

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**EFEITO DO GLICONATO DE CÁLCIO E DO FLUORETO DE
FENILMETILSULFONIL (PMSF) NO TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO
AGUDA POR ORGANOFOSFORADO NEUROPÁTICO EM GALINHAS,
UTILIZANDO COMO PROTÓTIPO O TRI-ORTO-CRESIL FOSFATO
(TOCP).**

GABRIELA ANDRIOLLO MUZARDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

ARARAQUARA – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**EFEITO DO GLICONATO DE CÁLCIO E DO FLUORETO DE
FENILMETILSULFONIL (PMSF) NO TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO
AGUDA POR ORGANOFOSFORADO NEUROPÁTICO EM GALINHAS,
UTILIZANDO COMO PROTÓTIPO O TRI-ORTO-CRESIL FOSFATO
(TOCP).**

GABRIELA ANDRIOLLO MUZARDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Toxicologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira

Araraquara – SP

2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Georgino Honorato de Oliveira
(Orientador e Presidente)

Prof.^a Dr.^a Rosângela Gonçalves P. Machado
(Membro titular)

Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos
(Membro titular)

Agradecimentos Especiais:

À Deus

Agradeço pela saúde, força e paz, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À minha Mãe do Céu, Maria

Obrigada por ter iluminado o meu caminho todos os dias, até a conclusão de mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Vicente e Maria Teresa :

“Se um dia, já mulher feita e realizada, eu sentir que a terra cede a meus pés, que minhas obras desmoronam, que não há ninguém à minha volta para me estender a mão, esquecerei minha maturidade, passarei pela minha mocidade, voltarei à minha infância e balbuciarei, entre lágrimas e esperanças, as palavras que sempre me restarão na alma: Minha Mãe, Meu Pai.”

(Rui Barbosa – adaptado)

O Único e Verdadeiro Mestre é Deus, eu sou simplesmente uma professora-aluna, que deseja ensinar o que sabe da melhor forma, para assim, aprender a cada dia mais...

Ao meu noivo, Marcelo:

“Ainda que eu fale a língua dos homens e a língua dos anjos, sem amor, eu nada seria.

É só o amor que conhece o que é verdade, o amor é bom, não quer o mal, não sente inveja ou se envaidece.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

O amor é paciente, não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade.

Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba, mas havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará.

Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, porém, o maior destes é o amor.”

(1-Coríntios, 13)

Obrigada pelo seu amor, dedicação, apoio e paciência constantes.

Sem você ao meu lado, eu não chegaria até aqui.

À Cecília, Amauri, Júnior e Andresa:

Obrigada pelo incentivo e carinho em todos os momentos.

Vocês são parte da minha família e estarão sempre no meu coração.

Agradecimentos:

Aos meus amados pais, por tudo o que fizeram e fazem para a minha felicidade, amo vocês, obrigada por tudo e espero retribuir às suas expectativas.

À toda a minha família: minha irmã Cláudia (que alegra minha vida com sua música), avós, tios e primos. Obrigada pelo amor, incentivo e por confiarem no meu potencial sempre. Obrigada pelas orações, interesse e carinho incondicionais. Vocês são o meu porto seguro, onde a minha alma se fortalece.

Ao Marcelo, por toda a sua dedicação a mim, lhe serei sempre grata por tudo. Te amo para sempre. Esta vitória também é sua.

À família do Marcelo: Cecília, Amauri, Júnior e Andresa, obrigada por todo apoio e consideração.

Ao Prof. Dr. Georgino, meu orientador, que muito me entusiasmou a seguir em frente e é um exemplo de dedicação à toxicologia. Agradeço pela sua paciência e persistência em fazer de mim uma cientista.

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera, por ser para mim um modelo de dedicação e excelência na tarefa de professor da matéria e da vida.

À Prof.^a Dr.^a Rosângela G. P. Machado, por ser tão alegre e prestativa, me ajudando sempre que precisei; quem me dera, um dia, ser um pouco parecida com a mulher, a mãe e a professora apaixonada que ela é.

À Maria, pela amizade e pela ajuda constante, que Deus sempre te abençoe, obrigada por ter me ensinado o que é ser uma mulher forte na vida e por ter sido uma mãe pra mim.

À Sandra, pelo apoio, ensinamentos e por ter me ensinado a serenidade no dia-a-dia.

À Valéria, por toda ajuda, por ser sempre prestativa e por ter me mostrado que tudo pode ser realizado com muita garra e alegria.

À Irene, pela ajuda e amizade valiosas e pelo exemplo de superação e força.

À Bete, pelo exemplo de dedicação e por ter mantido o biotério das minhas “colegas” sempre limpinho.

À todas as minhas “colegas”, galinhas que deram suas vidas para que eu pudesse realizar este trabalho. A vida de cada uma delas foi muito respeitada e valiosa para mim. Agradeço a Deus por ter a oportunidade de aprender a trabalhar com estas aves, o que me trouxe alegria e muito orgulho, pois não é qualquer pessoa que encara este desafio, mas eu o fiz com muito carinho.

À Bete e Rosana, do departamento de farmacologia, pelo exemplo de excelência profissional, simpatia e ajuda constantes.

Aos amigos Fábio, Tarciso e Joice, por todo apoio que sempre me deram, por estarem sempre dispostos a ajudar à todos e partilhar seus conhecimentos.

À todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara, pelos preciosos conhecimentos transmitidos.

À minha amiga Priscila, pelo apoio e amizade indispensáveis para a realização deste trabalho, você é um modelo de dedicação aos estudos e amor à família que eu nunca esquecerei.

À minha amiga Fernanda, que me acolheu na sua casa quando eu precisei e que sempre me animou e incentivou, com seu alto astral inabalável, que eu admiro.

À Tirene, Olívia e Tiana, pela simpatia e acolhimento essenciais para me animar diariamente.

Aos amigos da Biblioteca: Irani, Ana, Max e Moacir, que muito me ajudaram nestes anos em meio a livros, bibliografias e buscas na Internet.

Ao médico veterinário Airton Pegoraro, por ter me emprestado livros preciosos para a formulação deste trabalho.

À minha amiga Gloriete, por ser este anjo sempre presente na minha vida, que de repente aparece, quando eu mais preciso, para me dar “aquele” abraço.

Às minhas primas e amigas Rita e Roseli, que sempre me incentivaram, desde a minha iniciação científica, obrigada por sempre me escutarem e aconselharem quando preciso.

Aos queridos amigos, que sempre estarão no meu coração: Susana, Kelly, Traudi, Karen, Grace, Juliana, Priscileila, Fabrício e Gustavo. Obrigada simplesmente por serem pessoas tão especiais.

Aos professores de Farmacologia: Cléo, Ricardo, Kaká e Chico, por serem pessoas e profissionais maravilhosos, que eu muito admiro.

À minha amiga e estagiária Renata, que Deus mandou para mim quando eu mais precisei. Não tenho palavras para te agradecer por tudo o que você fez para me ajudar, mas Deus te recompensará, com certeza. Você foi como um oásis no meio do deserto desta minha caminhada.

À CAPES, pela bolsa concedida e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara pelo apoio à esta linha de pesquisa.

Enfim, à todos que aqui não foram citados, mas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

RESUMO

O número crescente de casos de intoxicações agudas, acidentais ou suicidas, por organofosforados indica a necessidade de buscar uma estratégia que evite o surgimento de graves efeitos tóxicos irreversíveis da Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados (NRIOP). Esta neuropatia é provocada por alguns destes compostos, como triclorfon, monocrotofós, metamidofós e clorpirifós, que são muito utilizados como agrotóxicos no Brasil e em vários países do mundo. Outro composto neuropático, o tri-*orto*-cresil fosfato (TOCP), utilizado principalmente como plastificante e fluido hidráulico retardante de chama, é um dos protótipos utilizados para o estudo desta neuropatia em galinhas, que é o animal de escolha para o estudo da NRIOP. Estes compostos organofosforados inibem a atividade da Enzima Susceptível à Neuropatia (ESNp) no cérebro, na medula óssea, nos nervos periféricos e nos linfócitos, iniciando a neurotoxicidade. O TOCP provoca a queda dos níveis de cálcio no plasma e isto causa uma dificuldade de contração do músculo esquelético, levando aos sinais motores da NRIOP. Assim, este projeto propõe uma estratégia de tratamento, com doses de gliconato de cálcio e de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), até 24 horas após a intoxicação pelo TOCP, período em que ocorre a inibição da atividade da ESNp em 70-80%, nível este necessário ao surgimento dos efeitos clínicos da NRIOP. Para a realização dos experimentos, foram utilizados vários grupos de galinhas Isabrown (1,5 a 2,5 Kg; n=4; 18 meses de idade). O primeiro grupo (controle positivo) recebeu apenas 500 mg/kg de TOCP, via oral. Juntamente com a dose de 500 mg/kg de TOCP, os outros grupos receberam, via endovenosa, doses de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio e uma dose de 90 mg/Kg de PMSF, via subcutânea, em diferentes tempos. Todas as galinhas tiveram seu sangue analisado para determinação de cálcio, nos tempos 0, 12, 24 e 48 horas; 8, 14 e 28 dias, após receberem as doses das substâncias. A atividade da ESNp foi determinada nos linfócitos das aves, nos tempos 0, 12 e 24 horas. As aves foram observadas durante 28 dias e seus escores de neurotoxicidade foram classificados através de uma escala crescente de gravidade. Os dados bioquímicos foram analisados através dos testes ANOVA seguido de Tukey e os escores foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância $\alpha \leq 0,05$. Os resultados demonstraram que a administração de duas doses de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio, nos tempos 0 e 12 horas e uma dose única de 90 mg/Kg de PMSF,

no tempo 0 hora, evitaram o acentuado declínio do cálcio no plasma, causado pelo TOCP. Os escores de neurotoxicidade progrediram linearmente com o tempo, o que sugere que os escores não estão relacionados somente com os níveis de cálcio no plasma. Porém, foi observada uma significativa amenização dos escores das aves, após este tratamento, em relação ao grupo controle positivo, e isto foi muito satisfatório.

Palavras-chave: Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados, Enzima Susceptível à Neuropatia, Tri-orto-cresil fosfato, Fluoreto de fenilmetilsulfonil, galinha, gliconato de cálcio.

ABSTRACT

The growing number of cases of acute intoxication by organophosphorus, either accidental or suicidal, shows the importance of finding a strategy to prevent the irreversible signs of the organophosphorus-induced delayed neuropathy (OPIDN). This neuropathy is caused by components such as trichlorphon, monocrotophos, metamidophos and clorpyriphos, widely used as pesticides in Brazil and in many other countries. Another neuropathic compound, the tri-*o*-cresyl phosphate (TOCP), which is used as a plasticizing component and flame-retardant fluid, is one of the most commonly used chemicals for the study of the neuropathy in chickens, which is the animal of choice for OPIDN research. These compounds inhibit the activity of neurotoxic esterase (NTE) in brain, spinal cord, sciatic nerve and lymphocytes, and they may induce OPIDN. TOCP cause the levels of calcium in the plasma to decrease, which makes it more difficult for the muscles to contract, leading to the motor signs of neurotoxicity. Therefore, this paper suggests a strategy of treatment by providing doses of calcium glyconate and phenylmethylsulfonil fluoride (PMSF), so that diminish the signs of OPIDN, 24 hours before chickens have received TOCP, period within which occurs the largest activity inhibition of NTE, over 70-80%, necessary for observation of the clinical effects of NRIOP. Various groups of Isabrown chicken were studied (1,5 to 2,5 Kg; n=4; 18 months old). The first group (positive control) was given only 500 mg/kg of TOCP, orally. Together with 500 mg/kg of TOCP, the other groups were given intravenous doses of 5 mg/Kg of calcium glyconate and subcutaneous doses of 90 mg/Kg of PMSF, in different times. All hens had their blood tested for calcium, at: 0, 12, 24 and 48 hours; 8, 14 and 28 days after the treatment. The activity of NTE were determined in the lymphocytes of the chickens, at the times 0, 12 and 24 hours after the chemicals were administered. The birds have been observed when 28 days and their scores of neurotoxicity have been classified according to the degree of gravity. The biochemical data were statistically analysed by ANOVA followed by Tukey and the scores were statistically analysed by Kruskal-Wallis, with level of significance $p < 0,05$. The results showed that calcium glyconate in two doses of 5 mg/Kg, at the times 0 and 12 hours, and a single dose of PMSF, at the amount of time 0 hour, avoided a sharp decline from the calcium in the plasma, caused by TOCP. The scores of neurotoxicity progressed linearly with the time, which suggests that other parameters besides the

levels of plasmatic calcium, may be involved. However a significant decrease in neurotoxic signs was observed after this treatment, comparing with the positive control group, and this which is a promising result and might contribute for future treatment strategies.

Key-words: Organophosphate-induced Delayed Neuropathy, Neurophathy Target Esterase, Tri-o-cresyl phosphate, Phenylmethylsulfonyl fluoride, chicken, calcium glyconate.

