP, Frederico Westphalen, Brazil.**

Keywords: S100B, organophosphates pesticides, central nervous system

### **\*Corresponding Author:**

Departamento de Bioquímica  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
90035-003 - Porto Alegre, RS  
Brazil

Fax No.: (55 51) 3316-5540

**E-mail: [roska@ufrgs.br](mailto:roska@ufrgs.br)**

## **Abstract**

Long-term exposure to low levels of organophosphate pesticides (OP) may produce biochemical alterations and neuropsychiatric symptoms, which point to central nervous system (CNS) as a potential target for toxic effects of these compounds. Accordingly, it has been experimentally demonstrated that chlorpyrifos affects neurons and astrocytes leading to disruption of neural integrity. In this work, we evaluated CNS involvement in 24 agricultural workers chronically exposed to OP, using a peripheral biochemical marker S100B protein. The evaluation was performed in two periods: during OP application (on-exposure) and after three months (off-exposure). The S100B protein is predominantly produced and released physiologically by astrocytes and increased levels in cerebrospinal fluid and blood are related to CNS injury. Despite of clear neuropsychiatric manifestations, the acetylcholinesterase activity and S100B levels presented no statistically difference ( $P>0.05$ ) during the time of this study. In conclusion, this study reinforces the need of biochemical parameters able to detect early CNS involvement during chronic low-dose OP exposure.



## **Introduction**

Exposure of population and workers to relative low levels of organophosphate pesticides (OP) agents may cause overt signs and symptoms of intoxication (Freeman et al., 2001; Sultatos, 1994). An issue concerning human intoxication by OP is related to clinical syndromes and biochemical alterations, which are associated with the onset and duration of symptoms, and the inhibition or not of acetylcholinesterase (AChE) activity (Sultatos, 1994; Sudakin et al, 2000; Lessenger and Reese, 1999).

In the Acute Cholinergic Syndrome (ACS), the inhibition of AChE activity occurs within minutes or hours, increasing acetylcholine levels in synapses and neuromotor plaques and leading to overactivation of nicotinic and muscarinic receptors from the central and peripheral nervous systems (CNS and PNC) (Lessenger and Reese, 1999). The Intermediate Syndrome usually starts 24 to 96 hours after the ACS and is characterized by acute respiratory paresis, weakness in the territory of multiple motor cranial nerves, weakness of neck flexor and proximal limb muscles, and depressed tendon reflexes. The mechanisms underlying this syndrome are not well known. (Senanayake and Johnson, 1982; Shahar and Andraws, 2001). Among chronic manifestations, Organophosphate-induced Delayed Neuropathy, caused by inhibition of the neuropathy target esterase, usually occurs weeks following acute exposure and is accompanied by fatigue and ataxia, whereas Chronic Organophosphate Induced Neuropsychiatric Disorders, may occur after acute cholinergic exposure or after repeated low-level subclinical exposure (Ray and Richards, 2001; Prenderghast et al., 1998). In the latter case, clinical symptoms include impairment in memory, concentration and learning, anxiety, depression, psychotic symptoms, chronic fatigue, peripheral neuropathy, autonomic dysfunction and extrapyramidal symptoms (Prenderghast et al., 1998).

In Southern Brazil, agricultural workers involved in tobacco plantation use a combination of OPs (chlorpyrifos, acephate, and glyphosate), herbicide (clomazone), plant growth regulators (flumetralin), fungicides (iprodione), and others insecticides (imidacloprid). Chlorpyrifos, acephate, and glyphosate compounds are potentially neurotoxic and, in a previous work, we demonstrated that neurobehavioral symptoms presented by these workers are closely related to OP chronic intoxication (Salvi et al, 2003). Besides acute cholinergic symptoms, which are related to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity, acute or chronic OP can also induce delayed toxic and behavioral effects probably unrelated to the inhibition of esterases (Prendergast et al, 1998; Sudakin et al., 2000).

In fact, either short or long-term exposure to OP, at doses below those required to inhibit AChE, may result in some degree of CNS involvement, pointing to neural cells as a potential target of OP toxic effects (Chuang et al., 2002). Accordingly, it has been demonstrated in rodents and neural cell cultures that chlorpyrifos affects astrocytes with greater extent than neuronal cells during the neurodevelopmental period (Garcia et al., 2002); however, due to closely functional and structural relation between both cells is possible that, at least in some brain regions, disruption of neural integrity may occur (Garcia et al., 2002, Schuh et al., 2002).

Although human studies point to adverse effects on the CNS, the mechanisms by which neural cells are affected by OP toxicity needs to be better investigated. (Schuh et al., 2002). Furthermore, whether in humans the toxic effects of chronic OP exposure on astrocytes are restricted to the neurodevelopmental period or also persist in the adult life, remains as an interesting question.

Adaptation processes can occur during chronic exposition to OP, difficulting the interpretation of laboratorial data of intoxication in humans, which strengths the search

of new biochemical markers of CNS injury. The peripheral biochemical marker S100B protein is a calcium-binding protein, physiologically produced and released predominantly by astrocytes in CNS, where it exerts neurotrophic and gliotrophic actions that appear to be involved in neurodevelopmental processes (Donato, 2001). It has been shown that the measurement of S100B protein in blood or cerebrospinal fluid is a sensitive tool for evaluate CNS injury in acute and chronic pathologies (Herrmann et al., 2000; Walz et al., 2000; Lara et al., 2001; Portela et al, 2002).

In this study we investigated the effect of chronic OP exposure on CNS, measuring S100B serum levels in a sample of agricultural workers: under current use of OP for 3 months and after 3 months without OP exposure, as well as in controls subjects.

