

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA**

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM BIOINDICADOR PARA A
NEUROPATIA TARDIA INDUZIDA POR
ORGANOFOSFORADOS (OPDIN)**

Tese de Mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em ciências (Área de Saúde Pública)

ANA CAROLINA FERRANTE PEYON

Rio de Janeiro
2007

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública

Programa de Pós-graduação em Saúde Pública

**IMPLEMENTAÇÃO DE UM BIOINDICADOR PARA A
NEUROPATIA TARDIA INDUZIDA POR
ORGANOFOSFORADOS (OPDIN)**

ANA CAROLINA FERRANTE PEYON

Orientador Dra Paula de Novaes Sarcinelli

EXAMINADORES

Dra. Paula de Novaes Sarcinelli
CESTEH-FIOCRUZ
(Presidente da Banca)

Dr. Josino Costa Moreira
CESTEH-FIOCRUZ

Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria
Professor Titular IBRAG-UERJ

Ferrante Peyon, Ana Carolina

Título Implementação de um bioindicador para a neuropatia tardia induzida por organofosforados (OPDIN)

xiii, 48 f.

Orientador: Paula de Novaes Sarcinelli

Dissertação (Mestrado), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2007

1 -Organofosforados 2- Esterase neurotóxica 3-
Neuropatia tardia induzida por organofosforados
4-Bioindicador

Dedico esse trabalho aos meus pais meus maiores incentivadores, ao Márcio, meu grande amor e ao nosso filho que vem completar nossa felicidade.

AGRADECIMENTOS

- Muito obrigado a minha mãe que com seu esforço pessoal e com o seu apoio me ajudou a chegar até o fim, e ao meu pai que mesmo de longe, acompanhou de perto a construção deste trabalho e sempre me apoiou mesmo nos momentos mais difíceis.
- Ao meu marido Márcio, por toda dedicação, paciência e acima de tudo por seu amor, (sem ele não teria a paz de espírito necessária para atingir meus objetivos) e pelo maior bem que ele poderia ter me dado, um filho.
- Aos meus amigos: Cássia, Marina, Rapha, Murata pelas conversas, pelos sorrisos, pelas caronas, pelos conselhos, pela amizade, que foram fundamentais para a preparação desse trabalho.
- À minha orientadora Paula que tornou possível a realização deste trabalho contribuindo para o meu crescimento profissional, e me incentivando até o fim.
- À Fafá que me adotou e me emprestou o Moa, que foi mais que um incentivador, e teve toda a paciência do mundo comigo me mostrando que por mais difícil o caminho, sempre é possível trilhá-lo. Uma pessoa que vai ficar para sempre. Obrigado.
- À Rita, pela preocupação e pelos conselhos.
- Ao pessoal do Centro de Saúde, em especial a Flávia, que me permitiram invadir as manhãs da coleta e a finalizar todo esse trabalho com os voluntários.
- À todos do laboratório de Toxicologia do CESTE, em especial a Ana Cristina por toda a paciência e companheirismo demonstrados, por todos esses anos de convivência.
- Ao Dr. Paul Glynn, pela doação, sem ela nada teria acontecido.
- Aos voluntários que doaram o seu tempo e o seu sangue por esse trabalho.
- À todos que de alguma forma me ajudaram a finalizar esse ciclo da vida.

*"Aprendizado é ação.
Do contrário, é só informação."*

Albert Einstein

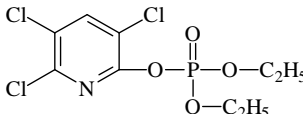
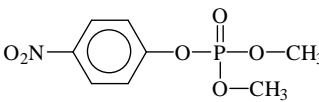
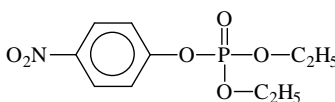
*"Embora ninguém possa voltar atrás para
fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora a fazer um novo fim."*