LISTA DE ABREVIATURAS

NRIOP – Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados

TOCP – Tri-orto-cresil fosfato

ESNp – Enzima Susceptível à Neuropatia

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

BSA – Soro Albumina Bovina

TRIS – Tris hidróxido amino metano

EDTA – Etileno diamino tetra acetato de sódio

PBS – Tampão Salina Fosfato

SDS – Dodecil sulfato de sódio

4 - AAP – 4-aminoantipirina

K₃ Fe (CN)₆ – Ferricianeto de Potássio

UI – Unidades Internacionais.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
1. Dados obtidos para construção da curva padrão de proteína BSA	24
2. Dosagem de proteína em linfócitos das galinhas do grupo controle	25
3. Variação individual da atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos das galinhas do grupo controle.....	26
4. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas do grupo controle positivo.....	27
5. Escores de neurotoxicidade das galinhas do grupo controle positivo , em função do tempo.....	28
6. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas após a intoxicação	29
7. Escores de neurotoxicidade das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio 0 e 12 horas depois da intoxicação.....	30
8. Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos das aves intoxicadas pelo TOCP, que receberam tratamento com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas.....	30
9. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio 12 e 24 horas depois da intoxicação	31
10. Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP e gliconato de cálcio, 12 e 24 horas após da intoxicação.....	32
11. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP concomitante com PMSF e também duas doses de gliconato de cálcio (0 e 12 horas).....	33
12. Escores de neurotoxicidade das galinhas que receberam TOCP concomitante com PMSF e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas.....	33
13. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e duas doses de gliconato de cálcio, nos tempos 12 e 24 horas após a intoxicação.....	34
14. Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e gliconato de cálcio nos tempos 12 e 24 horas.....	35

- 15.** Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos de galinhas intoxicadas pelo TOCP, que receberam tratamento com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas, além de PMSF 12 horas após a intoxicação.....35
- 16.** Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP; PMSF 6 horas depois e duas doses de gliconato de cálcio, nos tempos 0 e 12 horas.....36
- 17.** Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP, PMSF 6 horas depois e gliconato de cálcio 0 e 12 horas após a intoxicação37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Dosagem de proteína BSA.....	25
2. Dosagem de proteína em linfócitos das galinhas do grupo controle.....	25
3. Variação da atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em amostras de linfócitos das galinhas do grupo controle.....	26
4. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves do grupo controle positivo.....	27
5. Médias de cálcio no plasma (mg/Kg) das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio (0 e 12 horas).....	29
6. Atividade da ESNp em amostras de linfócitos das galinhas intoxicadas pelo TOCP e tratadas com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas.....	30
7. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio, 12 e 24 horas depois.....	31
8. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP concomitante com PMSF e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas.....	33
9. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e também gliconato de cálcio nos tempos 12 e 24 horas.....	34
10. Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em amostras de linfócitos das galinhas intoxicadas pelo TOCP e tratadas com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas e PMSF 12 horas após a intoxicação.....	35
11. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP, PMSF 6 horas depois e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas, após a intoxicação.....	36

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1) Materiais	14
3.1.1) Reagentes	14
3.1.2) Equipamentos	14
3.1.3) Animais	14

3.2) Métodos	15
3.2.1) Delineamento Experimental	15
3.2.2) Observações de Neurotoxicidade	15
3.2.3) Dosagem de Cálcio no plasma	16
3.2.4) Separação de Linfócitos	17
3.2.5) Padronização para determinação de proteína.....	18
3.2.6) Determinação de proteína em linfócitos de galinha	19
3.2.7) Determinação da atividade da ESNp em linfócitos de galinha.....	19
3.2.8) Cálculos para determinação da atividade da ESNp em linfócitos de galinha	22
3.2.9) Análise estatística dos resultados	23
4. RESULTADOS	24
4.1) Grupo Controle.....	24
4.2) Grupo Controle Positivo.....	27
4.3) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 1.....	28
4.4) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 2.....	32
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	44

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS45

8. ANEXOS57

1. INTRODUÇÃO:

1.1) Casuística:

Segundo o Programa Nacional de Toxicologia do Serviço de Saúde Pública dos EUA existem naquele país 80.000 substâncias químicas às quais os habitantes podem estar expostos através de produtos industriais e de consumo, como também quando estão presentes nos alimentos, na água encanada e no ar que é respirado. Supõe-se que poucas destas substâncias representam um risco significativo para a saúde humana, nas concentrações de exposição existentes, mas os efeitos na saúde produzidos pela maioria delas são, muitas vezes, desconhecidos (CETESB SÃO PAULO, 1997).

Em 1998, o Inventário das Substâncias Químicas Comerciais da Europa registrou 100.000 compostos para vários propósitos. Segundo a Associação das Indústrias Químicas da República Federal da Alemanha apenas 4.600 substâncias são produzidas em quantidades superiores a 10.000 toneladas anuais. Estas substâncias seriam as que tem maior probabilidade de estarem envolvidas em acidentes químicos. As demais substâncias são utilizadas em laboratório ou em produtos manufaturados, em menor escala (CETESB SÃO PAULO, 1997).

Frente à enorme quantidade de substâncias químicas atualmente disponíveis, a pergunta que surge é: "Todas as substâncias químicas são tóxicas?" Provavelmente a melhor resposta seria: "Não há substâncias químicas seguras, mas sim maneiras seguras de utilizá-las" (CETESB SÃO PAULO, 1997).

Algumas substâncias têm, em pequenas quantidades, um efeito positivo sobre o organismo e tornam-se, no entanto, perigosas quando em grandes concentrações, como é o caso de diversos medicamentos. "Todas as substâncias são tóxicas. Não há nenhuma que não seja tóxica. A dose estabelece a diferença entre um tóxico e um medicamento" (Paracelso, 1493-1541) (OGA, 1996).

Dados da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 2004), relatam que as intoxicações agudas por agrotóxicos, são da ordem de 3 milhões por ano, com 20.000 mortes, sendo que 70% destes casos ocorrem apenas nos países em desenvolvimento. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mostram que em nosso país, até agosto de 2004, houve um aumento do uso de agrotóxicos em 22%, em relação a 2003, estando entre os maiores usuários destes produtos, atrás apenas dos Estados Unidos e do Japão (IBGE, 2004).

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox), da Fundação Osvaldo Cruz, divulgou em 1999, dados que comprovam que os agrotóxicos são os responsáveis por 10% das intoxicações registradas, fazendo 6.710 vítimas neste ano; destes, 2.531 foram acidentais e 2.235 foram tentativas de suicídio. No ano 2.000 este mesmo sistema, relatou 7.914 casos, com 149 mortes (11% em relação ao total de intoxicações). No Brasil, hoje, estima-se que morrem 5.000 trabalhadores rurais por ano, vítimas de agrotóxicos (SINITOX, 2004).

Entre 1992 e 2002, apenas no Estado do Mato Grosso do Sul, o Centro Integrado de Vigilância Toxicológica registrou 1.355 notificações de intoxicações. Nesse conjunto ocorreram 506 tentativas de suicídio e 139 óbitos. A causa das mortes foi ingestão voluntária de agrotóxicos, principalmente organofosforados e carbamatos (PIRES et al., 2005). Segundo este estudo de Pires (2005), foram registradas 293 tentativas de suicídio em Dourados-MS, no intervalo de dez anos, com 31 mortes. Esta estatística pode estar ligada ao maior potencial de exposição dos trabalhadores rurais desta região, por causa da alta demanda por agrotóxicos na cultura do algodão.

Compostos organofosforados têm limites de concentrações ambientais de 0,05 partes por bilhão (ppb) em água não potável, 0,0002 ppb em água potável, e menos de 100 ppb em sedimentos. De um modo geral, concentrações de organofosforados são encontradas próximas aos locais onde são fabricados (MARINO; PLACEK, 1994).

Muitos agricultores são analfabetos, além de não haver o hábito de leitura dos rótulos ou dos receituários agrônômicos, e, assim, os produtos são reconhecidos

pelas embalagens e pelas cores de suas tarjas de advertência. Para agravar tal situação, a Portaria número 03 do Ministério da Saúde, de 16 de janeiro de 1992, denominada “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registros e uso de agrotóxicos e afins”, ratifica os termos de um ato publicado no Diário Oficial da União em 13/12/91, "sem nome ou assinatura de seus autores", alterando a classificação toxicológica dos agrotóxicos. Os produtos que eram registrados, de acordo com a classificação original, como Classe Toxicológica I - Extremamente Tóxico (Faixa vermelha e caveira) e Classe Toxicológica II - Altamente Tóxico (Faixa amarela e caveira), passaram à Classe Toxicológica III - Medianamente Tóxico (Faixa azul) e Classe Toxicológica IV – Pouco Tóxico (faixa verde), deixando de constar a caveira, que é a identificação costumeira sobre o perigo que representam tais produtos (ROLIM et al., 1995).

Com a alteração normativa, em média, 6% dos agrotóxicos do país permaneceram nas classes I e II, sendo que 94% passaram às classes III e IV (Medianamente e Pouco Tóxico). Antes, pela Lei Nº 7.802/89, em média 85% dos agrotóxicos do país pertenciam às classes I e II (Extremamente e Altamente Tóxico), 12% à classe III e 3% à classe IV. A nova portaria não só minimizou as classes toxicológicas dos produtos, como também possibilitou o aumento da concentração de ingredientes ativos de muitos agrotóxicos (ROLIM, M., et al., 1995).

1.2) A intoxicação por organofosforados neuropáticos e a Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados (NRIOP):

Segundo Caires e Castro (2002), entre os vários agrotóxicos utilizados na região de Alta Floresta-MT, quatro dos mais utilizados são organofosforados e um destes é neuropático: Taron (metamidofós). Soares et al., (2003), realizaram um levantamento dos agrotóxicos mais utilizados no Estado de Minas Gerais, sendo que de um grupo de 29 produtos pesquisados, 18 eram organofosforados e entre estes, 4 neuropáticos: Dipterex (triclorfon), Lorsban (clorpirifós), Taron e Stron (metamidofós).

Rodnitzky R., et al. (1975), em estudo epidemiológico realizado com trabalhadores expostos à organofosforados nos Estados Unidos concluiu que “a intoxicação resulta em substanciais disfunções do Sistema Nervoso Central, incluindo ataxia, tremores, vertigens, convulsões, coma, ansiedade, confusão, irritabilidade, depressão, falhas de memória e dificuldade de concentração”. Gherson e Shaw (1961), reportaram surtos esquizofrênicos em trabalhadores rurais, provavelmente causados por exposições à organofosforados.

Ecobichon (1991) relatou que existem muitas pessoas com problemas de incapacidade intelectual e muscular devido à contaminações por organofosforados em muitos países. Estudos em animais demonstram que se ocorrer exposição através da respiração, contato com a pele ou deglutição de grandes quantidades de organofosforados, surgem efeitos no sistema nervoso em duas diferentes etapas:

* O primeiro tipo de consequência, que ocorre dentro de poucas horas após a intoxicação, é a inibição da acetilcolinesterase do sistema nervoso central, periférico, do plasma e dos eritrócitos. A acetilcolinesterase é uma enzima responsável por degradar o neurotransmissor acetilcolina. A inibição da acetilcolinesterase resulta em um acúmulo de acetilcolina nas sinapses, o que leva à um incremento da atividade do sistema nervoso autônomo parassimpático, causando salivação, lacrimejamento, miose, enjôos, vômitos, diarreia, aumento da secreção brônquica, bradicardia e incontinência urinária, além de fasciculações, câibras e fraqueza muscular. As consequências do aumento da concentração de acetilcolina no Sistema Nervoso Central, causa fadiga, confusão mental, cefaléias, convulsões e coma. Esses sintomas são dose-dependentes e exigem condutas de atendimento emergencial (ECOBICHON, 1991).

* A segunda consequência envolve danos para os nervos periféricos e os sintomas são fraqueza geral, principalmente de braços e pernas e paralisia de mãos e pés, que surgem várias semanas após a intoxicação. Trata-se de uma síndrome denominada Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados (NRIOP), observada em humanos e em certos animais, como galinhas ou gatos, após intoxicação pelo tri-orto-cresil fosfato (TOCP). De 8 a 14 dias após a intoxicação pelo TOCP, observa-se dificuldades de locomoção e casos graves resultam em ataxia e

paralisia irreversível, inicialmente dos membros inferiores. Uma degeneração característica das fibras motoras são detectadas em exames histopatológicos e os mecanismos bioquímicos da NRIOP ainda não foram totalmente elucidados. Esta neuropatia não parece estar correlacionada com a inibição da acetilcolinesterase, mas sim com a inibição da atividade da Enzima Susceptível à Neuropatia (ESNp) (ECOBICHON, 1991; JOHNSON, 1982; ABOU-DONIA e LAPADULA, 1990).

A NRIOP é uma axôniopatia distal, que se desenvolve num período de 8 a 14 dias após a exposição a esses compostos neuropáticos. A galinha é um animal de escolha para se estudar a NRIOP, pela sensibilidade e sinais clínicos similares àqueles vistos para os seres humanos (JOHNSON, 1975; BARRET et al., 1985). Esses animais, quando intoxicados, apresentam uma lentidão de movimentos motores, seguida de ataxia (dificuldade de locomoção dos membros inferiores), até o impedimento total da locomoção (JOHNSON, 1974).

1.3) A enzima envolvida: ESNP

A ESNp é uma proteína ligada à membrana plasmática, pertencente ao grupo das esterases, capaz de hidrolisar ésteres carboxílicos de álcoois alifáticos e aromáticos. O mecanismo de ação tóxica foi descrito por Johnson (1982), envolvendo inicialmente a desalquilação fosfórica do complexo enzima-inibidor (envelhecimento) da enzima. A causa precisa dos efeitos paralisantes e da degeneração axonal, produzidos por triésteres organofosforados, e o papel fisiológico da ESNp, ainda não foram totalmente esclarecidos (WHITNEY et al., 1995; GLYNN et al., 1999).

Estudos verificaram que a inibição da ESNP, após a administração de TOCP à galinhas, causou a NRIOP (CARRINGTON E ABOU-DONIA, 1988). De fato, Oliveira et al., (2002) demonstraram que 24 horas após a administração de 800 mg/Kg de TOCP à galinhas, via oral, mais de 80% da atividade da ESNP estava inibida nos linfócitos e no cérebro.

Para que a neuropatia apresente sinais clínicos, é preciso que a ESNp seja inibida em pelo menos 70-80%, no sistema nervoso central, na medula óssea, nos linfócitos e nos nervos periféricos (JOHNSON, 1975; DUDEK e RICHARDSON, 1982; SCHWAB e RICHARDSON, 1986; BARRET et al., 1985; LUTTRELL et al., 1993). Devido ao intervalo de tempo que transcorre entre a exposição ao organofosforado e o aparecimento dos primeiros sinais de neurotoxicidade, tem-se sugerido que a NRIOP assemelha-se a encefalomielite alérgica experimental, e assim, uma doença auto-imune pode estar envolvida no processo (WHITNEY et al., 1995).

1.4) O Protótipo: tri-orto-cresil fosfato (TOCP):

Apesar de não ser um agrotóxico, o TOCP é o protótipo deste estudo devido ao fato de que os estudos pioneiros da NRIOP, (JOHNSON, 1970) constataram que administrando TOCP a galinhas, estas desenvolviam a neuropatia de forma muito semelhante a esta doença observada em pessoas intoxicadas por organofosforados neuropáticos.

Segundo Abou-Donia e Lapadula (1990), no Sri Lanka ocorreram mais de 40.000 casos de NRIOP. Em 1930 havia mais de 20.000 casos nos Estados Unidos, como consequência do consumo de uma bebida, derivada do gengibre, chamada “Jamaican Ginger ” contaminada com TOCP.

O tri-orto-cresil fosfato (TOCP) constitui um dos isômeros encontrados na mistura do tri-cresil fosfato (TCP), um composto utilizado como plastificante, aditivo para gasolina, fluido hidráulico retardante de chama em mecânica de aviões, navios, turbinas de hidroelétricas, e óleo lubrificante para automóveis de grande e pequeno porte (MARINO; PLACEK, 1994).

Fluidos hidráulicos são uma grande classe de materiais, utilizados em máquinas e equipamentos para transferir pressão de um ponto para outro. Eles são

tóxicos para diversos sistemas do organismo e são utilizados de muitas formas, incluindo os fluidos para transmissões automáticas de carros, tratores e outros equipamentos agrícolas, caminhões, empilhadeiras e aviões (MARINO; PLACEK, 1994).

São mais utilizados três tipos de fluidos hidráulicos: óleo mineral, organofosforados e polialfaolefina. Os organofosforados são manufaturados, não contém petróleo e não queimam, a menos que haja uma chama diretamente sobre eles, sendo muito utilizados em aviões. Todos eles contém muitos ingredientes, que diminuem seu peso e fazem o fluido escoar melhor. Mais de 200 milhões de galões de fluidos hidráulicos são fabricados e vendidos nos Estados Unidos por ano (MARINO; PLACEK, 1994).