## **Subjects and Methods**

*Subjects and blood sample:* We collected two blood samples (10 ml) without anticoagulants of 24 workers from southern of Brazil involved in family agriculture of tobacco. The first venipuncture (on-exposure period) was made in December 2001, when they had been working with OP for 3 months. At the time of sampling, all subjects had been exposed to OP within the last day. The second sampling (off-exposure period) was made in March 2002 when they had been off exposure for 3 months. The control subjects were matched by age and gender, and was obtained from a non-agricultural population who lives 45 Km far from this agricultural community. Serum was obtained by centrifugation at 3000g for 5 minutes, immediately frozen and stored at -70°C until the analysis.

*S100B assay:* The serum S100B protein was measured in duplicates by a monoclonal immunoluminometric assay (LIA-mat® BYK-Sangtec®100 – Dietzembach – Germany) in a Lumat LB9507 luminometer (EG&G Berthold). The procedure was

performed accordingly previously described (Portela et al., 2002). The S100B standard curve was linear up to 20 ng/L and the coefficient of variation of the duplicates of standards and samples were within 5%.

*Statistical analysis:* The comparison of serum S100B levels in two moments (ON and OFF exposure to OPs) was done by the Wilcoxon T test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . Data are expressed as median (M) and interquartile range (IQ: percentil 25 and percentil 75).

This study was approved by the Ethics Committee of Hospital São Lucas from Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil.

## **Results**

All subjects had a clear exposure to OP, and only a minority used individual protection, which was considered by them unimportant, expensive or uncomfortable to be used for many hours. The OP chlorpyrifos, glyphosate, and acephate were the predominantly used pesticides for the last 4 years by this group of workers. The demographic and characteristics data are presented in Table 1.

Among the 24 subjects there were not differences in the serum S100B levels between ON and OFF exposure to OPs,  $p=0,896$  (see Figure 1), and the control group.

Plasma acetylcholinesterase activity of all groups was within the normal range according to Brazilian policies (3.2 to 9.0 kU/L) (data not shown).

## **Discussion**

There is increased concensus that OP are not innocuous compounds for environmental, occupational workers and non-occupational people. Accordingly, studies with cultured cells and with animals have demonstrated that OP affect cell development and impair cognitive function (Garcia et al., 2002). In humans, the symptoms of acute

intoxication by OP have been associated with the inhibition of the AchE activity, while in chronic intoxication the effects of OP appear to be dependent on different variables.

Long-term exposure to OP in the absence of acute poisoning is increasingly recognized as causing chronic neurological and neurobehavioral effects. Therefore, early detection of CNS alterations on chronically exposure workers, mainly when clinical symptoms are not evident, can be a strategy to avoid the delayed neurotoxic effects of OP. The S100B protein is considered a sensitive peripheral biochemical marker of CNS injuries. Increase in S100B levels in blood and cerebrospinal fluid have been reported to correlated with the presence of morphological and functional alterations on neural tissue, as well as appear to be an early indicator of neurological deficits (Herrmann et al., 2000; Machado-Vieira et al., 2002).

In neurotoxicological studies using different experimental models of neurotoxicity, the S100B protein was sensitive to detected injury to CNS, such as increased loss of glial and neuronal cells (Rosengren et al., 1986; Wang et al., 1993). These studies were carry out in cultured cells or animal brain, while, to our knowledge, the measurement of serum S100B protein of human chronically exposure to OP was still not performed. The hypothesis for this study was evaluated whether serum S100B protein could be a sensitive marker for detect CNS involvement in chronically OP exposure. However, the results did not confirm our postulation.

Previous work demonstrated that in chronic disorders such as schizophrenia and Alzheimer's disease, S100B levels are increased in the early stages of the disease, which seems to be the period where the initiation of neurodegenerative process occurs (Lara et al., 2001; Peskind et al., 2001). The workers here evaluated are longer exposed to OP because they are traditionally involved in tobacco culture. Is possible that the initial degenerative processes that could lead to an increase in the S100B levels have

been overcome at this time. One alternative could be measure serum S100B levels in workers acutely intoxicated, which would allow us evaluated whether central injury is present in early events of acute OP intoxication.

Another interesting point is that long-term exposure to OP can trigger responses, turning cells less sensitive to these neurotoxic agents (Sheets, 2002). In this study, 52% of workers have previous intoxication and 100% have direct contact with OP at least during the last  $17.8 \pm 11.8$  years, and none presented significant alteration in AchE activity, despite clear clinical manifestations on the exposure period (Salvi et al, 2003). Whether or not there are mechanisms of adaptation, which account for the lack of variation in the serum S100B level and AchE activity, even in the presence of clinical symptoms, is an issue that requires further investigations.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by CNPq, PRONEX (#41960904) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). We are grateful for the collaboration of Instituto de Toxicologia and Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação of PUCRS, and the communities involved.

### **References**

1. Chuang C.C., Lin T.S., Tsai M.C., 2002. Delayed neuropathy and myelopathy after organophosphate intoxication. *N. Engl. J. Med.* 347, 1119-21.
2. Donato R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.