Chico Xavier

ABREVIATURAS

DFP	diisopropilfosforofluoridato
EPN	2,5-diclorofenil-etil-fenilfosfonotionato
TPPi	trifenil fosfito
TOCP	Tri-o-cresilfosfato
NTE	Esterase neurotóxica
AChE	acetilcolinesterase
BChE	butirilcolinesterase
mPXN	metil paraoxon
etPXN	etil paraoxon
PV	Valerato de fenila
CPS	Clorpirifós
CPO	Clorpirifós oxon
OPIDN	Neuropatia tardia induzida por organofosforados
FAAH	Hidrolase de amidas de ácidos graxos
APH	Hidrolase de acil peptídeos
CB1	Receptor canabinóide CB1
PPA	Fenilacetato de fenila

ESTRUTURAS QUÍMICAS

MPX	mipafox (N,N'-diisopropildiamido-fluor-fosfato) PM = 182,18 CAS RN = 371-86-8 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{F}-\text{P}-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \\ \text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{array}$
CPO	clorpirifós-oxon (3,5,6-tricloro-2-piridil-dietil-fosfato) PM = 334,52 CAS RN = 5598-15-2 
mPXN	metil-paraoxon (dimetil-4-nitrofenil-fosfato) PM = 247,14 CAS RN = 950-35-6 
etPXN	etil-paraoxon (dietil-4-nitrofenil-fosfato) PM = 275,20 CAS RN = 311-45-5 

RESUMO

O uso de praguicidas vem se tornando um problema cada vez mais grave, tendo em vista o permanente aumento da área plantada em todo mundo. Com o desenvolvimento da agricultura no Brasil, vem se delineando um quadro que pode ser considerado um dos principais problemas de Saúde Pública: a intoxicação humana por esses praguicidas. No grupo dos praguicidas destacam-se os organofosforados (OP) e carbamatos, devido a sua grande utilização no Brasil e ao alto número de intoxicações comunicadas. Esses compostos têm como principal alvo a acetilcolinesterase mas alguns OP também são capazes de inibir uma esterase presente no sistema nervoso. A inibição dessa enzima, conhecida como "esterase neurotóxica" (NTE), leva a um quadro conhecido como "neuropatia tardia induzida por organofosforados" (OPIDN), que tem como principal sintoma a paralisia dos membros inferiores com degeneração axonal. A dosagem de NTE utiliza dois inibidores, sendo definida como resistente ao etil-paraoxon (etPXN) e sensível ao mipafox (MPX). MPX, apesar de seletivo para NTE, não é vendido comercialmente, devendo ser sintetizado no laboratório. O objetivo desse trabalho foi a implantação de um bioindicador para OPIDN, tendo por base a metodologia clássica para determinação de NTE em linfócitos, que possibilitasse monitorar a intoxicação humana por pesticidas com potencial para desenvolver essa síndrome. A substituição de MPX por clorpirifós-oxon (CPO) e de etPXN por metil-paraoxon (metPXN) levou a resultados muito diferentes dos obtidos com etPXN e MPX. A paralisação da reação com detergente ao invés de ácido perclórico se mostrou mais eficiente, eliminando a etapa de centrifugação. Não foi possível estabelecer uma técnica de conservação para as preparações de linfócitos o que obriga que a determinação seja feita no mesmo dia da coleta do sangue. Uma avaliação em um grupo de 27 voluntários sadios indicou um valor de $11,42 \pm 6,33$ Unidades de NTE por grama de proteínas totais (U/g Ptn), não havendo diferenças com relação ao sexo. A grande variabilidade dos valores encontrados em uma população sadia, mesmo que compatível com os resultados da literatura, dificulta a proposta de NTE linfocitária como bioindicador de OPIDN.