Existe risco de contato com estes fluidos hidráulicos tóxicos, principalmente em operários que utilizam equipamentos hidráulicos e em pessoas que trabalham na fabricação ou manutenção de automóveis, caminhões, tratores, equipamentos industriais, aviões, metalúrgicas e indústrias de eletrodomésticos. A maioria das pessoas são expostas quando estes fluidos derramam-se na pele, é trocado ou quando os reservatórios são preenchidos (MARINO; PLACEK, 1994).

Atualmente, esse isômero *orto* do TCP foi proibido de compor estas misturas de fluidos hidráulicos organofosforados, devido ao grande número de casos de neuropatia reportados onde ele é utilizado; visto que os outros isômeros não apresentam estes efeitos para seres humanos (LOTTI et al., 1993).

1.5) Tentativas de Tratamentos para a NRIOP: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) e gliconato de cálcio.

Com relação ao tratamento para a NRIOP, Peraica et al. (1995), administraram uma dose de PMSF, após os primeiros dias da dose do organofosforado neuropático, o que levou a uma significativa intensificação dos sinais clínicos.

O PMSF é um granulado branco, de forte odor, inibidor de proteases, não neurotóxico. Nos estudos em que é administrada, esta substância é normalmente diluída em dimetil sulfóxido (DMSO) e injetada nas galinhas, via subcutânea, na região do pescoço, em doses que vão de 30 mg/Kg a 120 mg/Kg, antes ou após a intoxicação por TOCP ou outro organofosforado neuropático. Os resultados destes estudos demonstram que o PMSF agrava a NRIOP, ou protege as aves desta neuropatia, dependendo do tempo em que for administrado (PERAICA et al., 1995; CARRINGTON e ABOU-DONIA, 1988).

O cálcio é um elemento essencial para a fisiologia do organismo e está envolvido na excitação das células nervosas, na contração muscular, na coagulação sanguínea, na permeabilidade das membranas biológicas e na atividade enzimática. A distribuição do cálcio no organismo é influenciada pela quantidade de cálcio que entra e sai do fluido extracelular, a quantidade de proteína disponível para conjugação e o estado ácido-base (LITTER, 1980).

Este íon tem a função de segundo mensageiro para a ação de muitos hormônios. Para desempenhar estas diversas funções, ele deve estar disponível no organismo na concentração apropriada. O cálcio ionizado é o componente que exerce os efeitos fisiológicos e quando se reduz, origina sintomas de hipocalcemia. A regulação das concentrações extracelulares de cálcio se encontram sob controle endócrino, que influencia sua absorção intestinal e sua excreção renal, regulando também uma reserva esquelética grande, para momentos de necessidade. As diferenças de concentração do cálcio intra ou extracelular, são reguladas por hormônios e vitaminas que controlam de maneira direta a reabsorção óssea, mantendo normal a concentração de cálcio no líquido intersticial (LITTER, 1980).

Os níveis de cálcio são regulados pela ação de três hormônios: paratormônio, calcitonina e vitamina D. O paratormônio (PTH) é produzido pelas células principais das paratireóides e constitui o principal hormônio que controla a regulação da concentração sérica do cálcio. A secreção deste hormônio é estimulada pela hipocalcemia (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

A hidroxilação da vitamina D é parcialmente regulada pelo PTH. Os principais órgãos alvo são os ossos e os rins. Nos ossos, o PTH mobiliza o cálcio das reservas esqueléticas para o fluído extracelular. E nos rins, o PTH possui um efeito direto na função tubular renal, levando à redução da reabsorção de fosfato e aumento da absorção de cálcio. Assim, o efeito do PTH é de elevar a concentração sérica de cálcio e reduzir a concentração sérica de fósforo (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

A calcitonina é um polipeptídeo secretado pelas células C da tireóide e sua taxa de secreção aumenta com a redução da concentração de cálcio no soro e vice-versa. Nos rins, este polipeptídeo aumenta a reabsorção de cálcio. Quando as concentrações de cálcio diminuem, a calcitonina regulariza estes níveis, equilibrando as concentrações séricas deste íon (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

A vitamina D (ergosterol e colecalciferol) age nos ossos, intestinos e rins. São necessárias pequenas quantidades de 1,25-diidroxicolecalciferol, metabólito ativo da vitamina D, para que o PTH possa agir nos ossos. Este metabólito estimula a mobilização osteoclástica do cálcio e a reabsorção óssea. No intestino, esta vitamina aumenta a absorção de cálcio e nos rins, a vitamina D aumenta a reabsorção tubular do cálcio. Deste modo, a função da vitamina D é aumentar as concentrações séricas do cálcio (BIRCHARD; SHERDING, 1998).

A carência do cálcio dificulta a interação dos filamentos de miosina com os de actina nas fibras musculares, impedindo a contração do músculo estriado esquelético. A diferença de concentração intra e extracelular do cálcio, é um importante fator para o surgimento da NRIOP (PIAO et al., 1996; GUYTON e HALL, 1997).

O receptor sensível ao cálcio extracelular (CaR) é um receptor acoplado à proteína G (GPCR), que exerce um papel essencial na regulação da homeostase do cálcio extracelular. O CaR encontra-se expresso em todos os tecidos relacionados com o controle desta homeostase (paratiróides, células C tireoideanas, rins, intestino e ossos). Logo após a clonagem do CaR, mutações inativadoras e ativadoras do gene deste receptor foram associadas com doenças genéticas humanas: hipercalcemia, hipocalciúrica familiar (FHH) e hiperparatiroidismo neonatal severo

(NSHPT) são causados por mutações inativadoras do gene do CaR, enquanto que a hipocalcemia autossômica dominante é resultante de mutações ativadoras do gene do CaR. O reconhecimento do papel fundamental do CaR na manutenção da homeostase do cálcio extracelular motivou o desenvolvimento de drogas capazes de modular a função do CaR, ativando-o (drogas calcimiméticas) ou inativando-o (drogas calciolíticas) (MIYASHIRO e HAUACHE, 2002).

As mudanças transitórias da concentração do cálcio citoplasmático representa um importante passo para a neurotransmissão e a modulação da excitabilidade das membranas celulares. Existem evidências do envolvimento dos íons cálcio nos processos de nocicepção e antinocicepção, incluindo os efeitos analgésicos produzidos pelos fármacos opióides (PRADO, 2001).

Os minerais representam de 4 à 5 % do peso corpóreo humano, o que corresponde a 2,8 Kg de um adulto de 70 Kg. Cerca da metade deste peso é cálcio. Portanto, o cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano, representando 1,2 Kg dos 2,8 Kg total de minerais. A necessidade diária alimentar de cálcio, para um adulto, é de 600 a 1.400 mg (LITTER, 1980).

Quase todo o cálcio (98%) encontra-se no esqueleto, constituindo os ossos, e nos dentes encontra-se apenas 0,5% do total. Os 1,5% restantes se encontram nos fluídos extracelulares, em estruturas intracelulares e nas membranas. O cálcio sanguíneo está em sua maior parte no plasma (extracelular) e existe em três estados: como íon livre (45%); ligado à proteínas, principalmente albumina (40%); formando complexos com ácidos orgânicos, como citrato, ou com ácidos inorgânicos, como fosfato (15%). Este último e o cálcio iônico são as únicas formas ultrafiltráveis do cálcio. As concentrações séricas de cálcio em adultos saudáveis, estão compreendidas entre 8,8 a 10,6 mg/dL, sendo o valor nas mulheres ligeiramente inferior que nos homens (LITTER, 1980).

As reduções do cálcio plasmático diminuem os potenciais de excitação das membranas celulares, causando crises convulsivas tetânicas, tremores e laringoespasmos. Acredita-se que o fluxo do Ca^{2+} para o interior das células se faz

por meio de difusão facilitada, mediada por transportadores. Vários canais de Ca^{2+} nas membranas celulares são regulados por hormônios e neurotransmissores, assim como pelo potencial de ação da membrana. No fígado e no músculo estriado, a atividade do Ca^{2+} é controlada pelos retículos endoplasmáticos e sarcoplasmáticos, respectivamente, que captam este elemento para o meio intracelular. O cálcio tem papel fundamental na excitação e contração muscular, pois o potencial de ação estimula a liberação de cálcio a partir do retículo sarcoplasmático. O Ca^{2+} liberado ativa a contração do músculo unido-se à troponina e o relaxamento ocorre quando este íon é captado de volta ao retículo sarcoplasmático (LITTER, 1980).

Luttrell et al., (1993) e Piao et al., (2003) demonstraram que, concomitante com o desenvolvimento dos sinais clínicos da NRIOP, ocorre uma significativa diminuição dos níveis de cálcio no nervo ciático e no soro de galinhas, após a administração de compostos organofosforados neuropáticos; isto demonstra que esta queda nos níveis séricos de cálcio, pode ter um importante papel no processo desta neuropatia.

Godinho et al., (2002) constataram que a adição de 1% de gliconato de cálcio na água de bebida de ratos, durante 3 dias, aumentou significativamente a quantidade de cálcio no soro e a atividade locomotora e exploratória dos mesmos, em relação ao grupo controle, que não recebeu gliconato de cálcio. Isto evidencia o papel promotor da contração do músculo esquelético exercida pelo tratamento com gliconato de cálcio.

Piao et al., (2003) administraram 3 mg/Kg de gliconato de cálcio, via subcutânea, à galinhas intoxicadas pelo TOCP e relataram bons resultados no sentido de evitar os escores de neurotoxicidade mais graves da NRIOP.

O gliconato de cálcio é muito superior ao cloreto de cálcio, porque não é irritante, sendo classificado como um eletrólito restaurador dos níveis de cálcio para o organismo. A administração de gliconato de cálcio, via endovenosa, já é utilizado na clínica médica, no tratamento da hipocalcemia, hiperpotassemia e nos transtornos do ritmo cardíaco, ocasionados por fármacos bloqueadores dos canais de cálcio (OGA,1998).

A estratégia desta pesquisa é fornecer ao organismo das aves intoxicadas pelo TOCP doses de gliconato de cálcio, antes da queda dos níveis deste íon no plasma, a fim de evitar o surgimento dos graves sinais da NRIOP, além de somar à este tratamento doses de PMSF, em diferentes tempos, a fim de observar se o PMSF, administrado juntamente com o gliconato de cálcio, teria algum efeito protetor contra esta grave neuropatia, tratamento este que não foi integrado na literatura atual.

2. OBJETIVO:

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um esquema de tratamento para intoxicações agudas por compostos organofosforados neuropáticos, utilizando como protótipo o TOCP, visando atenuar os graves efeitos da neuropatia retardada induzida por organofosforados (NRIOP).

2.1) Proposição:

- a) Monitorar a alteração do nível de cálcio no plasma, após intoxicação por TOCP em galinhas.
- b) Monitorar a queda da atividade da ESNp nos linfócitos das galinhas intoxicadas por TOCP.
- c) Administrar gliconato de cálcio, a fim de reverter a queda do cálcio no plasma das galinhas intoxicadas pelo TOCP.
- d) Administrar o PMSF às galinhas, concomitante com a administração do gliconato de cálcio, até 24 horas após a intoxicação pelo TOCP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1) Materiais:

3.1.1) Reagentes: dodecil sulfato de sódio (SDS); tris hidroximetil aminometano (Tris) *Sigma*; etilenodiamino tetra acetato de sódio (EDTA); dietil 4-nitrofenil fosfato (paraoxon); N,N'-diisopropilfosforamidofluridato (mipafós); fenilvalerato; triton X-100 *Baker*; 4-aminoantipirina; ferricianeto de potássio; Histopaque 1077 (Ficoll); Soro Albumina Bovina (BSA); tri-orto-cresil fosfato (TOCP) *Acros Organics*; ampolas de gliconato de cálcio Hypocálcio 10% (100 mg/mL - 10 mL) *Hypofarma*; flaconetes de água para injeção (10 mL) *Isofarma*; fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) *Acros Organics*; dimetil sulfóxido (DMSO); Liquemine (heparina) 25.000 UI / 5 mL *Roche*; cloreto de sódio; fosfato bibásico de sódio; citrato de sódio; tricloroetileno; acetona; lâ de vidro; dimetilformamida (DMF); Coomassie Brillante Blue G-250 *Acros Organics*; álcool etílico; ácido fosfórico; ácido clorídrico; Liquiform Kit para dosagem de cálcio no plasma *Labtest*.

3.1.2) Equipamentos: balança analítica, pH-metro, banho termostaticado, centrífuga simples e refrigerada, homogeneizador de tecidos (sonicador), espectrofotômetro UV/Visível equipado com peltier.

3.1.3) Animais: foram utilizadas galinhas "leghorn isabrown", pesando entre 1,5 e 2,5 Kg e com mais de 18 meses de idade. Antes de se iniciar os experimentos, as aves receberam tratamento para eliminação de ecto e endoparasitas. Contra ectoparasitas, todas as galinhas foram pulverizadas com 6 mL de K-Othrin[®] (deltametrina), diluído em 10 litros de água. Para eliminação de endoparasitas, foi utilizado 1 envelope de 28 g do anti-helmíntico Proverme[®] em pó (citrato de piperazina tetrahidratado, equivalente a 36% de piperazina base), que foi dissolvido em 10 litros de água, quantidade suficiente para ser distribuída em todas as gaiolas, no lugar da água de bebida das aves, por 48 horas.

3.2) Métodos:

3.2.1) Delineamento Experimental:

Foram utilizados diferentes grupos, n = 4 galinhas, mantidas em gaiolas com fundo removível para limpeza, no biotério do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia (PANT), com temperatura controlada em ± 23 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e água e ração à vontade, exceto 12 horas antes e 3 horas após as administrações dos compostos:

A) Grupo Controle: não recebeu nenhum produto → dados bioquímicos básicos. Padronizou-se a dosagem de proteína BSA, proteína e atividade da ESNp nos linfócitos.

B) Grupo Controle Positivo: administração de 500 mg/Kg de TOCP puro (98%), via oral → determinação dos parâmetros bioquímicos e observações dos escores de neurotoxicidade.

C) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 1: administração de 500 mg/Kg de TOCP, via oral + 5 mg/Kg de solução aquosa de gliconato de cálcio, via endovenosa, em diferentes tempos → tratamento da intoxicação e determinação de parâmetros bioquímicos e motores, comparados com o grupo controle positivo.

D) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 2: administração de 500 mg/Kg de TOCP + 5 mg/Kg de gliconato de cálcio + 90 mg/Kg de PMSF diluído em DMSO, via subcutânea, em diferentes tempos → integração dos tratamentos e observação dos efeitos, comparados com o grupo controle positivo.

Os volumes administrados através das vias oral, endovenosa e subcutânea foram sempre inferiores a 1 mL.

3.2.2) Observações de Neurotoxicidade:

Escala de Oliveira et al. (2002), para os escores clínicos das galinhas em teste de neurotoxicidade com o TOCP 500 mg/Kg :

0 = Normal, caminha sem problemas, apta a mover-se rapidamente ou pular.

1 = Apresenta alguma fraqueza nas pernas. Pode cambalear, mas ainda é capaz de manter-se em pé e andar.