3. Freeman, N.C., Jimenez M., Reed K.J., Gurunathan S., Edwards R.D., Roy A., Adgate J.L., Pellizzari E.D., Quackenboss J., Sexton K., Liroy P.J., 2001. Quantitative analysis of children's microactivity patterns: The Minnesota Children's Pesticide Exposure Study. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 11, 501-9.
4. Garcia S.J., Seidler F.J., Qiao D., Slotkin T.A. 2002. Chlorpyrifos targets developing glia: effects on glial fibrillary acidic protein. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 133,151-61.
5. Herrmann M., Jost S., Kutz S., Ebert A.D., Kratz T., Wunderlich M.T., Synowitz H. 2000. Temporal profile of release of neurobiochemical markers of brain damage after traumatic brain injury is associated with intracranial pathology as demonstrated in cranial computerized tomography. *J. Neurotrauma.* 17,113-22.
6. Lara D.R., Gama C.S., Belmonte-de-Abreu P., Portela L.V., Goncalves C.A., Fonseca M., Hauck S., Souza D.O., 2001. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *Psychiatr. Res.* 35, 11-4.
7. Lessenger J., Reese, B.E., 1999. Rational use of cholinesterase activity testing in pesticide poisoning. *J. Am. Board. Fam. Pract.* 12, 307-334.
8. Machado-Vieira R., Lara D.R., Portela L.V., Goncalves C.A., Soares J.C., Kapczinski F., Souza D.O., 2002. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 12, 269-72.
9. Portela L.V., Tort A.B., Schaf D.V., Ribeiro L., Nora D.B., Walz R., Rotta L.N., Silva C.T., Busnello J.V., Kapczinski F., Goncalves C.A., Souza D.O., 2002. The serum S100B concentration is age dependent. *Clin. Chem.* 48, 950-2.

10. Peskind E.R., Griffin W.S., Akama K.T., Raskind M.A., Van Eldik L.J., 2001. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39, 409-13.
11. Prendergast M.A, Terry A.V. Jr., Buccafusco J.J., 1998. Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 20, 115-22.
12. Ray D.E., Richards P.G., 2001. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol. Teratol.* 120, 343-51.
13. Rosengren LE, Kjellstrand P, Aurell A, Haglid K.G., 1986. Irreversible effects of xylene on the brain after long-term exposure: a quantitative study of DNA and the glial cell marker proteins S-100 and GFA. *Neurotoxicology.* 7, 121-35.
14. Salvi R.M., Lara D.R., Ghisolfi E.S., Portela L.V., Dias R.D., Souza DO., 2003. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicol. Scienc.* 72-267-71.
15. Senanayake N., Johnson M.K., 1982. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N. Eng. J. Med.* 306, 155-7.
16. Sudakin D.L., Mullins M.E., Horowitz B.Z., Abshier V., Letzig L., 2000. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38, 47-50.
17. Sultatos L.G., 1994. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J. Toxicol. Environ. Health.* 43, 271-89.
18. Schuh R.A., Lein P.J., Beckles R.A., Jett D.A., 2002. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element binding protein in cultured neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 176-85.



19. Shahar E., Andraws J., 2001. Extra-pyramidal parkinsonism complicating organophosphate insecticide poisoning. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 5, 261-4.
20. Sheets L.P., 2000. A consideration of age-dependent differences in susceptibility to organophosphorus and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicol.* 21, 57-63.
21. Walz R., Portela L.V., Tort AB., Neto E.C., Fernandes L.N., Gonçalves C.A, Souza D.O., 2000. Serum S100B levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Neurology.* 23, 2021-2.
22. Wang S., Karlsson J.E., Kyrklund T., Haglid K., 1993. Perchloroethylene-induced reduction in glial and neuronal cell marker proteins in rat brain. *Pharmacol. Toxicol.* 72, 273-8.

## **Legends**

**Table 1.** Shows the demographic data and characteristics of the agricultural workers involved in tobacco plantation in a small community in south of Brazil.

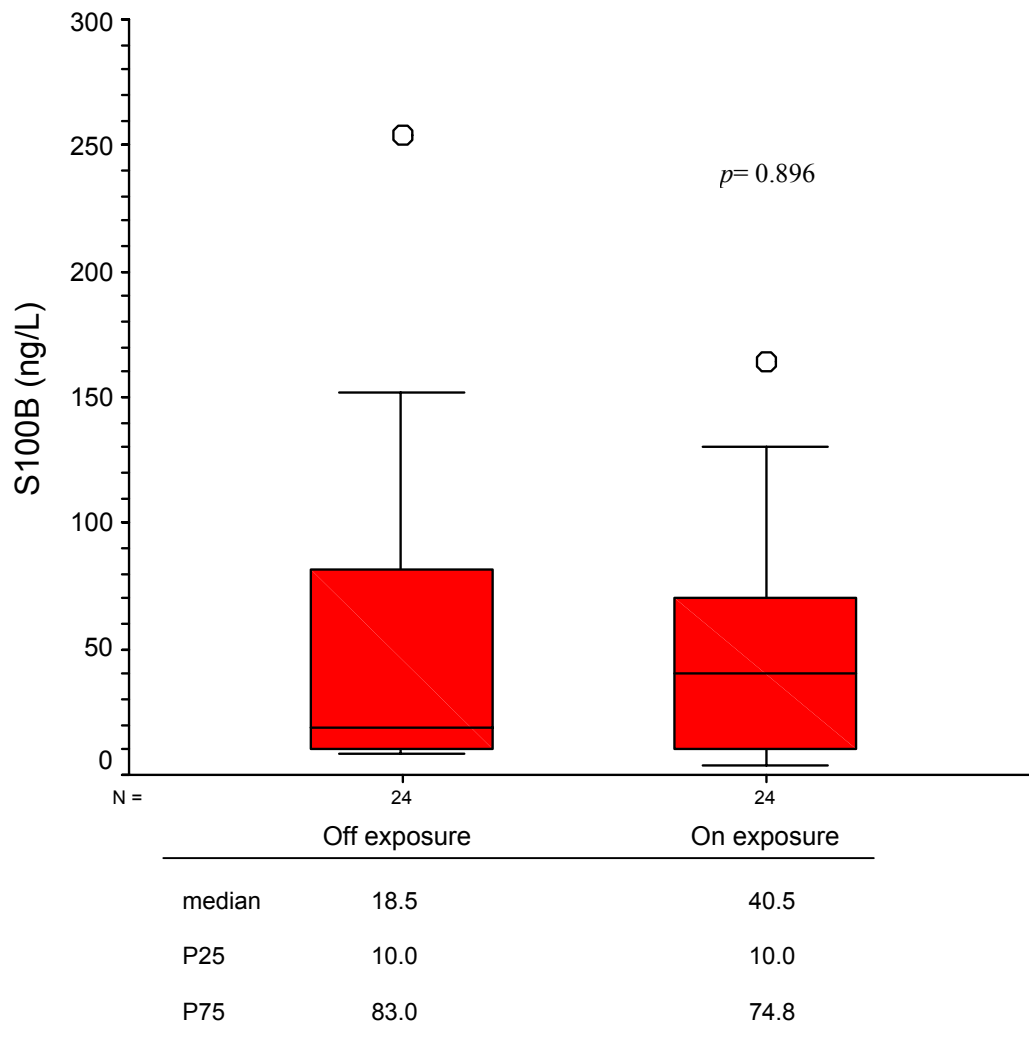
**Figure 1-** S100B plasma levels in two moments: On and Off exposure to organophosphate pesticides