ABSTRACT

Pesticides are an increasingly serious problem, principally due to their permanent increase of use in farmed land. The development of agriculture in Brazil is causing one of the most important Public Health problems: the human intoxication by pesticides. In the group of pesticides, organophosphates (OP) and carbamates are singled out, due to their great use in Brazil and resulting number of intoxications. The principal target of these compounds is the enzyme acetylcholinesterase but some OP can inhibit an esterase in the nervous system. The inhibition of this enzyme, called "neurotoxic esterase" (NTE), leads to "organophosphate-induced delayed neuropathy" (OPIDN), which causes paralysis and axonal degeneration in the lower limbs. The NTE assay uses two inhibitors and is defined as being ethyl-paraoxon (etPXN) resistant and mipafox (MPX) sensitive. MPX, although selective for NTE, is not commercially available and has to be synthesized in the laboratory. A bioindicator for OPIDN based on NTE assay in human lymphocyte for monitoring human intoxication by pesticides was the objective of this study. The MPX replacement by clorpiriphos-oxon (CPO) and the etPXN replacement by methyl-paraoxon (mPXN) showed very different results in comparison with the classical inhibitors etPXN and MPX. Blocking the enzymatic reaction with detergent, instead of perchloric acid, was more efficient and eliminated centrifugation. Since it was not possible to conserve lymphocyte preparations, it was necessary to make the NTE assay on the same day of blood sampling. A research in 27 healthy volunteers indicates 11.42 ± 6.33 NTE units per gram of total protein without gender differences. This NTE level is compatible with the literature but the great variation found in a health population make it difficult in proposing using lymphocyte NTE as an OPIDN bioindicator.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	HISTÓRICO.....	1
1.2	ANTICOLINESTERÁSICOS: MECANISMO DE AÇÃO E SÍNDROMES	2
1.3	OPIDN EM HUMANOS.....	6
1.4	AÇÕES SECUNDÁRIAS DE ORGANOFOSFORADOS	10
1.5	ESTERASE NEUROTÓXICA (NTE)	12
1.5.1	<i>Inibidores de NTE neuropáticos e não-neuropáticos.....</i>	<i>12</i>
1.5.2	<i>NTE: características e desenvolvimento de OPIDN.....</i>	<i>12</i>
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	SOLUÇÕES E REAGENTES	18
3.1.1	<i>Preparação da amostra.....</i>	<i>18</i>
3.1.2	<i>Determinação do teor de proteínas totais⁴⁸.....</i>	<i>18</i>
3.1.3	<i>Determinação segundo Johnson (NTE).....</i>	<i>18</i>
3.1.4	<i>Método alternativo (NTElike)</i>	<i>19</i>
3.2	PROCEDIMENTOS	19
3.2.1	<i>Preparação da amostra</i>	<i>19</i>
3.2.2	<i>Determinação do número de células.....</i>	<i>20</i>
3.2.3	<i>Determinação do teor de proteínas totais⁴⁸.....</i>	<i>20</i>
3.2.4	<i>Dosagem de NTE</i>	<i>20</i>
3.2.4.1	<i>Determinação segundo Johnson (NTE).....</i>	<i>20</i>
3.2.4.2	<i>Método alternativo (NTElike)</i>	<i>21</i>
3.3	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ANALISADA.....	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÕES.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8	ANEXOS	49
8.1	TERMO DE CONSENTIMENTO.....	49
8.2	QUESTIONÁRIO.....	51