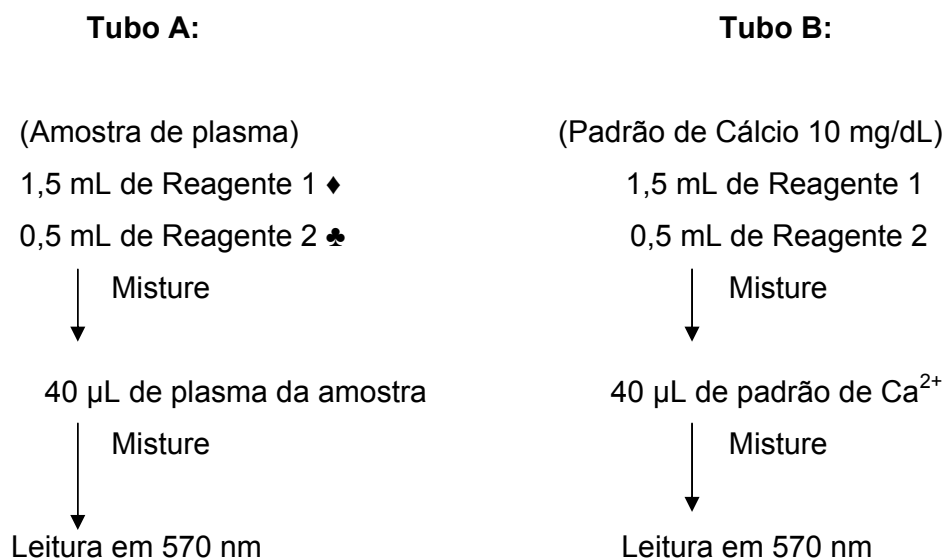
2 = Fraqueza nas duas pernas, ela já não consegue levantar-se.

3 = Paralisia – as pernas ficam esticadas na frente da galinha, mas ela ainda consegue apoiar-se nas asas, para ficar sentada.

4 = Moribunda – a galinha fica tombada para um lado, não conseguindo mais manter-se na vertical. Geralmente, ao atingir este nível a ave morre.

3.2.3) Dosagem de Cálcio no plasma:

Retirou-se 1 mL de sangue da veia da asa da galinha, com uma seringa de vidro de 1 mL, previamente heparinizada com 0,01 mL da solução de trabalho de heparina (25.000 UI / 5 mL, diluída 1:5 com solução salina 0,9%). Separou-se o plasma no tubo de ensaio, por centrifugação simples a 750 g, durante 5 minutos e seguiu-se o método de Baginski (1982), com o Kit Liquiform (Labtest) :

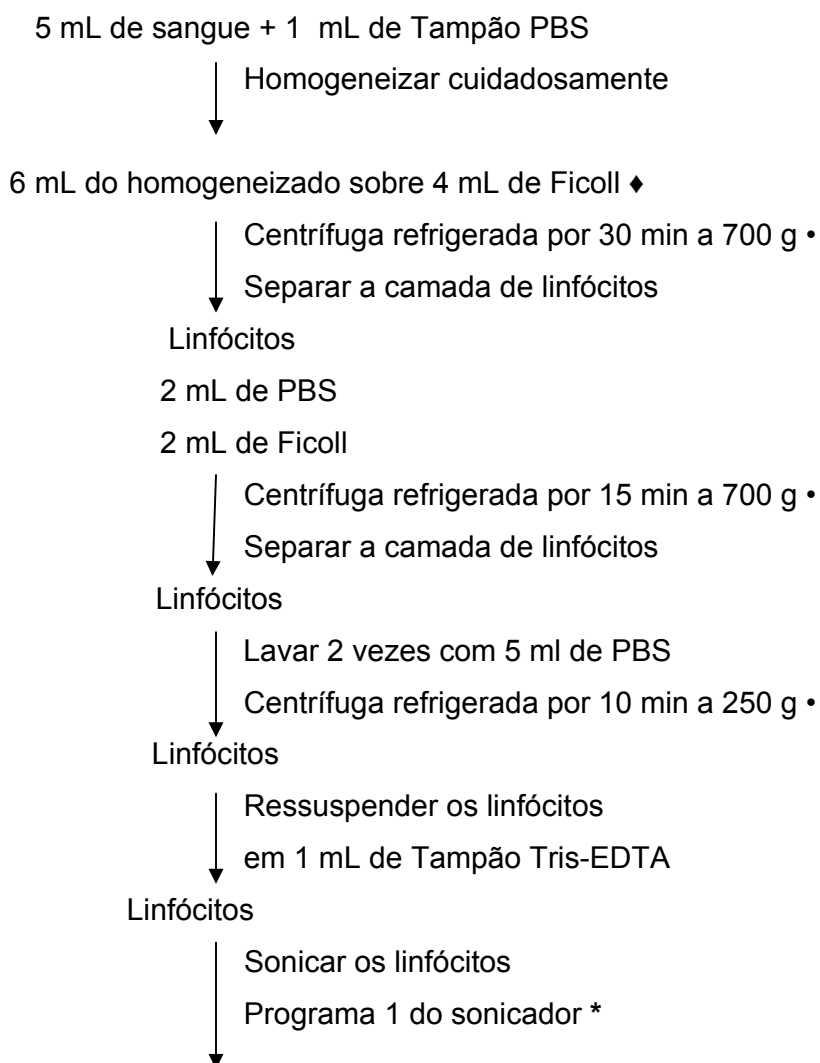


♦ Reagente 1 = tampão 920 mmol/L, pH 12, azida sódica 19 mmol/L.

♣ Reagente 2 = o-cresolftaleína complexona 320 µmol/L, 8-hidroxiquinoleína 13 mmol/L e ácido clorídrico 130 mmol/L.

3.2.4) Separação de Linfócitos:

Coletou-se 5 mL de sangue da veia jugular da galinha, em tubo heparinizado, com 0,1 ml da solução de trabalho de heparina (25.000 UI / 5 mL, diluída 1:5) e prosseguiu-se segundo o esquema abaixo:



Dosagem de proteínas dos linfócitos (Método Bradford, 1976).

Dosagem da ESNp (Método Correll e Ehrich, 1991).

* Programa 1 do sonicador: temperatura: 20 °C, amplitude: 20%, tempo: 8 s, pulso: 3,0 s com pausas de 0,5 s.

• Utilizar centrifuga refrigerada a 18°C ± 2; 700g = 1700 rpm.

♦ Retirar a alíquota de Ficoll da geladeira com antecedência, pois sua função é otimizada à temperatura ambiente e protegida da luz.

Preparar anteriormente as soluções estoques:

Tampão Tris-EDTA:

Pesar 6,06 g de tris hidroximetil aminometano (Tris) e 0,07g de etilenodiamino tetra acetato de sódio (EDTA). Adicionar 500 mL de água e colocar algumas gotas de HCl 6N até atingir pH 8,0 a 25°C. Completar para 1L com água destilada. Conservar em geladeira.

Tampão salina-fosfato (PBS):

Pesar 8,77g de cloreto de sódio e 21,30g de fosfato bibásico de sódio. Adicionar 500 mL de água e colocar algumas gotas de HCl 6N até atingir pH 7,2 a 25°C. Completar para 1L com água destilada. Conservar em geladeira.

3.2.5) Padronização para determinação de proteína:

<i>Ponto da curva</i>	<i>BSA (500 µg/mL)</i>	<i>Tampão Tris-EDTA</i>	<i>Solução de Brillante Blue</i>
1	10 µL (5 µg)	90 µL	4,9 mL
2	20 µL (10 µg)	80 µL	4,9 mL
3	50 µL (25 µg)	50 µL	4,9 mL
4	100 µL (50 µg)	----	4,9 mL

BSA=Soro Albumina Bovina.

Preparar anteriormente as soluções estoques:

Solução Padrão de Proteína (BSA 500 µg/mL):

Pesar 5,0mg de Soro Albumina Bovina (BSA) e dissolver em 10 mL de água destilada. Armazenar em vidro bem tampado, na geladeira.

Solução de Brillante Blue:

Pesar 100,0mg de Coomassie Brillante Blue G-250 e dissolver em 50 mL de álcool etílico 95%. Adicionar lentamente 100 mL de ácido fosfórico 85%, agitar bem e completar para 1 L com água destilada. Armazenar em vidro bem tampado, na geladeira.

3.2.6) Determinação de proteína em linfócitos de galinha:

	<i>BSA (500 µg/mL)</i>	<i>Linfócitos</i>	<i>Tampão Tris-EDTA</i>	<i>Solução de Brillante Blue</i>
Padrão (20 µg)	40 µL	-----	60 µL	4,9 mL
Amostra	-----	40 µL	60 µL	4,9 mL

Homogeneizar bem, aguardar 5 minutos e ler no espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.7) Determinação da atividade da ESNp em linfócitos de galinha:

A partir dos resultados obtidos na dosagem de proteínas dos linfócitos ressuspendidos e sonificados, realizou-se uma diluição dos linfócitos com tampão Tris-EDTA, para a obtenção de uma solução de concentração 500 µg de proteína/mL. Assim, todas as dosagens da ESNp foram realizadas com uma quantidade fixa de 500 µg de proteína. Desta solução, separou-se 1 mL para proceder como no método de Correll e Ehrich (1991), descrito a seguir:

Preparar anteriormente as soluções estoques:

Paraoxon (Inibidor da Acetilcolinesterase):

1 mL de paraoxon 90% solubilizado em 3 mL de tricloetileno. Adicionar 3 mL de solução de NaHCO_3 2%, preparada no momento do uso. Agitar bem para misturar as duas fases (aquosa e orgânica). Descartar a fase aquosa (de cima) e repetir a lavagem com o mesmo volume de NaHCO_3 2%. Separar as fases e levar a fase orgânica para um rotavapor, para evaporar o solvente. Após isto, medir 0,18 mL do paraoxon lavado e evaporado e completar num balão de 10 mL com acetona, já passada por um funil com lã de vidro, contendo pequena quantidade de sulfato de sódio anidro sobre a lã. Colocar a solução estoque em vidro bem tampado e armazenar na geladeira.

Tampão Citrato-Tris:

Pesar 1,47g de citrato de sódio e 0,60g de Tris. Adicionar 50 mL de água e colocar algumas gotas de HCl 6N até atingir pH 6,0 a 25°C. Completar para 100 mL com água destilada. Conservar em geladeira.

Mipafox (Inibidor da ESNp):

Pesar 180 mg de mipafox e diluir em 10 mL de tampão Citrato-Tris (pH 6,0). Armazenar em vidro bem tampado, na geladeira.

Fenilvalerato:

Pesar 150 mg de fenilvalerato e diluir em 10 mL de dimetilformamida (DMF). Armazenar em geladeira.

Triton X-100:

Adicionar 0,03 mL de Triton X-100 e completar o volume para 100 mL, com água destilada. Armazenar em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

4 AAP-SDS:

Pesar 0,02 g de 4-aminoantipirina (4 AAP) e 5,0 g de Dodecilsulfato de sódio (SDS) e completar para 100 mL com tampão Tris-EDTA (pH 8,0). Armazenar em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Ferricianeto de potássio ($K_3 Fe (CN)_6$):

Pesar 0,40 g de $K_3 Fe (CN)_6$ e diluir em 100 mL de água destilada.

Obs: Todas as soluções estoques mantêm-se boas para o uso por cerca de seis meses.

Tubo A:

1 mL de linfócitos
50 μ L de paraoxon
950 μ L de Tris-EDTA

↓ banho 37°C
20 min

2 mL de fenilvalerato

↓ banho 37°C
30 min

2 mL de 4 AAP-SDS
1 mL de $K_3 Fe (CN)_6$

↓ aguardar 15 min

Leitura a 490 nm

Tubo B:

1 mL de linfócitos •
50 μ L de paraoxon #
50 μ L de mipafox ♦
900 μ L de Tris-EDTA

↓ banho 37°C
20 min

2 mL de fenilvalerato ♠

↓ banho 37°C
30 min

2 mL de 4 AAP-SDS
1 mL de $K_3 Fe (CN)_6$

↓ 15 min

Leitura a 490 nm

• Diluir os linfócitos com tampão Tris-EDTA, conforme o resultado das proteínas.

No momento do uso:

Diluir a solução estoque de paraoxon com tampão Tris-EDTA (pH 8,0) na proporção 1:50.

♦ Diluir a solução estoque de mipafox com tampão Tris-EDTA (1:50).

♠ Diluir a solução estoque de fenilvalerato em Triton X-100 na proporção 1:30.

3.2.8) Cálculos para determinação da atividade da ESNp em linfócitos de galinha :

Diluiu-se os linfócitos das amostras, conforme o resultado da dosagem de proteína dos mesmos, para iniciar o experimento da dosagem da atividade da ESNp. Para o cálculo da atividade da ESNp, segundo Jonhson (1997), o coeficiente de extinção molar (ϵ) da reação do fenol com o 4-aminoantipirina e com o ferricianeto de potássio tem valor igual a 13900. Este valor foi utilizado na fórmula geral (Kaplan & Pesce, 1989) para o cálculo da atividade desta enzima, obtendo assim, a atividade média em unidades internacionais (UI/L) para cada ave, através da equação:

$$UI/L = A \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{V_{tr}}{V_a} \times 10^6 \times \frac{1}{T}, \text{ onde:}$$

A = diferenças das absorbâncias a 490 nm

ϵ = coeficiente de extinção molar

V_{tr} = volume total da reação

V_a = volume da amostra

T = tempo da reação

10^6 = fator de transformação de mol para μmol .

Diferença entre Amostras A_1 e B_1 : $1,00970 - 0,67518 = 0,33452$

Diferença entre Amostras A_2 e B_2 : $1,00840 - 0,67571 = 0,33269$

Média entre as diferenças: 0,33360

$U/L = 0,33605 \times 1/13900 \times 7/1 \times 10^6 \times 1/30$

$U/L = 2352350/417000 = 5,6411 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{Litro}$

$0,00564 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ ----- 500 μg de proteína

X ----- $10^6 \mu\text{g}$ de proteína

$X = 5640 / 500 = 11,28 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína = Atividade da ESNp.

3.2.9) Análise estatística dos resultados:

Diferenças nos parâmetros quantitativos, entre os grupos, foram examinadas para significância estatística utilizando-se o ANOVA, seguido do teste de Tukey. Valores de probabilidade de 5%, ou menos, foram considerados significantes.

Os dados dos grupos foram submetidos à análise nos programas ESTATISTIC 5.1 e GraphPad InStat 3.0, obtendo-se resultados significativos para cada grupo experimental, conforme apresentado a seguir.

Os escores de neurotoxicidade dos grupos tratados foram comparados com os escores do grupo controle positivo, através do teste de Kruskal-Wallis, conforme apresentado a seguir, com nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1) Grupo Controle:

Dosagem de proteína BSA, proteína nos linfócitos e determinação da atividade da ESNp em linfócitos de galinhas não intoxicadas.

O grupo controle não recebeu nenhum produto e foram coletados dados bioquímicos básicos. Os resultados são ilustrados nas figuras de 1 a 3 e apresentados nas tabelas de 1 a 3, indicando o número de amostras, sendo que para cada amostra fez-se duplicata.