**Table 1.** Workers' characteristics (n=24)

<b>Sex</b> (% females)	13 (52)
<b>Age</b> , years	37.0 ± 13.5
<b>Smokers</b>	8 (32)
<b>Exposure</b> (years)	17.8 ± 11.8
Working hours per day	5.4 ± 0.9
<b>Activities with OP:</b>	
Preparation	21 (84)
Utilization	22 (88)
Transport	21 (84)
Collecting	25 (100)
<b>Use of protection</b>	
Gloves	4 (16)
Mask	1 (4)
Clothes	3 (12)
Boots	1 (4)
<b>History of acute intoxication</b>	
Late (> 1year)	13 (52)
Recent (<1 year)	0 (0)

---

Data presented as number (percentage) or mean (SD).



**Figure 1-** S100B serum levels in two moments: ON and OFF exposure to OPs (Wilcoxon T test)

# **CAPÍTULO III**

## **MEDIDA DA ENOLASE ESPECÍFICA DE NEURÔNIOS (NSE) EM TRABALHADORES EXPOSTOS A PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS**

**(Dados preliminares)**

## **Introdução**

Na prática clínica, o dano ou alteração fisiológica renal, hepática ou cardíaca é amparado por marcadores bioquímicos que fornecem dados para tratamento e evolução do quadro. A complexidade cerebral devido a diferentes tipos de células, influência da barreira hematoencefálica e o conhecimento limitado do processo de morte neuronal, traz dificuldades na interpretação dos níveis de marcadores biológicos no soro ou líquido (Johnsson, 1996). A enolase específica de neurônios é uma enzima glicolítica localizada nos neurônios que, em diversos estudos, demonstrou ser liberada para o líquido e soro após processos que envolvem dano neuronal (Verdú et al, 2001).

A exposição crônica a baixos níveis de pesticidas organofosforados tem evidenciado a instalação de manifestações outras que as decorrentes de inibição de esterases. As alterações neuropsiquiátricas induzidas por pesticidas organofosforados, representadas por sintomas como alterações na memória, concentração e aprendizado, ansiedade, depressão, sintomas psicóticos e manifestações de extrapiramidalismo, como distonia, tremores de repouso, bradicinesia e alterações posturais, ainda têm sua toxicodinâmica a ser esclarecida. Em estudo realizado por Salvi et al (2003) foi observado que 24 agricultores submetidos à exposição crônica a pesticidas organofosforados apresentavam índices elevados de ansiedade, depressão e de efeitos extrapiramidais, sem que houvesse simultaneamente alterações na atividade da acetilcolinesterase plasmática. Salienta-se que a medida da atividade desta enzima consiste no exame indicado pela Norma Regulamentadora (NR7) para monitorização de indivíduos expostos a compostos inibidores da acetilcolinesterase. O objetivo do

presente estudo consiste em avaliar os valores plasmáticos da NSE em agricultores submetidos à exposição crônica a baixas doses de pesticidas organofosforados (Acefato, Clorpirifós e Glifosato).

## **Material e Método**

*Indivíduos e amostra de sangue:* foram coletadas 2 amostras de sangue (10ml) sem anticoagulante, em 24 agricultores no sul do Brasil, envolvidos no plantio de tabaco. A primeira amostra foi obtida no período em que se encontravam expostos ao produto. A segunda amostra foi coletada após 3 meses do término da exposição. O grupo controle foi composto por indivíduos que não praticam a agricultura familiar e que residem a aproximadamente 45 Km da comunidade agrícola. O sangue obtido foi centrifugado à 3000g por 5 minutos e imediatamente armazenado à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ , até a realização da análise.

*Medida da NSE:* Na medida da NSE foi utilizado ensaio eletroquimioluminescência fornecido pelo Roche Diagnostic Corporation®, Indianápolis, USA. Este método consiste em um ensaio sanduíche que usa um anticorpo anti-NSE ligado ao rutênio, que corresponde à molécula luminescente. A reação e a quantificação foram realizadas no Elecsys-2010 (Roche Diagnostic Corporation®). A análise foi feita em duplicata com o coeficiente de variação menor que 5%.