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Alvos primários e secundários dos organofosforados.	11
Figura 2 - Mecanismo de reação com substratos e inibidores.....	14
Figura 3 - Caminho de síntese e dealquilação de colina.	15
Figura 4 - Efeito da concentração do substrato na atividade de hidrólise de valerato de fenila de preparações de linfócito humanos.....	24
Figura 5 - Curva de inibição da atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparação de linfócito humano por clorpirifós-oxon (CPO) na presença de 40 μ M de etil-paraoxon (etPXN).	25
Figura 6 - Efeito da quantidade de amostra na determinação de NTE.....	28
Figura 7 - Relação entre o número de células e o teor de proteínas totais em preparações de linfócitos humanos	40
Tabela 1 - Cronologia da ocorrência de casos de OPIDN em humanos no mundo. 8	
Tabela 2 - Diferença do efeito inibidor de metil (mPXN) e etil-paraoxon (etPXN) sobre a atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparações de linfócitos humanos.	24
Tabela 3 - Efeito do congelamento na atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparações de linfócito humano.	25
Tabela 4 - Comparação dos métodos de determinação de NTE.....	27
Tabela 5 - Memória de cálculo da determinação de NTE substituindo MPX por CPO	27
Tabela 6 – Reprodutibilidade da determinação de NTE em preparações de linfócitos humanos	28
Tabela 7 - Memória de cálculo das determinações de NTE em linfócitos humanos de 27 voluntários sadios.....	29
Tabela 8 - Dados estatísticos da atividade de NTE em linfócitos de 27 voluntários.	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Com o avanço tecnológico e a ampla utilização de diversos e novos métodos para o incremento da agricultura, uma grande variedade de agentes químicos têm sido utilizados, tanto como fertilizantes quanto como agrotóxicos, o que vem gerando uma série de danos ao ambiente e à saúde humana. No que se refere aos agrotóxicos, devem ser destacados os organofosforados (OP), por serem compostos muito utilizados e por serem responsáveis por um grande número de intoxicações, principalmente em países em desenvolvimento.

Devido ao seu extremo potencial tóxico, inicialmente os OP foram sintetizados e utilizados como arma de guerra, conhecida como “gás dos nervos” (sarin, soman e tabun) e utilizados pelos nazistas na Segunda Guerra Mundial. Esses compostos vêm sendo adaptados e desenvolvidos para serem usados comercialmente como inseticidas¹.

Os OP foram vistos como uma alternativa ao uso de compostos organoclorados, como o DDT, que foram proibidos na década de 70, uma vez que se acumulam nos ecossistemas além de se magnificarem na cadeia alimentar². O fato dos OP terem uma baixa persistência no ambiente, e de não se bioacumularem, contribuiu enormemente para que o seu uso crescesse indiscriminadamente.

Em 1999, os OP e os metil-carbamatos (anticolinesterásicos) contabilizavam 52% do mercado mundial de controle químico de insetos, o que correspondia a cerca de oito bilhões de dólares³. Além disso, em 1993 80% das admissões hospitalares relacionadas a pesticidas foram intoxicações por OP, ocasionalmente levando à morte⁴.

Atualmente, além da sua utilização especificamente na agricultura, através de sua aplicação na lavoura para o controle de pragas, também são utilizados na indústria como retardantes de chama, fluídos hidráulicos e plastificantes⁵. Na medicina, alguns OP são usados no tratamento de helmintos e ectoparasitas e no tratamento do glaucoma. Alguns OPs também são usados para o tratamento da miastenia gravis e do mal de Alzheimer⁶.

1.2 Anticolinesterásicos: Mecanismo de ação e síndromes

Os OPs são ésteres do ácido fosfórico e do ácido tiofosfórico e fazem parte de uma classe importante de compostos conhecidos como anticolinesterásicos, que ainda inclui os carbamatos, derivados do ácido carbâmico. Apesar das diversas estruturas, o mecanismo de ação dos OP e dos carbamatos é idêntico¹. Eles atuam, basicamente, no sistema colinérgico que é formado pelos componentes de síntese, transporte e hidrólise de acetilcolina, pelas enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) e pelos receptores muscarínicos (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs), responsáveis pela transdução do sinal nervoso. Os nAChRs estão ligados aos canais iônicos enquanto os mAChRs são acoplados à proteína G. Os sítios sensíveis aos OP são a AChE, a BChE e os mAChRs⁷.