Tabela 1. Dados obtidos para construção da curva padrão de proteína BSA:

<i>Amostras BSA *</i>	<i>Médias das absorbâncias</i>
1 (5 µg)	0,054 ± 0,006
2 (10 µg)	0,101 ± 0,008
3 (25 µg)	0,262 ± 0,006
4 (50 µg)	0,503 ± 0,004

* Cada ponto corresponde à média aritmética de duas determinações.

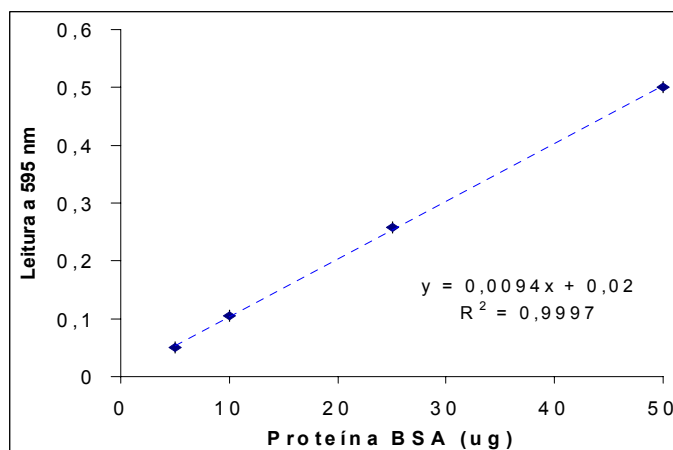


Figura 1. Dosagem de proteína BSA.

Tabela 2. Dosagem de proteína em linfócitos das galinhas do grupo controle :

<i>Amostras de linfócitos *</i>	<i>Proteína nos linfócitos (µg)</i>
1	56 ± 0,0088
2	57 ± 0,0123
3	57,5 ± 0,0064

* Cada ponto corresponde à média aritmética de duas determinações.

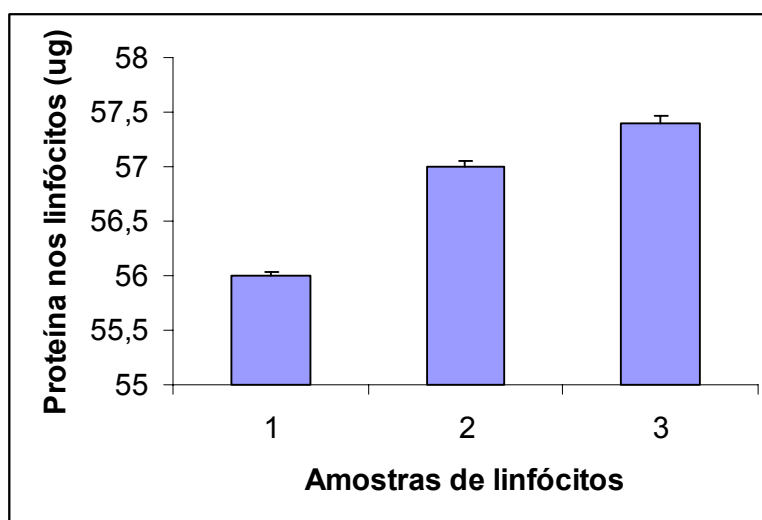


Figura 2. Dosagem de proteína em linfócitos das galinhas do grupo controle.

Tabela 3. Variação individual da atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos das galinhas do grupo controle :

Amostras	Atividade da ESNp
1	$7,00 \pm 0,43$
2	$7,58 \pm 0,41$
3	$10,26 \pm 0,52$
4	$11,34 \pm 0,80$
Média	$9,04 \pm 0,54$

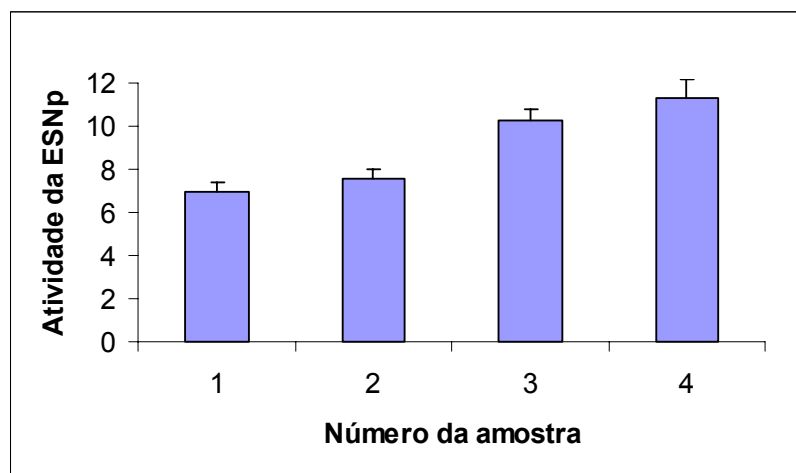


Figura 3. Variação da atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em amostras de linfócitos das galinhas do grupo controle. Cada ponto corresponde à média aritmética de duas determinações.

4.2) Grupo Controle Positivo:

Ao grupo controle positivo, administrou-se apenas 500 mg/Kg de TOCP, via oral, para determinação dos níveis de cálcio no plasma e observações dos escores de neurotoxicidade das aves.

Tabela 4. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas do grupo controle positivo:

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	16,65	14,02	10,74	8,7	14,63	10,27	10,16
g 2	14,55	14,82	11,4	10,3	16,04	15,03	10,32
g 3	16,19	15,9	12,37	10,4	16,82	15,59	11,02
g 4	15,79	14,53	9,5	9,22	10,22	14,38	12,57
média	15,8	14,81	*11	*9,66	14,42	13,82	*11,01
D.P. ±	0,9	0,79	1,2	0,83	2,92	2,42	1,34
P.Q.		6%	30%	39%	9%	13%	30%

D. P. = Desvio Padrão.

P. Q. = Porcentagem de queda do cálcio no plasma das galinhas, em relação ao tempo 0 hora.

* Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 hora, segundo o teste de Tukey.

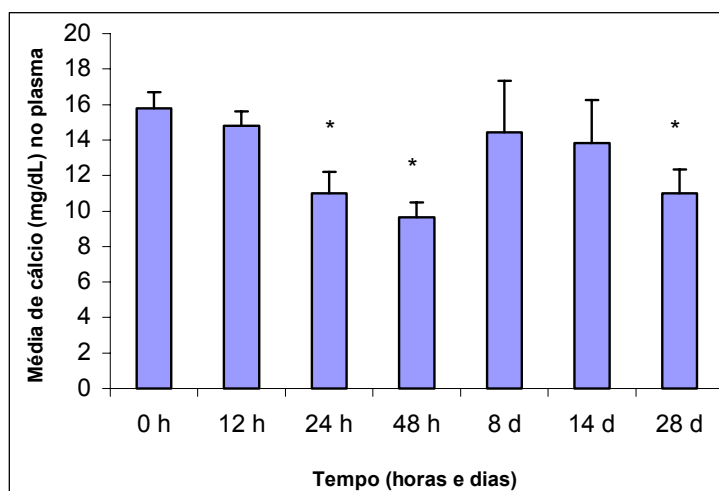


Figura 4. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves do grupo controle positivo. * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 5. Escores de neurotoxicidade das galinhas do grupo controle positivo, em função do tempo :

	10 dias	11 dias	14 dias	16 dias	21 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	0	1	1	1	2	2
g 2	0	1	1	1	2	2	2
g 3	0	0	1	4	4	4	4
g 4	0	0	1	2	2	2	2
soma	0	1	4	+8	+9	+10	+10

+Dados considerados significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

4.3) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 1:

Aos primeiros grupos experimentais administrou-se TOCP + gliconato de cálcio em diferentes tempos, para tratamento da intoxicação e observação de parâmetros bioquímicos e motores, comparados com o grupo controle positivo.

Grupo Experimental Fase 1 - Tratamento A:

Intoxicou-se 4 galinhas com 500 mg/Kg de TOCP via oral e concomitante e 12 horas depois, administrou-se duas doses de gliconato de cálcio 5 mg/Kg, via endovenosa, a fim de evitar a acentuada queda dos níveis de cálcio no plasma, provocada pelo TOCP. Coletou-se 5 mL de sangue da veia jugular e determinou-se a atividade da ESNp nos linfócitos destas aves. Os resultados estão apresentados nas tabelas 6, 7 e 8 e ilustrados nas figuras 5 e 6.

Tabela 6. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas após a intoxicação :

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	14,6	13,4	12,4	11,0	11,5	11,7	11,0
g 2	13,4	10,0	15,7	13,0	13,2	13,4	12,1
g 3	14,8	12,9	13,9	13,0	12,4	12,6	12,5
g 4	16,6	13,1	14,0	12,1	13,2	13,5	13,8
média	14,8	12,4	12,8	*12,2	*12,6	*12,8	*12,4
D.P. ±	1,32	1,58	1,34	0,95	0,8	0,84	1,16
P.Q.		16%	14%	18%	15%	14%	16%

* Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h; Anova seguido de Tukey.

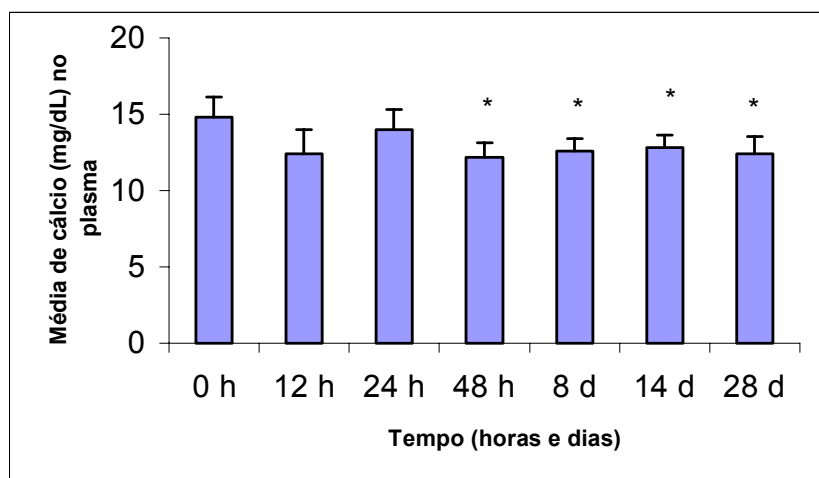


Figura 5. Médias de cálcio no plasma (mg/Kg) das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio (0 e 12 horas). * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 7. Escores de neurotoxicidade das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio 0 e 12 horas depois da intoxicação:

	10 dias	12 dias	14 dias	15 dias	21 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	1	1	1	2	2	2
g 2	0	0	0	1	1	1	1
g 3	0	0	0	1	1	1	1
g 4	0	1	1	1	1	1	1
soma	0	2	2	4	5	5	5

Dados considerados não significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8. Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos das aves intoxicadas pelo TOCP, que receberam tratamento com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas :

Tempo da dosagem	Atividade da ESNp	Porcentagem de queda da atividade da ESNp
0 hora	11,74 \pm 0,68	-----
12 horas	2,62 \pm 0,95	78 %
24 horas	3,52 \pm 0,71	70 %

n = 4 amostras de linfócitos, para cada tempo.

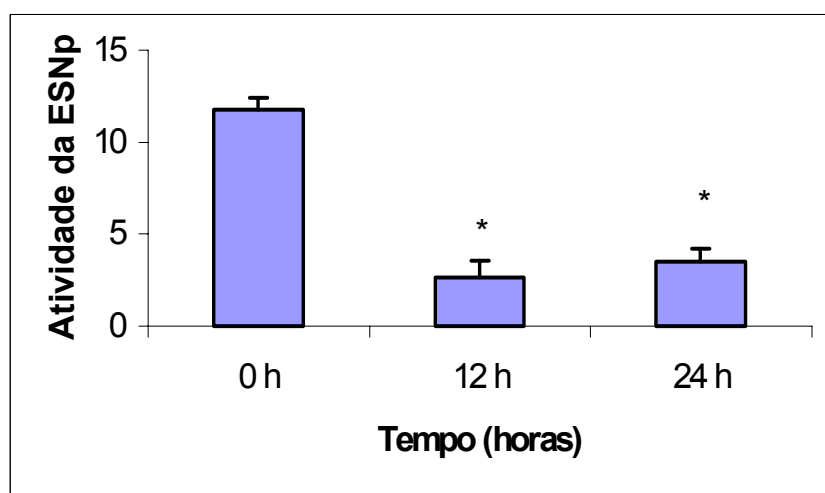


Figura 6. Atividade da ESNp em amostras de linfócitos das galinhas intoxicadas pelo TOCP e tratadas com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas. *Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Grupo Experimental Fase 1 - Tratamento B:

Intoxicou-se 4 galinhas com 500 mg/Kg de TOCP, via oral, e administrou-se duas doses de gliconato de cálcio 5 mg/Kg, via endovenosa, 12 e 24 horas depois. Os resultados são apresentados nas tabelas 9 e 10 e ilustrados na figura 7.

Tabela 9. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio 12 e 24 horas depois da intoxicação :

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	14,0	13,0	13,6	11,0	12,8	12,2	8,0
g 2	17,4	17,8	15,8	12,0	12,6	15,4	19,0
g 3	19,0	19,0	12,4	11,3	12,0	13,4	17,9
g 4	17,0	17,0	17,2	10,9	13,4	12,0	8,6
média	16,8	16,7	*14,8	*11,3	*12,7	*13,2	*13,4
D.P. ±	2,08	2,60	2,16	0,5	0,58	1,56	5,88
P.Q.		0,1%	12%	33%	24%	22%	20%

* Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h, segundo o teste de Tukey.

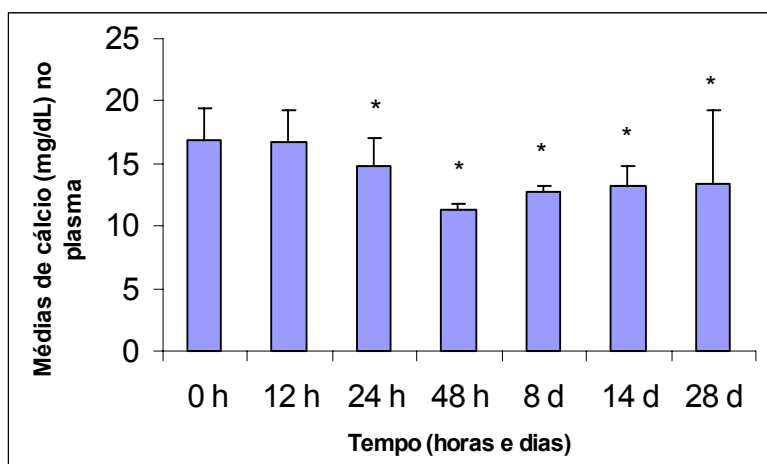


Figura 7. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP e gliconato de cálcio, 12 e 24 horas depois. * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 10. Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP e gliconato de cálcio, 12 e 24 horas após da intoxicação :

	13 dias	14 dias	15 dias	17 dias	21 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	1	1	1	1	2	2
g 2	0	1	1	1	1	1	1
g 3	0	0	1	1	1	1	1
g 4	0	1	1	2	2	2	2
soma	0	3	4	5	5	+6	+6

+Dados considerados significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

4.4) Grupos Experimentais - Tratamento Fase 2:

Aos Grupos Experimentais - Tratamento Fase 2 administrou-se TOCP + PMSF + gliconato de cálcio em diferentes tempos, para integração dos tratamentos e determinação dos níveis de cálcio no plasma e dos escores de neurotoxicidade, comparados com o grupo controle positivo.