*Análise estatística:* Foi empregada a análise de variância ANOVA para comparação dos resultados obtidos nos 2 momentos: com e sem exposição aos

organofosforados. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

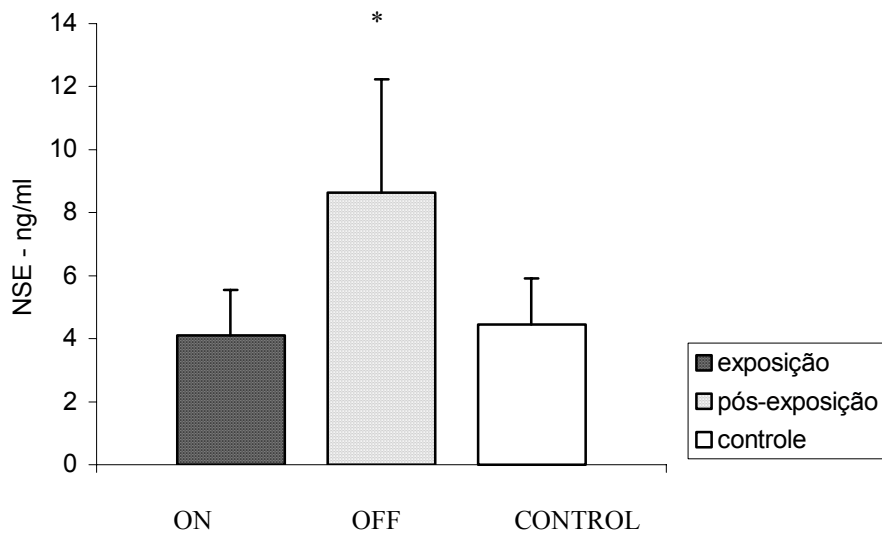
## Resultados

Os agricultores avaliados (n=24) apresentavam exposição crônica e sistemática aos pesticidas organofosforados (Salvi et al, 2003). A medida da atividade da acetilcolinesterase nos dois momentos apresentou-se dentro dos limites propostos pela Legislação Nacional (3,2 a 9,0 KU/L). A quantificação da NSE no plasma, expressa na **Tabela 6**, evidencia que os níveis da NSE foram semelhantes, quando comparados o grupo controle e os pacientes em vigência de exposição (p=0,34). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa nos valores da NSE quando comparados os períodos de exposição e pós-exposição (p< 0,001), expresso na **Figura 1**.

**Tabela 6** – Quantificação da NSE no sangue (ng/ml) em agricultores submetidos à exposição crônica a pesticidas organofosforados

	n	média (DP)
Exposição	24	4,10 (1,45)
Pós-exposição	24	8,63 (3,60)
Grupo controle	39	4,46 (1,45)





**Figura 1-** Quantificação da NSE plasmática nos pacientes (durante e após exposição aos pesticidas organofosforados) e no grupo controle.

## **Discussão**

Durante a exposição, os agricultores apresentaram índices da NSE comparáveis aos obtidos no grupo controle. Entretanto, após a exposição (período de 3 meses), houve elevação significativa destes valores. O aumento da NSE nos agricultores, quando do término da exposição, pode ser atribuído a mecanismos similares aos observados em condições de isquemia cerebral. A morte neuronal tardia de células piramidais do hipocampo, observada após lesão traumática cerebral, isquemia e convulsão tem sido atribuída a mecanismos associados à liberação elevada de glutamato (Lahtinen et al, 2001). Os dados obtidos neste estudo encontram-se em fase preliminar de avaliação, devendo-se ampliar a investigação, estendendo-a para condições de exposição crônica e aguda, na tentativa de estabelecer um perfil da NSE em indivíduos expostos a compostos potencialmente neurotóxicos.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição crônica a níveis baixos de pesticidas favorece a instalação de processos adaptativos orgânicos que limitam o uso de parâmetros clínicos e bioquímicos, reconhecidos em condições de exposições agudas. Este trabalho evidenciou a importância da monitorização de aspectos neurocomportamentais na avaliação de indivíduos submetidos a exposições crônicas aos OPs e reproduz observações prévias onde foram constatadas alterações neurocomportamentais, como ansiedade e depressão, em índices superiores aos da população geral (Stallones e Beseler, 2002; Jamal et al, 1997, 2002; Sánchez-Amate et al, 2001). Manifestações de ansiedade e de depressão estavam presentes mesmo na ausência de sinais clássicos de toxicidade colinérgica ou de alterações bioquímicas relacionadas à medida da atividade da acetilcolinesterase, indicando que os mecanismos relacionados à instalação destes efeitos independem da inibição enzimática.

Diversos autores têm atribuído a instalação de manifestações de extrapiramidalismo como resultado da combinação de agressões ambientais somadas à suscetibilidade genética. Neste sentido, é reconhecido o papel do herbicida MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) em determinar efeitos extrapiramidais devido à inibição da cadeia respiratória dos neurônios dopaminérgicos (Vaccari e Saba, 1995; Bhatt et al, 1999; Shahar e Andrews, 2001). De acordo com os achados do estudo, deve-se considerar igualmente o papel dos pesticidas organofosforados como fator ambiental predisponente à instalação de manifestações extrapiramidais. Conforme Bhatt et al (1999) e Shahar e Andrews (2001), a toxicodinâmica do efeito extrapiramidal determinada por OPs ainda necessita de elucidação. Entretanto, estes autores não descartam a possibilidade de que mecanismos como inibição do transporte de dopamina

nos núcleos da base ou a ativação excessiva de neurônios colinérgicos nestes núcleos, estejam envolvidos na patogênese do efeito extrapiramidal.

Os resultados da medida plasmática da proteína S100B não evidenciaram diferenças quando comparados os momentos de vigência e intervalo de exposição. Uma explicação poderia estar relacionada ao tempo prolongado a que estes agricultores encontram-se expostos a estas substâncias. Estudos prévios demonstraram que em doenças crônicas, como esquizofrenia e Doença de Alzheimer, os níveis da proteína S100B aumentam nos estágios iniciais, o que parece representar o período onde iniciam-se os processos neurodegenerativos (Lara et al, 2001). Sugere-se, desta forma, que seja realizada análise da proteína S100B em indivíduos com intoxicação aguda, para confirmação ou não desta hipótese.