A inibição da enzima presente no sistema nervoso, a AChE, se dá pela ligação irreversível dos anticolinesterásicos ao sítio catalítico da enzima, que, em condições normais, é responsável pela destruição da acetilcolina, um neurotransmissor endógeno que age nas sinapses colinérgicas e nas junções neuroefetoras com a função de propagar o impulso nervoso⁸. Uma vez inibida, a AChE se torna impossibilitada de promover a quebra da acetilcolina gerando um acúmulo de acetilcolina livre nas terminações nervosas, o que faz com que o impulso nervoso se propague continuamente, levando a uma crise colinérgica¹.

Clinicamente, os sintomas da exposição a OP são divididos em três tipos: síndrome colinérgica, síndrome intermediária e neuropatia tardia induzida por organofosforados (OPIDN)^{9, 10}.

Na crise colinérgica, os sintomas observados resultam, basicamente: (1) da estimulação dos receptores muscarínicos do sistema nervoso parassimpático causando: aumento de secreções, broncoconstrição, miose, câimbras gastrointestinais, diarreia, incontinência urinária e bradicardia; (2) da estimulação, e subsequente bloqueio, dos receptores nicotínicos causando taquicardia, hipertensão, fasciculação muscular, tremores, fraqueza muscular, e/ou paralisia flácida e (3) de efeitos oriundos de ações sobre o sistema nervoso central causando labilidade emocional, ataxia, letargia, confusão mental, perda de memória, fraqueza generalizada, convulsão, cianose e coma.

A síndrome intermediária foi recentemente descrita no Sri Lanka durante o tratamento de pacientes que tentaram o suicídio¹¹. Essa condição paralisante consiste de

uma seqüência de sinais neurológicos que aparecem de 24 a 96 horas após a crise colinérgica, antes porém da neuropatia tardia. O principal efeito é a fraqueza muscular, primariamente afetando músculos inervados pelos nervos cranianos, tais como os flexores do pescoço e os músculos da respiração, afetando também os nervos dos membros¹. O mecanismo pelo qual essa síndrome se desenvolve é desconhecido. Imagina-se que a severa fraqueza muscular seja devida à dessensibilização e/ou à diminuição da regulação dos receptores de acetilcolina^{9,12}.

A terceira síndrome, conhecida por neuropatia tardia induzida por organofosforados (OPIDN), diferente das outras duas, é causada apenas pelos OPs neuropáticos, tais como alguns fosfatos, fosfonatos e ésteres de fosforamidados¹. Os sintomas são observados de duas a três semanas depois da exposição aos OPs neuropáticos¹³, e se caracterizam por flacidez, fraqueza muscular nos braços e pernas chegando a um crescente desequilíbrio, embaralhamento da marcha normal, evoluindo para espasmos, hipertonicidade, hiperreflexia, clonus e reflexos anormais, indicando dano nos tratos piramidais e uma permanente síndrome de neurônio motor¹⁴. Há uma degeneração dos axônios longos na medula e nos nervos periféricos¹⁵.

O mecanismo de ação dessa síndrome parece estar ligado diretamente a uma esterase, chamada de esterase neurotóxica (NTE)¹⁶, e não à inibição da AChE, principal alvo destas drogas. O processo de intoxicação e aparecimento de OPIDN depende da natureza do grupamento químico que vai se ligar ao sítio ativo da NTE e não somente à perda de atividade catalítica per si¹⁷.

Estudos mostram que os organofosforados produzem dois tipos de OPIDN, tipo I e tipo II, designadas de acordo com as seguintes características, listadas a seguir^{18,19}.

Estrutura química:

Os compostos que causam a neuropatia tipo I possuem um átomo pentavalente de fósforo enquanto os compostos responsáveis pela neuropatia tipo II, possuem um átomo de fósforo trivalente.

Os compostos tipo I incluem: derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico e fosforamídico, além dos fosforofluoridratos e de análogos de enxofre. Os compostos tipo II são derivados do fosfito. São exemplos de compostos do tipo I e II, respectivamente o tri-orto-cresil-fosfato (TOCP) e trifetil fosfito (TPPi).