Grupo Experimental Fase 2 - Tratamento A:

As 4 aves deste grupo foram intoxicadas com 500 mg/Kg de TOCP, via oral, concomitante com 90 mg/Kg de PMSF, via subcutânea e duas doses de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio, via endovenosa, nos tempos 0 e 12 horas após a intoxicação. Dosou-se o cálcio no plasma e observou-se a evolução dos escores de neurotoxicidade.

Tabela 11. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP concomitante com PMSF e também duas doses de gliconato de cálcio (0 e 12 horas) :

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	18,6	16,2	11,7	10,5	20,0	19,0	19,7
g 2	18,5	14,9	14,4	17,4	19,4	20,5	18,9
g 3	19,2	14,8	12,8	10,0	17,7	18,9	18,0
g 4	19,8	15,6	12,7	16,62	17,9	19,3	19,0
média	19,0	*15,4	*12,9	*13,4	18,8	19,4	18,9
D.P. ±	0,58	0,64	1,39	3,9	1,15	0,75	0,54
P.Q.		19%	32%	28%	2%	0%	0%

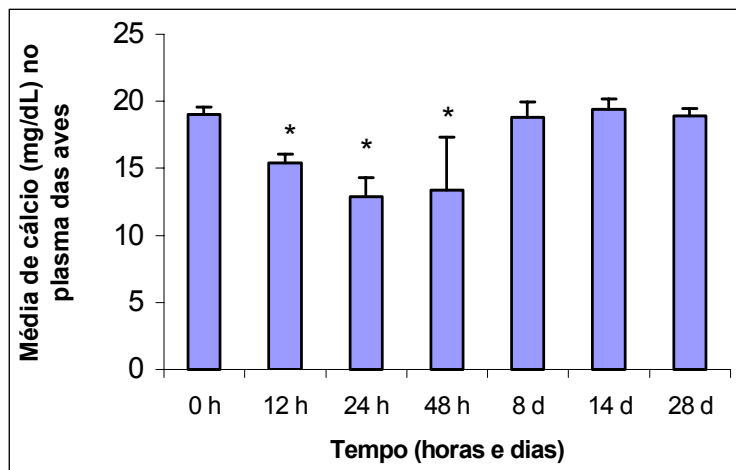


Figura 8. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP concomitante com PMSF e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas. * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 12. Escores de neurotoxicidade das galinhas que receberam TOCP concomitante com PMSF e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas :

	10 dias	13 dias	14 dias	15 dias	21 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	1	1	1	1	1	1
g 2	0	0	0	1	1	1	1
g 3	0	1	1	2	2	2	2
g 4	0	0	1	1	1	1	1
soma	0	2	3	5	5	5	5

Dados considerados não significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

Grupo Experimental Fase 2 - Tratamento B:

As aves deste grupo receberam 500 mg/Kg de TOCP, via oral, 90 mg/Kg de PMSF, via subcutânea 12 horas depois, além de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio, via endovenosa, nos tempos 12 e 24 horas após a intoxicação pelo TOCP. Dosou-se o cálcio no plasma das aves, retirando 1 mL de sangue da veia da asa. As tabelas 13 e 14 apresentam os resultados, ilustrados na figura 9. Em seguida, coletou-se 5 mL de sangue da veia jugular das aves tratadas e dosou-se a atividade da ESNp nos linfócitos destas aves nos tempos 0, 12 e 24 horas. A tabela 15 apresenta estes resultados, ilustrados na figura 9.

Tabela 13. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das galinhas que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e duas doses de gliconato de cálcio, nos tempos 12 e 24 horas após a intoxicação :

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	19,5	14,2	10,6	9,8	14,8	16,8	9,7
g 2	20,6	18,9	13,2	11,3	20,5	19,1	10,0
g 3	19,2	13,0	10,8	9,4	17,6	18,0	9,3
g 4	20,4	16,8	10,1	9,0	17,8	18,3	9,0
média	19,9	*15,7	*11,2	*9,8	17,6	*18,0	*9,5
D.P. ±	0,68	2,63	1,38	1,00	2,32	0,95	0,44
P.Q.		22%	44%	50%	12%	10%	50%

* Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h, segundo o teste de Tukey.

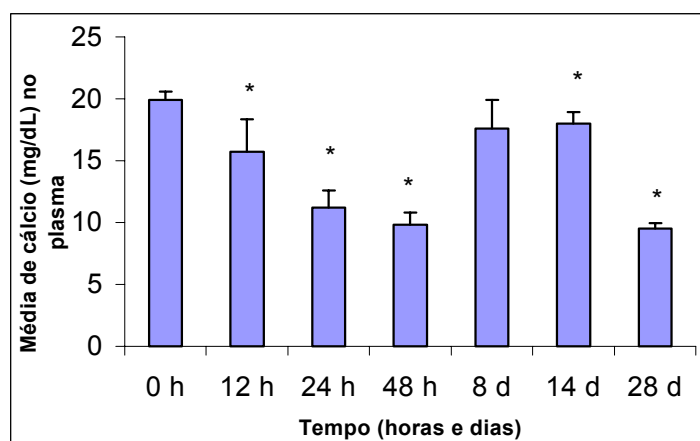


Figura 9. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e também gliconato de cálcio nos tempos 12 e 24 horas. *Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 14. Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP; PMSF 12 horas depois e gliconato de cálcio nos tempos 12 e 24 horas :

	8 dias	10 dias	14 dias	15 dias	17 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	1	1	1	1	1	1
g 2	0	1	1	1	2	2	2
g 3	0	1	1	2	2	2	2
g 4	0	0	1	1	1	2	2
soma	0	3	4	5	+6	+7	+7

+Dados considerados significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 15. Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em linfócitos de galinhas intoxicadas pelo TOCP, que receberam tratamento com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas, além de PMSF 12 horas após a intoxicação :

Tempo da dosagem	Atividade da ESNp	Porcentagem de queda da atividade da ESNp
0 hora	$8,10 \pm 0,70$	-----
12 horas	$2,15 \pm 0,88$	74 %
24 horas	$1,68 \pm 0,50$	80 %

n = 4 amostras de linfócitos, para cada tempo.

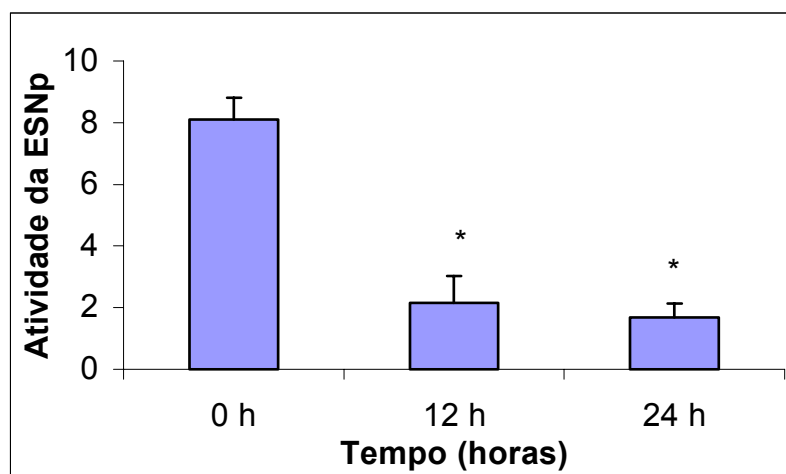


Figura 10. Atividade da ESNp ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína) em amostras de linfócitos das galinhas intoxicadas pelo TOCP e tratadas com gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas e PMSF 12 horas após a intoxicação. * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Grupo Experimental Fase 2 - Tratamento C:

Este grupo de 4 galinhas recebeu 500 mg/Kg de TOCP, via oral; 5 mg/Kg de gliconato de cálcio, via endovenosa nos tempos 0 e 12 horas e 90 mg/Kg de PMSF, via subcutânea, 6 horas após a administração do TOCP.

Tabela 16. Níveis de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP; PMSF 6 horas depois e duas doses de gliconato de cálcio, nos tempos 0 e 12 horas:

	0 hora	12 horas	24 horas	48 horas	8 dias	14 dias	28 dias
g 1	18,6	17,0	16,9	16,8	18,4	19,3	8,5
g 2	17,8	16,8	13,6	13,0	19,0	15,2	8,6
g 3	17,0	15,2	15,7	14,5	19,4	10,7	8,7
g 4	20,7	16,7	14,2	13,4	19,3	14,8	9,5
média	17,8	16,4	15,1	*14,4	19,0	15,0	*8,8
D.P. ±	0,77	0,82	2,33	2,88	0,45	3,51	0,45
P.Q.		8%	15%	20%	0%	16%	50%

* Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h, segundo o teste de Tukey.

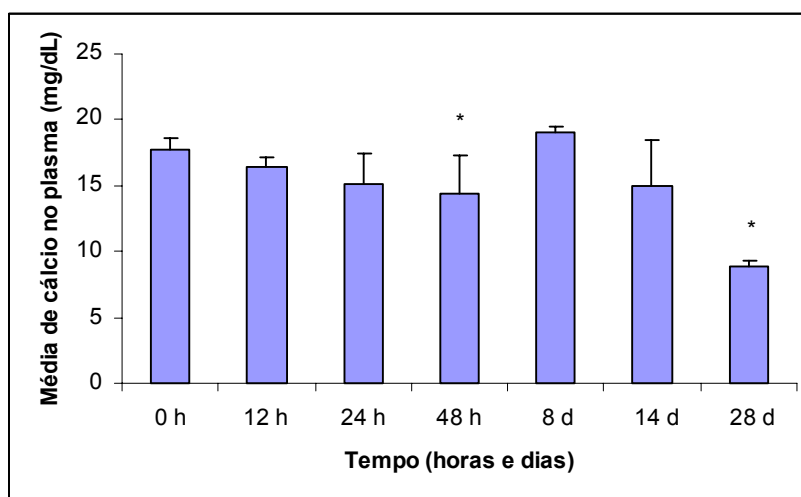


Figura 11. Médias de cálcio (mg/dL) no plasma das aves que receberam TOCP, PMSF 6 horas depois e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas, após a intoxicação. * Médias estatisticamente diferentes do tempo 0 h.

Tabela 17. Escores de neurotoxicidade das aves que receberam TOCP, PMSF 6 horas depois e gliconato de cálcio 0 e 12 horas após a intoxicação :

	8 dias	10 dias	13 dias	14 dias	17 dias	24 dias	28 dias
g 1	0	1	1	1	1	2	2
g 2	0	1	1	1	1	2	2
g 3	0	1	2	2	2	2	2
g 4	0	1	1	1	1	2	2
soma	0	4	5	5	5	+8	+8

+Dados considerados significantes, em relação ao escore 0, segundo teste de Kruskal-Wallis.

5. DISCUSSÃO:

O grupo controle positivo apresentou até o 28º dia após a administração do TOCP, uma queda significativa dos níveis de cálcio no plasma, em relação a 0 hora, como mostra a tabela 4 e ilustra a figura 4. Como pode-se observar na tabela 5, uma das aves deste grupo atingiu os escores de neurotoxicidade mais grave, durante os 28 dias de observação. Contudo, a tabela 4 demonstra um fato notado em praticamente todos os grupos estudados; uma intrigante elevação do cálcio no plasma no 8º dia, sendo que os escores de neurotoxicidade, geralmente, começam a surgir a partir do 12º dia.

Embora os escores de neurotoxicidade das aves em todos os grupos terem apresentarem evolução linear em função do tempo, isto não ocorreu com o cálcio plasmático. No grupo controle positivo observa-se um grande desbalanceamento dos níveis de cálcio, sendo que no 8º e 14º dias, estes níveis apresentaram um aumento paradoxal, justamente nos dias em que os escores começam a avançar; o cálcio volta a cair no 28º dia, em que as aves apresentam os escores máximos da neuropatia. Ainda não temos uma explicação plausível para este fato, o que demonstra a necessidade de mais estudos para a elucidação do mecanismo desta intoxicação. No entanto, estes resultados sugerem que este aumento do cálcio no plasma das aves no 8º dia pode ser um mecanismo de defesa do organismo, retirando cálcio do meio intracelular e aumentando a concentração deste íon no plasma, como uma forma de combater os danos motores da neuropatia.

A seguir, no grupo experimental fase 1 - tratamento A, as galinhas receberam TOCP e gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas depois da intoxicação. Os resultados demonstraram que a atividade da ESNp no tempo 12 horas havia caído 78%, em relação ao tempo 0 hora e que no tempo 24 horas esta atividade apresentou uma queda menor, de 70%. Isto sugere que a administração destas doses de gliconato de cálcio, podem ter influência na recuperação da atividade da ESNp, depois da intoxicação pelo TOCP, o que ilustra a figura 6. Oliveira et al. (2002),

demonstraram que 24 horas após a administração de 500 mg/Kg de TOCP, via oral, mais de 80% da ESNp estava inibida.

Para este grupo experimental acima citado, que recebeu TOCP e gliconato de cálcio, nos tempos 0 e 12 horas, observa-se na tabela 6 uma menor queda dos níveis de cálcio em todos os tempos, com média de 15,3%, se comparado ao grupo controle positivo, e também uma queda mais linear, ilustrada na figura 7. Segundo a tabela 7, os escores de neurotoxicidade deste grupo foram significativamente menores que aqueles apresentados pelo grupo controle positivo. Apenas uma ave atingiu o nível 2 e as outras três aves permaneceram no nível 1, com uma soma final de 5, a metade da soma do grupo controle positivo, sendo estes resultados considerados pelo teste de Kruskal-Wallis, não significativos em relação ao escore 0.

Isto demonstra que a administração de 5 mg/Kg gliconato de cálcio, concomitante com o TOCP e 12 horas depois, foi efetiva na prevenção do avanço dos escores de neurotoxicidade das aves e também evitou grandes quedas do cálcio no plasma. Piao et al., (2003) administrou 3 mg/Kg de gliconato de cálcio, via subcutânea, à galinhas intoxicadas pelo TOCP e relatou bons resultados em evitar os escores de neurotoxicidade mais graves da NRIOP.

O grupo experimental fase 1 - tratamento B, que recebeu TOCP e gliconato de cálcio, nos tempos 12 e 24 horas apresentou uma queda nos níveis de cálcio mais acentuada a partir de 48 horas, em relação ao grupo anterior, conforme apresenta a tabela 9 e ilustra a figura 7. Desta forma, este grupo apresentou um maior desbalanceamento do íon cálcio no plasma. Pode-se observar na tabela 9, que os escores de neurotoxicidade avançaram mais do que no grupo anterior, somando 6, sendo, porém, estes resultados melhores que os do grupo controle positivo, apesar destes resultados terem sido considerados estatisticamente diferentes do escore 0. Contudo, os resultados obtidos nestes dois grupos da fase 1, confirmam que as duas doses de gliconato de cálcio foram efetivas na prevenção dos escores mais severos da neuropatia, tanto sendo administradas nos tempos 0 e 12 horas, como 12 e 24 horas depois da intoxicação pelo TOCP.