A quantificação da NSE apresentou variação significativa após término da exposição, o que poderia expressar evento de morte neuronal tardia. A liberação aumentada de glutamato é considerada como causa de morte tardia de células piramidais do hipocampo. Em modelos experimentais, os primeiros sinais morfológicos de dano cerebral são observados em torno de 2 a 4 dias após quadro isquêmico ou convulsivo (Lahtinen et al, 2001). Assim, a elevação tardia da NSE, observada neste trabalho no momento em que cessou a exposição, conduz para interpretações neste sentido, as quais deverão ser aprofundadas em estudos futuros.

A medida da atividade da acetilcolinesterase reflete a toxicodinâmica relacionada à inibição enzimática, quadro observado na Síndrome Colinérgica Aguda (SCA). Relatos de Nava et al (1999) evidenciaram a presença de manifestações

colinérgicas em uma população sem que esta, entretanto, apresentasse alterações na medida enzimática. Somando-se a esta limitação encontra-se o fato de que a toxicodinâmica dos organofosforados não se restringe à inibição de esterases, tendo mecanismos tóxicos não totalmente esclarecidos, os quais se manifestam através de alterações neurocomportamentais como extrapiramidalismo, ansiedade e depressão, entre outros. Neste sentido, os autores propõem continuidade na avaliação neurocomportamental dos indivíduos, com a elaboração de protocolo que dê sustentação a este estudo. Da mesma forma, investigações dirigidas à quantificação da NSE devem ser continuadas na tentativa de avaliar a sua validade como parâmetro bioquímico de exposição crônica.

Estudos voltados à avaliação da toxicidade dos pesticidas, em populações, usualmente analisam os efeitos dos compostos de forma isolada, não levando em conta a possibilidade de interação entre os diversos princípios ativos, bem como aos solventes orgânicos que freqüentemente encontram-se nas formulações. Isto questiona sobre a possibilidade de sinergias, principalmente tendo-se em conta o tempo prolongado a que são submetidas estas populações.

Algumas questões metodológicas da investigação devem ser consideradas. Primeiro, este estudo consiste somente na avaliação dos indivíduos com exposição crônica a baixas doses de pesticidas organofosforados, assim, os achados devem ser reconhecidos como pertencentes a um grupo específico. Segundo, os investigadores dirigiram sua atenção para morbidades psiquiátricas e neurológicas; portanto, a inclusão de um grupo não exposto à pesticida poderia ser útil; por outro lado, o uso de entrevista estruturada e exame físico atenuaram este viés. Terceiro, indivíduos expostos a

pesticidas se engajaram em maior número ao estudo do que os não-expostos, possivelmente devido à preocupação dos primeiros em relação ao potencial de risco à saúde. Finalmente, os indivíduos poderiam estar expostos a níveis residuais de OPs nas roupas, alimentação e equipamentos quando no período considerado “sem exposição”. Estas limitações evidenciam a dimensão do problema representado pela agricultura familiar e reforça a necessidade de se dirigir a atenção para este alvo em estudos futuros, principalmente considerando-se o efeito neurotóxico dos pesticidas.

A relevância do trabalho se fundamenta nas observações do amplo uso dos OPs, muitas vezes acompanhado por banalização dos riscos por parte dos agricultores; da neurotoxicidade comprovada destes compostos, em algumas situações marcada pela irreversibilidade e pela inexistência de parâmetros clínicos e de indicadores biológicos em casos de exposição crônica, em função de fenômenos de tolerância. A busca de marcadores biológicos de lesão cerebral decorrente de exposição crônica a pesticidas é pertinente, devendo ser ampliada em futuro próximo através do acompanhamento dos trabalhadores agrícolas, com o objetivo de buscar parâmetros clínicos e/ou bioquímicos que antecedam a instalação de dano cerebral irreversível.

# PERSPECTIVAS

Conduta primordial consiste no reforço de medidas educacionais voltadas ao uso dos pesticidas, na tentativa de ampliar o conhecimento dos riscos e de reduzir os índices de exposição dos agricultores. Da mesma forma, serão desenvolvidos estudos em situações de intoxicação aguda, em humanos, para investigação do comportamento das proteínas S100B e da NSE, bem como serão implementados estudos básicos, em animais e culturas de células, para ampliar a avaliação de toxicidade dos pesticidas organofosforados.



# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aiuto LA, Pavlakis SG, Boxer R. A Life-threatening organophosphate-induced delayed polyneuropathy in a child after accidental chlorpyrifos ingestion. *J. Pediatr* 122: 658-660 (1993).

Amr MM, Halim ZS, Moussa SS. Psychiatric disorders among Egyptian pesticide applicators and formulators. *Environ Res* 73: 193-199(1997).

Austin AP, Harris GE, Lucey WP. Impact of an organophosphate herbicide (Glyphosate®) on Periphyton Communities developed in Experimental Streams. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 47:29-35 (1991)

Axelrad JC, Howard CV, Mc Lean WG. The effects of acute pesticide exposure on neuroblastoma cells chronically exposed to diazinon. *Toxicology* 185: 67-78 (2003)

Barbosa ER, Leite C. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disorders* 16 (3):565-568 (2001).

Basile AM, Fusi C, Conti A, Paniccia G, Pracucci G, Trefoloni G, Di Carlo A, Carbonetto F, Pretelli P, Calomai G, Vaccari M, Abbate R, Inzitari D. S100 protein and neuron specific enolase as markers of subclinical cerebral damage after cardiac surgery: preliminary observation of a 6- month follow-up study. *Eur Neuro* . 45:151-159 (2001).