A capacidade de um composto organofosforado causar neuropatia tardia do tipo I ou do tipo II depende da reatividade do átomo de fósforo presente na molécula. Nos compostos que causam a neuropatia do tipo I, a capacidade de fosforilação do átomo de fósforo está ligada ao seu caráter eletrofílico, que por sua vez depende exclusivamente do grupamento ligado ao fósforo. Nos compostos responsáveis pela neuropatia do tipo II, a presença de um par de elétrons livre no átomo de fósforo aumenta a sua reatividade com outros átomos.

Seletividade das espécies:

A caracterização dos compostos que causam neuropatia tipo I e II também pode ser feita através da seletividade das espécies. Diferentes estudos mostram que nem todos os animais são sensíveis da mesma maneira aos OP, de forma que venham a desenvolver OPIDN do tipo I ou do tipo II. Enquanto animais como vacas, cordeiros, búfalos, ovelhas, gatos e galinhas são sensíveis a OP causadores de neuropatia tardia do tipo I, ratos, camundongos, coelhos, porquinhos-da-Índia e hamsters mostram uma neurotoxicidade tardia inconsistente.

Estudos com TOCP em camundongos, independente da raça, mostram inibição de NTE, dano estrutural no sistema nervoso e a presença de sinais característicos da OPIDN, tais como ataxia e paralisia. No caso de ratos, o efeito de TOCP parece depender da raça, além dos ratos apresentarem maior resistência às disfunções observadas no modelo de neurotoxicidade tardia, a galinha.

No caso de compostos neurotóxicos do tipo II, animais como gatos, cachorros, macacos e galinhas se mostram mais sensíveis à neurotoxicidade tardia, variando de acordo com cada espécie.

Sensibilidade idade-dependente:

Estudos recentes mostram que galinhas jovens são mais sensíveis a doses repetidas de compostos neuropáticos do tipo I do que a uma dose única. No caso de indivíduos mais velhos, a dose única parece causar OPIDN tipo I com maior severidade. Nos casos de OPIDN tipo II em galinhas, os indivíduos mais jovens são susceptíveis a doses únicas. Em ratos, assim como em galinhas, a sensibilidade ao aparecimento da OPIDN tipo I gradualmente aumenta com a idade.

Período de latência:

Embora os dois tipos de OPIDN sejam caracterizados por um atraso no início do aparecimento de sinais de déficit ou lesão neuropática, o tempo do período de latência varia de acordo com o tipo de neuropatia estabelecida.

Em gatos, a latência no tipo II de OPIDN tende a ser um pouco mais curta em relação ao tipo I. No primeiro, o início dos sintomas se dá de quatro a sete dias após a administração enquanto que no último os sinais são observados de 14 a 21 dias após a administração.

Em galinhas, o período de latência observado é de quatro a seis dias para o composto neuropático do tipo II e de 6 a 14 dias para o composto do tipo I.

Sinais clínicos:

Os sinais observados no desenvolvimento de OPIDN dependem do tipo de composto e da espécie do animal. Embora em galinhas adultas não seja possível distinguir os sinais de OPIDN tipo I e II, em outras espécies os sinais são característicos de cada síndrome.

Em gatos e macacos, compostos do tipo II geram sinais tais como: ataxia, rigidez dos membros extensores dianteiros e aumento da temperatura. Já os compostos do tipo I geram somente a paralisia flácida como sinal. No caso de ratos, os sinais provocados por compostos do tipo II são: hiperexcitação, descoordenação e parestesia das extremidades.

Inibição de NTE:

Nos estudos em ratos com os compostos do tipo I, a atividade de NTE cerebral se mostrou inibida cerca de 65% em relação ao controle. Nos estudos com galinhas, ambos os compostos (tipo I e II) inibiram um mínimo de 70% de NTE cerebral.