A administração de duas doses de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio, em diferentes tempos, não apresentou nenhum efeito colateral, além de ter apresentado efeito terapêutico. Assim, estas duas doses de 5 mg/Kg de gliconato, tornaram-se o tratamento de escolha.

A seguir, realizou-se a integração dos tratamentos: TOCP + gliconato de cálcio + PMSF, denominada fase 2. A administração subcutânea de 90 mg/Kg de PMSF, não causou alterações na pele das aves. O solvente utilizado do PMSF, DMSO, foi previamente injetado puro e também não demonstrou toxicidade local na pele das aves.

O grupo experimental fase 2 - tratamento A, recebeu TOCP, gliconato de cálcio 0 e 12 horas e PMSF 0 hora. Observou-se uma maior queda do cálcio no plasma, em relação aos grupos tratados apenas com gliconato de cálcio, o que apresenta a tabela 11 e ilustra a figura 8. Os escores de neurotoxicidade ainda foram melhores que os do grupo controle positivo, inclusive idênticos aos apresentados pelo grupo que recebeu gliconato de cálcio 0 e 12 horas depois do TOCP, o que demonstra a tabela 12. Isto sugere que a administração de PMSF concomitante com o TOCP, não agravou a queda do cálcio no plasma, nem causou os escores de neurotoxicidade mais graves nas aves.

No grupo experimental fase 2 - Tratamento B, em que administrou-se gliconato de cálcio 12 e 24 horas e PMSF 12 horas depois do TOCP, a queda do cálcio no plasma foi significativamente maior do que nos demais grupos tratados, o que é apresentado na tabela 13. Houve um grande desbalanceamento do cálcio no plasma, ilustrado na figura 9. Os escores de neurotoxicidade também avançaram mais do que os escores dos demais grupos tratados, o que pode ser observado na tabela 14, sugerindo que a administração de PMSF 12 horas após o TOCP, agravou a NRIOP nas aves. Em seguida, dosou-se a atividade da ESNp nos linfócitos nos tempos 0, 12 e 24 horas. A tabela 15 demonstra que a atividade desta enzima no tempo 12 horas estava 74% menor do que no tempo 0 hora e 24 horas depois já estava inibida em 80%. Isto sugere que a administração do PMSF 12 horas após o TOCP, pode ter

levado à uma queda ainda maior da atividade da ESNp, apesar do tratamento com o gliconato de cálcio, o que ilustra a figura 10.

Os resultados obtidos demonstram também que é muito importante a administração do gliconato de cálcio concomitante com o TOCP, para que seja evitado o avanço dos escores de neurotoxicidade, bem como acentuadas quedas do cálcio no plasma, visto que o grupo que recebeu gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas, apresentou melhores resultados do que o grupo que recebeu gliconato nos tempos 12 e 24 horas. Neste último grupo, a queda de cálcio no plasma foi maior, assim como os escores das aves apresentaram-se mais graves, conforme as tabelas 6 e 7, comparadas com as tabelas 9 e 10.

Notou-se também, que as aves que se mantiveram até o 28º dia com os escores 1 e 2 apresentaram uma queda significativa do cálcio no plasma, contudo, isto não provocou o avanço dos escores. Porém, as aves que atingiram os escores 3 e 4 apresentaram uma queda mais acentuada e contínua do cálcio no plasma até o 28º dia; no entanto, também com pequenas elevações deste íon no plasma analisado no 8º dia.

Com a finalidade de melhorar os resultados obtidos no grupo anterior, para o grupo experimental fase 2 - tratamento C, administrou-se o PMSF antes das 12 horas decorridas da intoxicação pelo TOCP. Administrou-se gliconato de cálcio 0 e 12 horas e PMSF 6 horas depois da intoxicação. De fato, este último grupo demonstrou que quanto antes o PMSF é administrado, é amenizado o desbalanceamento do cálcio no plasma, o que é apresentado na tabela 16. Na figura 11, observa-se que apenas as médias de cálcio no plasma nos tempos 48 horas e 28 dias são estatisticamente diferentes do tempo 0 hora. Contudo, a tabela 17 demonstra que os escores deste grupo apresentaram-se mais graves do que os do grupo anterior, apesar de o PMSF ter sido administrado 6 horas antes. Isto não era esperado e ainda não temos explicações precisas para este fato, necessitando-se realizar outros experimentos para isto.

Peraica et al. (1995) e Carrington e Abou-Donia (1988), demonstraram que o PMSF é uma substância que pode evitar o surgimento da NRIOP, quando administrada 24 horas antes do TOCP, ou pode agir como promotora dos efeitos mais graves desta neuropatia, em galinhas, se administrada 24 horas depois do TOCP. Lotti et al. (1993) também demonstrou que o PMSF quando administrado após o TOCP, pode funcionar como um promotor da NRIOP. Quando os tratamentos foram integrados e o gliconato de cálcio foi administrado juntamente com o PMSF, observou-se que realmente o fator tempo é essencial para um eficaz tratamento da NRIOP e os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que este efeito promotor da neuropatia, apresentado pela administração do PMSF após o TOCP, pode estar relacionado ao maior nível de inibição da atividade da ESNp, provavelmente ocasionada pelo PMSF, conforme ilustra a figura 10, visto que com o tratamento apenas à base de gliconato de cálcio esta inibição mais grave na atividade da ESNP não ocorreu, conforme ilustrado na figura 6.

O presente trabalho também demonstra que a ação do PMSF é preventiva ou promotora da NRIOP, de acordo com o tempo em que for administrado, após a intoxicação pelo TOCP (PERAICA et al., 1995; CARRINGTON e ABOU-DONIA, 1988).

Se for administrado concomitante com TOCP e acompanhado do gliconato de cálcio, não agrava os escores, conforme apresentado na tabela 11. Porém, se o PMSF for administrado 12 horas depois do TOCP, mesmo juntamente com o gliconato de cálcio, o PMSF causa uma piora significativa no quadro clínico, o que demonstra a tabela 13 e ilustra a figura 9. No entanto, a tabela 14 apresenta para este grupo uma soma final de 7 e a tabela 17, do grupo que recebeu PMSF 6 horas depois do TOCP, apresenta uma soma final 8, com todas as aves atingindo o escore 2. Apesar disto, a figura 11 demonstra que este último grupo não teve uma queda de cálcio no plasma tão grave como a do grupo que recebeu o PMSF 12 horas depois do TOCP, o que ilustra a figura 10. Isto sugere que os escores clínicos podem apresentar-se segundo um outro mecanismo bioquímico independente, que pode ser justamente a maior inibição da atividade da ESNp, provocada pelo PMSF, segundo hipótese discutida acima, e não somente a queda do cálcio no plasma, pois o grupo com queda maior do cálcio no plasma apresentou escores menores.

Com a realização deste trabalho, conseguiu-se resultados animadores com a administração das doses de 5 mg/Kg de gliconato de cálcio às aves com intoxicação aguda pelo TOCP, diminuindo significativamente os escores de neurotoxicidade nas aves tratadas, em relação ao grupo controle positivo, conseguindo-se também menor queda dos níveis de cálcio no plasma das aves, em função do tempo, evitando o desbalanceamento deste íon, observado no grupo controle positivo.

Para evitar o desbalanceamento do cálcio no plasma e amenizar os escores clínicos de neurotoxicidade de forma eficiente, o gliconato de cálcio deve ser administrado o mais rapidamente possível, após a intoxicação pelo organofosforado neuropático, devendo ser a primeira dose administrada dentro das 12 horas seguintes à intoxicação.

Godinho et al. (2002) demonstraram que a adição de 1% de gliconato de cálcio na água de bebida de ratos, durante 3 dias, aumentou significativamente a atividade locomotora e exploratória dos mesmos, além de aumentar os níveis de cálcio no soro, em relação ao grupo controle, que não recebeu gliconato de cálcio. Isto evidencia a eficácia do gliconato de cálcio em aumentar o aporte deste íon para o organismo, além do papel promotor da contração do músculo esquelético, exercida por este medicamento; que foi empregado no presente trabalho para amenizar os efeitos de perda da locomoção e queda do íon cálcio no plasma, causados pelo TOCP.

6. CONCLUSÃO :

Concluiu-se, quanto à integração dos tratamentos, comparando-se com o grupo controle positivo, que os melhores resultados foram obtidos no grupo que recebeu gliconato de cálcio nos tempos 0 e 12 horas e PMSF 0 hora e no grupo para o qual administrou-se somente gliconato de cálcio 0 e 12 horas, após a intoxicação pelo TOCP, visto que os resultados destes grupos foram muito semelhantes, inclusive com escores idênticos até o final dos experimentos.

O PMSF não deve ser administrado após a intoxicação pelo TOCP, porque se este for administrado 6 horas após a intoxicação, o melhor é administrar somente gliconato de cálcio, pois concluiu-se, segundo os resultados do presente trabalho, que a NRIOP se desenvolverá de forma ainda mais grave do que se fosse causada apenas pelo TOCP.

Desta forma, com este trabalho, conseguiu-se alcançar os objetivos propostos de maneira muito satisfatória e reprodutível no tratamento em humanos, com resultados promissores para serem utilizados na clínica médica toxicológica de emergência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABOU-DONIA M.B.; LAPADULA, D.M. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: Type I and Type II. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** n. 30. p. 405-440. 1990.

ABOU-DONIA, M.B.; SUWITA, E.; NOMEIR, A.A. Absorption, distribution, and elimination of a single oral dose of [14C] tri-o-cresyl phosphate in hens. **Toxicol.** v. 61. n. 1. p. 13-25. 1990.

BAGINSKI, E.S.; MARIE, S.S.; ALCOCK, N.W.; et al. Calcium in biological fluids. In: FAULKNER, W.R.; MEITES, S. (Eds.). **Selected Methods of Clinical Chemistry.** Washington DC: American Association for Clinical Chemistry Press. v. 9. p. 125-129. 1982.

BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. **Adv. Clin. Chem.** v. 38, p. 151-216. 2004.

BARRET, D.S.; OEHME, F.W.; KRUCKENBERG, S.M. A review of organophosphorus ester induced delayed neurotoxicity. **Vet. Hum. Toxicol.** v. 27, p. 22-37. 1985.

BEDRIKOW, B.; CAMPANA, C. L.; MOUSSALLI, L. Estudo de uma epidemia de intoxicação por tri-orto-cresil fosfato (TOCP). **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional.** v. 46. n. 12. p. 49-52. Abr.-Jun. 1984.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Clínica de Pequenos Animais.** São Paulo: Sauders. p-260-266. 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantity of protein utilizing the principle of Protein-Dyie Binding. **Anal. Chem.** v. 72. p. 248-54. 1976.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª edição. Editora Tecmedd. 2006. 1.848 p.

CAIRES, S.M.; CASTRO, J.G.D. Levantamento dos agrotóxicos usados por produtores rurais do município de Alta Floresta-Mato Grosso. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 2. n. 1. 2º semestre. 2002.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Editora Artmed. 2003. 256 p.

CARRINGTON, C.D. Prophylaxis and the mechanism for the initiation of organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity. **Arch. Toxicol.** v. 63. n. 3. p. 165-72. 1989.

CARRINGTON, C.D.; ABOU-DONIA, M.B. Triphenyl phosphite neurotoxicity in the hen: inhibition of neurotoxic esterase and of prophylaxis by phenylmethylsulfonyl fluoride. **Arch. Toxicol.** v. 62. n. 5. p. 375-80. 1988.

CARRINGTON, C.D.; ABOU-DONIA, M.B. The time course of protection from delayed neurotoxicity induced by tri-o-cresyl phosphate and O,O-diisopropylphosphorofluoridate by phenylmethylsulfonyl fluoride in chickens. **Toxicol. Lett.** v. 18. n. 3. p. 251-6. 1983.

CARRINGTON, C.D.; BROWN, H.R.; ABOU-DONIA, M.B. Histopathological assessment of triphenyl phosphite neurotoxicity in the hen. **Neurotoxicol.** v. 9. n. 2. p. 223-33. 1988.

CASARETT, L.J.; AMDUR, M.O.; KLAASSEN, C.D.; DOULL, J. **Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 5ª edição. Nova York: Mcgraw-Hill. 1996. 1.110 p.

CAVANAGH, J.B. Peripheral neuropathy caused by chemical agents. **Crit. Rev. Toxic.** v. 2. n. 3. 1973.

CETESB SÃO PAULO. **Consolidação do Inventário de Fontes (Incluindo os Municipais) e de Locais de Tratamento e Disposição Final de Resíduos Sólidos.** São Paulo – S.P. Governo do Estado de São Paulo. 1997.

COSTA, L.G. Differential alterations of cholinergic muscarinic receptors during chronic and acute tolerance of organophosphorus insecticides. **Biochem. Pharmacol.** n. 31. 1982.

CORRELL, L.; EHRICH, M. A microassay method for neurotoxic esterase determinations. **Fundam. Appl. Toxicol.** v. 16. p. 110-16. 1991.

DAVIES, D.R. Relationship between chemical structure and neurotoxicity of alkylorganophosphorous compounds. **Br. J. Pharmacol.** v. 15. p. 171-178. 1960.

De MATTEIS, F.; LOCK, E.A. **Seletivity and molecular mechanisms of toxicity.** New York: Macmillan Publishing Company. 1987.

DUDEK, B.R.; RICHARDSON, R.J. Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. **Biochem. Pharmacol.** v. 31. n. 6. p. 1117-21. 1982.

ECOBICHON, D.J. Toxic effects of pesticides. In: CASARETT et al. (Eds.). **Toxicology: The Basic Science of Poisons.** 4ª edição. Nova York: Macmillan. p. 565-622. 1991.

EL-FAWAL, H.A.N.; JORTNER, B.S.; EHRICH, M. Effect of verapamil on organophosphorus-induced delayed neuropathy in hens. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 97. n. 3. p. 500-11. 1989.

EL-FAWAL, H.A.N.; CORRELL, L.; GAY, L.; EHRICH, M. Protease activity in brain, nerve and muscle of hens given neurophathy-inducing organophosphates and a calcium channel blocker. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 103. n. 1. p. 133-42. 1990.

EPA - Environmental Protection Agency. **Code of Federal Regulations**. U.S.A. 40 CFR. p. 704-799. 1992.

GALLO, M.A.; LAWRIK, N.J. Organic phosphorus pesticides. In: HAYES, J.W.; LAWES, E.R. (Eds.). **Handbook of Pesticides Toxicology**. v. 2. U.S.A. San Diego, Ca: Academic Press. 1990.

GHERSON, S.; SHAW, F.H. Psychiatric sequelae of chronic exposure to organophosphate insecticides. **The Lancet**. v.1. n. 1371. 1961.