Bastidas SM. Intermediate syndrome secondary to ingestion of chlorpiriphos. *Vet Hum Toxicol* 4(1):34 (2001).

Beaudeau JL, Deuqer L, Foglietti MJ. La protéine S-100 $\beta$ : un nouveau marqueur biologique de pathologie cérébral. *Ann Biol Clin* 57:261-272 (1999).

Bhatt MH, Mikhail AE, Mankodi AK, Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication. *Neurol* 52: 1467-1471 (1999).

Bushnell PJ, Carey NP, Padilla S. Behavioral and neurochemical effects of acute chlorpyrifos in rats: tolerance to prolonged inhibition of cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 266(2):1007-1017 (1993).

Chuang CC, Lin TS, Tsai MC. Delayed neuropathy and myelopathy after organophosphate intoxication. *N Eng J Med* 347: 1119-21 (2002).

CIT/RS - Centro de Informações Toxicológicas da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (CIT/RS) - Departamento de Estatística (2003).

de Kruijk JR, Leffers P, Meuheere PCA, Meerrhoff S, Twijnstra A. S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients: a comparison with healthy controls. *Acta Neurol Scand* 103(3):175-179 (2001).

Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* 12:713-726 (1991).

Ellenhorn MJ and Barceloux DG. *Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment*. 2 ed, Matthew J. Ellenhorn, Williams and Wilkins Co. New York (1997).

Ellman G, Courtney D, Andres V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95 (1961).

Guadarrama-Naveda M, de Cabrera LC, Matos-Bastidas S. Intermediate syndrome secondary to ingestion of chlorpyrifos. *Vet Hum Toxicol* 4: 34 (2001).

He F, Xu H, Qin F. Intermediate myasthenia syndrome following acute organophosphate poisoning - an analysis of 21 cases. *Hum Exp Toxicol* 17:40-45 (1998).

Herrmann M, Curio N, Jost S, Grubich C, Ebert A, Fork M, Synowitz H. Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70:95-100 (2001).

Ingebrigtsen T, Rommer B. Serial S-100 protein serum measurements related to early magnetic resonance imaging after minor head injury. *J Neurosurg* 85:945-948 (1996).

Jamal GA. Neurological syndromes of organophosphorus compounds. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 16 (3): 133- 170 (1997).

Jamal GA, Hansen S, Pilkington A, Buchanan D, Gillham RA, Abdel-Azis M, Julu PO, Al-Rawas SF, Hurley F, Ballantyne JP. A clinical neurological, neurophysiological, and neuropsychological study of sheep farmers and dippers exposed to organophosphate pesticides. *Occup Environ Med* 59 (7): 425-426 (2002).

Johnsson P. Markers of cerebral ischemia after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 10(1): 120-126 (1996)

Jordan W, Hagedohm J, Wiltfang J, Laier- Groeneveld G, Tumai H, Rodenbeck A, Ruther E, Hajak G. Biochemical markers of cerebrovascular injury in sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 20:158-164 (2002).

Joubert PH. Chorea and psychiatric changes in organophosphate poisoning. *SAMT* 74:32-34 (1988).

Kaplan JG, Kessler J, Rosenberg N, Pack D, Schaumburg HH. Sensory neuropathy associated with Dursban (chlorpyrifos) exposure. *Neurology* 43: 2193-2196 (1993).

Kligman D, Marshak DR. Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci* 82:7136-7139 (1985).

Lahtinen H, Autere AM, Paalasmaa P, Lauri SE, Kaila K. Post-insult activity is a major cause of delayed neuronal death in organotypic hippocampal slices exposed to glutamate. *Neurosci* 105(1):131-137 (2001)

Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LVC, Gonçalves CA, Fonseca M, Hauck S, Souza DO. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication- free patients. *J Psych Res* 35:11-14 (2001).

Lascales TF, Pereira GA, Coletto FA, Menezes JB, Basile A. Síndrome intermediária na intoxicação exógena por inseticida organofosforado. *Rev Bras Terap Intens* 12 (1):32-36 (2000).

Levin HS, Rodnitsky RL, Mick DL. Anxiety associated with exposure to organophosphate compounds. *Arch Gen Psych* 33: 225-228 (1976).

London L, Neff V, Tompson M, Myers J. Effects of long-term organophosphate exposures on neurological symptoms, vibration sense and tremor among South African farm workers. *Scand J Work Environ Health* 24(1):18-29 (1998).

Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Gonçalves CA, Soares JC, Kapczinski F, Souza DO. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first maniac episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:269-272 (2002).

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19: 739-744 (1965).

Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus and sensory neuropathy. *J Neurol Psychiatry* 64: 463-468 (1998).

Nava ME, Román PP, Robles SH, Alvarado LM. Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Salud Publica Mex* 41: 55-61 (1999).

Nygaard O, Langbakk B, Romner B. Age-and sex-related changes of S-100 protein concentrations on cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurobiological disorder. *Clin Chem* 43(3): 541-543 (1997).

Obojska A, Ternan NG, Lejczak B, Kafarski P, McMullan G. Organophosphonate utilization by Thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20. *Appl Environ Microbiol* 68 (4): 2081- 2084 (2002)

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, raskind MA , van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer 's disease. *Neurochem Int* 39:409-413 (2001)

Peter PV, Cherian AM. Organic insecticides. *Anaesth Intens Care* 28: 11- 29 (2000).

Pleines V, Morganti M, Joller H, Trentz O. S-100B reflects the extent of injury and outcome, whereas neural specific enolase is a better indicator of neural inflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*18(5): 491- 498 (2001).