1.3 OPIDN em humanos

Eventos importantes da história marcaram a descoberta dessa síndrome. O primeiro ocorreu há quase 100 anos atrás associado ao organofosforado tri-*o*-tolil fosfato (TOTP)¹⁴. Essa epidemia de OPIDN ocorreu na década de 30, durante a era de proibição do consumo de álcool nos Estados Unidos, devido ao grande consumo de uma peculiar bebida alcoólica feita a partir do extrato de gengibre que estava contaminada ou adulterada com uma mistura de ésteres de tolil fosfato. A síndrome afetou mais de 20.000 pessoas, em graus diferentes, e ficou conhecida como “Ginger Jake paralysis”, ou “Jake Leg”.

Maurice Smith e seus colaboradores estudaram profundamente essa síndrome e não só confirmaram que essa condição poderia ser reproduzida em animais (coelhos, cães e macacos) mas também demonstraram que somente um dos três isômeros encontrados no composto comercial do tri-*o*-tolil-fosfato, o isômero orto, era responsável pela toxicidade¹⁵.

Outro evento marcante foi a paralisia de vários trabalhadores ingleses responsáveis pela produção industrial de mipafox, um novo candidato a inseticida organofosforado¹⁶.

No caso de humanos, a exposição a compostos causadores de OPIDN se dá, na maioria das vezes, devido a tentativas de suicídios, exposição ocupacional ou ingestão acidental^{5,17,18,19}. Os sintomas de OPIDN em humanos estão bem documentados a partir de episódios ocorridos em todo o mundo (Tabela 1)¹⁷.

O sinal típico de OPIDN é o aparecimento da fraqueza das pernas dentro de um período de seis dias a um mês após a intoxicação, sendo mais comum ocorrer em duas semanas após a exposição. Porém, o déficit neurológico causado por OPIDN pode ser dividido em três fases distintas: progressiva, estacionária e melhora.

Durante a fase progressiva, que pode durar até seis meses após o aparecimento dos primeiros sintomas, são observados sinais iniciais como câimbras, queimação e dor aguda na panturrilha e menos frequentemente nos tornozelos. Concomitantemente, podem ser observados formigamento ou dormência das pernas e dos pés. Fraqueza e atrofia dos músculos peroneais resulta na impossibilidade de levantar o pé e produz a situação conhecida como pé em “gota” (pé pendente). Uma semana após o aparecimento da fraqueza e da atrofia nos pés, em alguns

casos, os sintomas podem se estender para as mãos. Essas mudanças, ocorridas, tanto nas pernas e pés quanto nas mãos, podem ser chamadas de hipoestesia de “luva e meia”, que é caracterizada pela diminuição da sensibilidade nessas áreas, acarretando dificuldades no modo de andar. Ainda na fase progressiva da OPIDN, o teste de Romberg¹⁸, que avalia a coordenação motora dos membros inferiores e a perda de senso de posição, é positivo, o que denota a perda de coordenação e de senso de posição. Observa-se também nessa fase a ausência de reflexos no tendão de Aquiles e no tornozelo e, em alguns casos, a paralisia flácida bilateral.

Durante a fase estacionária, que pode durar de três a 12 meses após o início dos sintomas, a paralisia se torna estacionária. Apesar dos sintomas sensoriais desaparecerem de duas a nove semanas após o fim da fase progressiva, a paraplegia, ou até mesmo a quadriplegia, persiste²⁰.

A fase de melhora aparece cerca de seis a 18 meses após o surgimento dos primeiros sinais de déficit neurológico e ocorre de maneira inversa ao aparecimento dos sintomas, onde, por exemplo, as mãos e os braços, os últimos membros a serem acometidos, recuperam-se primeiro podendo levar de 15 meses a dois anos, dependendo da gravidade do caso.

Tabela 1 - Cronologia da ocorrência de casos de OPIDN em humanos no mundo.