GODINHO, A.F.; TROMBINI, T.V.; OLIVEIRA, E.C. Effects of elevated calcium on motor and exploratory activities of rats. **Brazil. J. of Med. Biologic. Rev.** v. 35. p. 451-457. 2002.

GOLDSTEIN, D.A.; McGUIGAN, M.A.; RIPLEY, B.D. Acute tricresylphosphate intoxication in childhood. **Human. Toxicol.** n. 7. p.179-82. 1988.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 9ª edição, p. 67-90. 1997.

HERNANDEZ, A.F.; PLA, A.; VILLANUEVA, E. Decrease of phosphofructokinase activity in relation to the pathogenesis of tri-ortho-cresyl phosphate-induced delayed neuropathy. **Rev. Esp. Fisiol.** v. 48. n. 3. p. 139-46. 1992.

HODGSON, J.R.; PHILIPOT, R.M. (Eds.). **Rev. in Biochem. Toxicol.** v. 4. p. 141-212. 1982.

HOLMSTEDT, B. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. **Pharmacol. Rev.** n. 11. 1959.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Síntese de Indicadores Sociais**. Brasília – D.F. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. nº 12. 2004.

JOHNSON, M.K., BARNES, J.M. Age and the sensitivity of chicks to the delayed neurotoxic effects on some organophosphorus compounds. **Biochem. Pharmacol.** n. 19. p. 3045-3047. 1970.

JOHNSON, M.K. The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters. **J. Neurochem.** v. 23. p. 785-789. 1974.

JOHNSON, M.K. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of hen brain neurotoxic esterase. **Biochem. Pharmacol.** v. 24, p. 797-805. 1975.

JOHNSON, M.K. The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: Mechanism and challenge. **Crit. Rev. Toxicol.** n. 3. p. 289-316. 1975.

JOHNSON, M.K. The target site for the initiation of delayed neurotoxicity by organophosphorous esters: biochemical studies and toxicological applications. In: HODGSON, J.R.; PHILIPOT, R.M. (Eds.). **Rev. in Biochem. Toxicol.** v. 4. p. 141-212. 1982.

JOHNSON, M.K. Organophosphates and delayed neuropathy: Is NTE alive and well? **Toxicol. Appl. Pharmacol.** n. 102. p. 355-399. 1990.

KOROLKOVAS, A. **Química Farmacêutica.** 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1988. 792 p.

LARINI, L. **Toxicologia dos Praguicidas.** 1ª edição. São Paulo: Manole. 1999. 230 p.

LARINI, L. **Toxicologia.** São Paulo: Editora Manole. 1997. 302 p.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica.** São Paulo: Sarvier. 3ª edição. p. 180-188 / 327-357. 2002.

LIMA, D.R. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. 1ª edição. Editora Guanabara Koogan. 2004. 2.240 p.

LITTER, M. **Farmacología Experimental y Clínica**. 6ª ed. España. Madrid: El Ateneo. 1980. 207 p.

LOTTI, M.; BECKER, C.E.; AMINOFF, M.J. Organophosphate polyneuropathy: Pathogenesis and prevention. **Neurol.** n. 34. p. 658-62. 1984.

LOTTI, M.; MORETTO A.; CAPODICASA, E.; BERTOLAZZI, M.; PERAICA, M; SCAPELLATO, M.L. Interactions between neuropathy target esterase and its inhibitors and the development of polyneuropathy. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** n. 122 p. 165-71. 1993.

LUTRELL, W.E.; OLAJOS, E.J.; PLEBAN, P.A. Change in hen sciatic nerve calcium after a single oral dose of tri-*o*-toluyl phosphate. **Environ. Res.** n. 60. p. 290-94. 1993.

MAKHAEVA G.F.; SIGOLAEVA, L.V.; ZHURAVLEVA, L.V.; EREMENKO, A.V.; KUROCHKIN, I.N.; MALYGIN, V.V.; RICHARDSON, R.J. Biosensor detection of neuropathy target esterase in whole blood as a biomaker of exposure to neuropathic organophosphorus compounds. **J. Toxicol. Environ. Health A.** v. 66. n. 7. p. 599-610. 2003.

MARINO, M.P.; PLACEK, D.G. Phosphate Esters. In: BOOSER, E.R (Ed.). **CRC Handbook of Lubrication and Tribology**. Boca Raton: CRC Press, Inc. v. 3. 1994. 372 p.

MARONI, M.; BLEECKER, M.L. Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. **J. Appl. Toxicol.** n. 6. p. 1-7. 1986.

MASSICOTE, C.; INZANA, K.D.; EHRICH, M.; JORTNER, B.S. Neuropathologic effects of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) – induced, promotion and protection in

organophosphorus ester-induced delayed neuropathy (OPIDN) in hens. **Neurotoxicol.** v. 20. n. 5. p. 749-59. 1999.

MISRA, U.K.; NAG, D.; BHUSHNAN, V.; RAY, P.K. Clinical and biochemical changes in chronically exposed organophosphates workers. **Elsev. Scien. Publi. B.V.** Índia. Nova Déli: Uttar Pradesh. 1985.

MIYASHIRO, K.; HAUACHE, O.M. Mutações do Gene do Receptor Sensível ao Cálcio Extracelular e Suas Doenças Associadas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46. n. 4. p. 412-18. 2002.

MORETTO, A.; CAPODICASA, E.; LOTTI, M. Clinical expression of organophosphate-induced delayed polyneuropathy in rats. **Toxicol. Lett.** v. 63. n. 1. p. 97-102. 1992.

MORETTO, A.; CAPODICASA, E.; PERAICA, M.; RICHARDSON, R.J.; SCAPELLATO, M.L.; LOTTI, M. Phenylmethanesulfonyl fluoride elicits and intensifies the clinical expression of neuropathic insults. **Arch. Toxicol.** v. 66. n. 1. p. 67-72. 1992.

MORETTO, A.; CAPODICASA, E.; PERAICA, M.; LOTTI, M. Phenylmethanesulfonyl fluoride delays the recovery from chush of peripheral nerves in hens. **Chem.-Biol. Interact.** v. 87. n. 1-3. p. 457-62. 1993.

NANDA, S.; TAPASWI, P.K. Biochemical, neuropathological and behavioral studies in hens induced by acute exposure of tri-ortho-cresyl phosphate. **Int. J. Neurosci.** v. 82. n. 3-4. p. 243-54. 1995.

NOMEIR, A.A.; ABOU-DONIA, M.B. Disposition of [14C] tri-o-cresyl phosphate and its metabolites in various tissues of the male cat following a single dermal application. **Drug Metab. Dispos.** v. 12. n. 6. p. 705-11. 1984.

OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Guia Zanini-Oga de Interações Medicamentosas**. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2002. 390 p.

OGA, S.; BASILE, A.C.; CARVALHO, M.F. **Guia Zanini-Oga de Interações Medicamentosas**. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 2002. 390 p.

OGA, S. **Guia de Medicamentos Zanini-Oga**. 2ª edição. São Roque: IPEX. p. 517-518. 1997/1998.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu. 1996. 516 p.

OHLWEILER, O.A. **Fundamentos de Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. p. 63-110. 1981.

OLIVEIRA, G.H.; MOREIRA, V.; GOES, S.P.R. Organophosphate induced delayed neuropathy in genetically dissimilar chickens: studies with tri-*ortho*-cresyl-phosphate (TOCP) and trichlorfon. **Toxicol. Lett.** v. 136. p. 143-150. 2002.

PADILLA, S.; VERONESI, B. The relationship between neurological damage and neurotoxic esterase inhibition in rats acutely exposed to tri-*ortho*-cresyl phosphate. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** n. 78.p. 78-87. 1985.

PERAICA, M.; MORETTO, A.; LOTTI, M. Selective promotion by phenylmethanesulfonyl fluoride of peripheral and spinal cord neuropathies initiated by diisopropylfluorophosphate in the hen. **Toxicol. Lett.** v. 80. n. 1/3. p. 115-21. oct. 1995.

PIAO, F.; XIE, X.; YAMAMOTO, H.; KITABAKE, M. Effect of phenylmethylsulfonyl fluoride administration prior to and following leptophos administration on electrolyte concentration and enzyme activity in hen serum. **Environ. Health Prev. Med.** v. 1. p. 44-50. 1996.

PIAO, F.; YAMAUCH, T.; MA, N. The effect of Calcol[®] as calcium tonic on delayed neurotoxicity induced by organophosphorus compounds. **Toxicol. Lett.** v. 143. n. 1. p. 65-71. june. 2003.

PIRES, D.X.; CALDAS, E.D.; RECENA, M.C.P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cad. de Saúde Pública.** Rio de Janeiro-RJ. v. 21. n. 2. p. 598-605. mar.-abr. 2005.

PIRES, R.C. **Toxicologia Veterinária: Guia Prático Para o Clínico de Pequenos Animais.** 1ª edição. Editora Varela. 2005. 96 p.

POPE, C.N.; CHAPMAN, M.L.; TANAKA, D.Jr.; PADILLA, S. Phenylmethylsulfonyl fluoride alters sensitivity to organophosphorus-induced delayed neurotoxicity in developing animals. **Neurotoxicol.** v. 13. n. 2. p. 355-64. 1992.

POPE, C.; DILORENZO, K.; EHRICH, M. Possible involvement of a neurotrophic factor during the early stages of organophosphorus-induced delayed neurotoxicity. **Toxicol. Lett.** v. 75. n. 1-3. p. 111-17. 1995.

PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 34. n. 4. p. 449-61. 2001.

RANG, H.P.; RITTER, J. M.; DALE, M. M. **Farmacologia.** 5ª edição. Editora Elsevier. 2004. 920 páginas.

REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos.** 12ª edição. Editora Guanabara Koogan. 2006. 946 p.

ROBERTS, D.M.; KARUNARATHNA, A; BUCKLEY, N.A; MANUWEERA, G.; SHERIFF, M.H.; EDDLESTON, M. Influence of pesticide regulation on acute poisoning deaths in Sri Lanka. **Bull World Health Organ.** v. 81. n. 11. p. 789-98. 2003.

RODNITZKY, R.; LEVIN, H.S.; MICK, D.L. Occupational exposure to organophosphate pesticides. **Arch. Environ. Health**. v. 30.1975.

ROGER, W; SHAWN, P; MESSONNIE, R. **Manual de Toxicologia e Envenenamentos em Pequenos Animais**. 2ª edição. Editora Roca. 2006. 392 p.

ROLIM, M., et al. Relatório Azul. Comissão de Cidadania e Direitos Humanos da Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul. **Governo do Estado do Rio Grande do Sul**. 1995. 165 p.

ROSENSTOCK, L. Chronic neuropsychological sequelae of occupational exposure to organophosphate insecticides. **Amer. J. of Industr. Med.** n. 18. 1990.

SAEGER, V.W.; HICKS, O.; KALEY, R.G.; et al. Environmental fate of selected phosphate esters. **Environ. Scienc. Technol.** n. 13. p. 840-44. 1979.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. Organophosphates and their impact on the global environment. **Neurotoxicol.** v. 21. n. 1/2. p. 223-227. fev-abr. 2000.

SCHWAB, B.W.; RICHARDSON, R.J. Lymphocyte and brain neurotoxic esterase: Dose and time dependence of inhibition in the hen, examined with three organophosphorus esters. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** n. 83. p. 1-9. 1986.

SENANAYAKE N.; JEYARATNAM, J. Toxic Polyneuropathy due to Gingili Oil contaminated with tri-cresyl phosphate affecting adolescent girls in Sri Lanka. **The Lancet**. January. v. 10. 1981.

SENANAYAKE, N.; KARALLIEDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. **N. Engl. J. Med.** v. 326. n.13. 1987.

SIGOLAEVA, L.V.; EREMENKO, A.V.; MAKOWER, A.; MAKHAEVA G.F.; MALYGIN, V.V.; KUROCHKIN, I.N. A new approach for determination of neuropathy target esterase activity. **Chem. Biol. Interact.** v. 119-120. p. 559-65. 1999.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5^a edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1998. 1.398 p.

SINITOX – Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológica. **Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento**. Rio de Janeiro - RJ. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Informação Científica e Tecnológica. n.pag. 2004.

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

SUNGUR, M.; GUVEN, M. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. **Crit. Care**. v. 5. n. 4. p. 211-215. 2002.

SUWITA, E.; ABOU-DONIA, M.B. Pharmacokinetics and metabolism of a single subneurotoxic oral dose of tri-o-cresyl phosphate in hens. **Arch. Toxicol.** v. 64. n. 3. p. 237-41. 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Organophosphorus pesticides: an epidemiological study. **Environ. Health**. v. 22. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe. 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria for tri-n-butyl phosphate**. Geneva: World Health Organization. Switzerland. 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Macroeconomics and Health: Investing in Health for Economic Development**. Geneva: World Health Organization. Switzerland. 2004.

VERONESI, B.; PADILLA, S. Phenylmethylsulfonyl fluoride protects rats from Mipafloxacin-induced delayed neuropathy. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 81. n. 2. p. 258-64. 1985.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. 3ª edição. Rio de Janeiro: Editora Câmpus. 1998. 216 p.

8. ANEXOS:



Anexo A – Foto da ampola de gliconato de cálcio e do flaconete da água para injeção utilizados no tratamento das aves.

Fórmula Molecular:

$C_{12}H_{22}CaO_{14}$ (forma anidra)

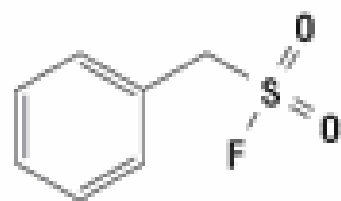
Peso Molecular:

430,38

Anexo B – Fórmula e peso molecular do gliconato de cálcio.



Anexo C – Foto do PMSF utilizado no tratamento das aves.

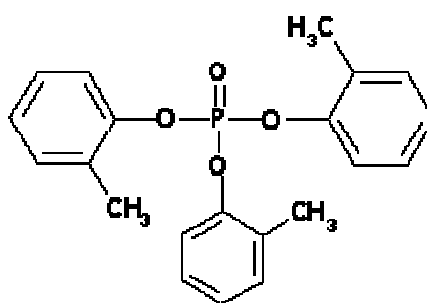


PMSF
M.W. 174.19

Anexo D – Fórmula estrutural e peso molecular do PMSF.



Anexo E - Foto do TOCP utilizado para intoxicar as aves.



Tri-*o*-tolyl phosphate
Tri-*o*-cresyl phosphate
TOCP

Anexo F – Fórmula estrutural do TOCP.



Anexo G – Foto de uma galinha intoxicada ainda no nível 0, ou seja, normal.



Anexo H – Foto de uma galinha intoxicada no nível 1.



Anexo I – Foto de uma galinha intoxicada no nível 2.



Anexo J – Foto de uma galinha intoxicada no nível 3.



Anexo K – Foto de uma galinha intoxicada no nível 4.



Anexo L – Aves intoxicadas, em sentido horário: nível 2, nível 1, nível 1, nível 4.