Portela LV, Tort ABL, Neto EC, Kessler RG, Penchaszadeh V, Gonçalves CA, Souza DO, Giugliani R. High immunocontent of S100B protein in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol* 16:590-593 (2000)

Portela LV, Brenol JC, Walz R, Bianchin M, Tort ABL, Canabarro UP, Behegaray S, Marasca JA, Xavier RM, Neto EC, Gonçalves CA, Souza DO. Serum S100B levels in patients with lupus erythematosus: preliminary observation. *Clin Diagn Lab Immun* 9(1):164-166 (2002a).

Portela LV, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Walz R, Rotta LN, Silva CT, Busnello JV, Kapczinski F, Gonçalves CA, Souza DO. The serum S100B concentrations is age dependent. *Clin Chem* 48 : 950-952 (2002b)

Prendergast MA, Terry AV, Buccafusco JJ. Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats. *Neurotoxicol Teratol* 20:115- 122 (1998).

Rasmussen LS, Christiansen M, Eliassen K, Saunder-Jensen, Moller J. Biochemical markers form brain damage after cardiac surgery-time profile and correlation with cognitive dysfunction. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:547-551 (2002).

Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicol Teratol* 120: 343-351 (2001).

Richardson R.J. Assessment of the neurotoxic potential of chlorpyrifos relative to other organophosphorus compounds: a critical review of the literature. *J Toxicol Environ Health* 44: 135-165 (1995).

Salvi RM, Lara DR, Ghisolfi ES, Portela LV, Dias RD, Souza DO. Neuropsychiatric Evaluation in Subjects Chronically Exposed to Organophosphate Pesticides. *Toxicol Sci* 72: 267-271 (2003)

Sánchez-Amate MC, Flores P, Sánchez-Santed F. Effects of chlorpyrifos in the plus-maze model of anxiety. *Behav Pharmacol* 12: 285-292 (2001).

Senanayake N, Johnson MK. Acute polyneuropathy after poisoning by a new organophosphate insecticide. *N Eng J Med* 306:155-157 (1982).

Shahar E, Andraws J. Extra-pyramidal parkinsonism complicating organophosphate insecticide poisoning. *Eur J Paediatr Neurol* 5: 261-264 (2001).

Spasova D, White T, Singh AK. Acute effects of acephate and metamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. *Comp Biochem Physiol* 126 (1):79-89 (2000).

Stallones L, Beseler C. Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. *Ann Epidemiol* 12: 389-394 (2002).

Steenland K, Jenkins B, Ames RG, O'Malley M, Chrislip D, Russo J. Chronic neurological sequelae to organophosphate pesticide poisoning. *Am J Public Health* 84: 731-736 (1994).

Stokes L, Stark A, Marshall E, Narang A. Neurotoxicity among pesticide applicators exposed to organophosphates. *Occup Environ Med* 52: 648-653 (1995).

Sudakin DL, Mullins ME, Horowitz BZ, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J Toxicol Clin Toxicol* 38: 47-50 (2000).

Suttner SW, Piper SN, Lang GK, Huttner I, Kumle B. Cerebral effects and blood sparing efficiency of sodium nitroprusside induced hypotension alone and in combination with acute normovolaemic haemodilution. *B J Anaesthesia* 87(5):699-705 (2001).

Tagliaferro P, Ramos A, López EM, Saavedra JP, Busco A. Neural and astroglial effects of a chronic parachlorophenylalanine induced serotonin synthesis inhibition. *Mol Chem Neuropathol* 32:195-211 (1997).

Tanabe T, Suzuki S, Shimakawa S, Wakamiya E, Tamai H. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase levels after febrile seizures. *Epilepsia* 42: 504-507 (2001).

Taylor P. Anticholinesterase agents. In Goodman and Gilman's – The Pharmacological Basis of Therapeutics. Joel Hardman and Lee Limbird, 10 ed: 175-191 (2001)

Vaccari A, Saba PL. The tyramine-labelled vesicular transporter for dopamine: a putative target of pesticides and neurotoxins. *Eur J Pharmacol* 292:309-314 (1995).

Verdú A, Falero MP, Arroyos A, Estévez F, Félix V, López Y, Pantoja A, Ureta A. Enolasa específica neuronal sanguínea en neonatos com asfixia perinatal. *Rev Neurol* 32(8):714-717 (2001)

Walz R, Portela LVC, Tort ABL, Neto EC, Fernandes LNT, Gonçalves CA, Souza DO. Serum S100 levels in patients with HTLV-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis. *Neurology* 54:2021-2022 (2000).

Wiesmann M. Plasma S-100 protein concentration in healthy adults is age-and sex-independent. *Clin Chem* 44(5):1056-1058 (1998).

Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulat Toxicol Pharmacol* 31: 117-165 (2000)



Ziegler DR, Innocente CE, Leal RB, Rodnight R, Gonçalves CA. The S100B protein inhibits phosphorylation of GFAP and vimentin in a cytoskeletal fraction from immature rat hippocampus. *Neurochem Res* 23 10:1259-1263 (1998)

Zimmer DA, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Research Bull* 37(4):417-429 (1995).

# **ANEXOS**

## ANEXO I

### Protocolo de Investigação – Número .....

#### ***Identificação***

---

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Telefone para contato \_\_\_\_\_

#### ***Atividade / Exposição***

---

Tipo:             aplicação     preparo     transporte     outro.....  
Uso de EPI:     luva             máscara     macacão     outro.....  
Pesticida:     OP             CB             outro

Tempo de exposição / dia:  
Tempo de exposição / ano:

#### ***História Progressa***

---

Patologias:  
Uso de fármacos:  
História de intoxicação:             não             sim  
n<sup>o</sup> de vezes:.....

#### ***Hábitos***

---

Tabagismo                                     não             sim.....  
Consumo de álcool                         não             sim.....  
Consumo de substâncias psicoativas  não             sim .....

#### ***Exame Clínico Geral***

---