Agente Químico	Ano	País	Incidência	Número de casos
TOCP (tri-orto-cresil fosfato)	1899	França	Creosato para tratamento de tuberculose	59
	1930	EUA	Extrato de gengibre	10.000-20.000
	1925-1934	França, Alemanha, Suíça	Abortivo	200-500
	1937	África do Sul	Contaminação de óleo de cozinha	60
	1940	Suíça	Contaminação de óleo de cozinha	80
	1942	Inglaterra	Produção	3
	1945	Inglaterra	Óleo de semente de algodão contaminado	17
	1943-1947	Alemanha	Usado como óleo de cozinha	10-20
	1947	Suíça	Comida contaminada	73
	1952	Suíça	Azeite contaminado	80
	1955	África do Sul	Água contaminada	11
	1959	Marrocos	Usado como óleo de cozinha	10.000
	1960	Índia	Contaminação de óleo de cozinha	58
	1966	Romênia	Álcool contaminado	12
	1967	Ilhas Fiji	Farinha conataminada	-
1973	Marrocos	Exposição a cola de sapateiro	40	
1977-1978	Sri Lanka	Contaminação de óleo de gergelim	23	
1988	Índia	Contaminação de óleo de cozinha	1000	
Mipafox (N,N-Diisopropil fosforodiamidico fluoreto)	1952	Inglaterra	Quando dos testes de desenvolvimento do produto	2
Ometoato (O,O-Dimetil S-metilcarbamoxi-metilfosforotioato)	1972	França	Tentativa de suicídio	1

Tabela 1 - Cronologia da ocorrência de casos de OPIDN em humanos no mundo (continuação)

Agente Químico	Ano	País	Incidência	Número de casos
Leptofós (O-4-Bromo-2,5-diclorofenil O-metilfenilfosforotioato)	1974-1975	EUA	Produção	12
Tricloronato (O-Etil O-2,4,5-triclorofeniletil fosforotioato)	1975	Polônia	Tentativa de suicídio	1
Triclorfon (2,2,2- Tricloro-1-hidroxietil fosfonato)	1975	Japão	Acidente	1
	1976	Irã	Tentativa de suicídio	1
	1984	Romênia	Exposição a inseticida	4
Metamidofós	1982	Sri Lanka	Ingestão/Contaminação da pele	9
	1999	Nicarágua 56	Tentativa de suicídio	1
Fention	1985	EUA	Durante manuseio de animal	3
Clorpirifós	1986	Itália	Tentativa de suicídio	1

1.4 Ações secundárias de organofosforados

Destacando-se dentro do grupo dos anticolinesterásicos, os OP têm como alvo primário a AChE e seu mecanismo de ação está baseado na premissa de que sua inibição é responsável pela toxicidade aguda e crônica desses compostos. Porém, está claro que os OP agem também em outros sistemas que não só a AChE, o que traz à tona questões sobre que contribuição esses alvos alternativos têm na letalidade aguda e nos efeitos secundários de curto e longo prazo (Figura 1)⁷.

A BChE foi a primeira a ser reconhecida como alvo secundário na intoxicação por OP e continua tendo interesse como indicador de exposição a OP, através da determinação de sua atividade no plasma. Geralmente a BChE é mais sensível que a AChE aos OP⁷. Estudos mostram que animais com BChE inibida têm aumentada sua sensibilidade à succinilcolina, mivacurium e aspirina²¹. A potência da cocaína em humanos, e a letalidade dessa droga em camundongos, é aumentada pela inibição da BChE por pesticidas OP^{22,23}. Esses resultados indicam que a BChE pode ter um papel detoxificador.

A hidrolase de amidos e de ácidos graxos (FAAH) e o receptor CB1 (cannabinóide) são componentes do sistema conhecido como canabinóide e que também são sensíveis a ação de OPs, incluindo inseticidas e seus metabólitos. A FAAH é responsável pela hidrólise do endocannabinóide aracdonil etanolamida (anandamida) e da oleamida, um agente endógeno indutor do sono²⁴. A duração da ação da anandamida é limitada pela FAAH. Alguns OP prolongam a ação da anandamida exógena em camundongos²⁵.

O receptor CB1 é o principal alvo para o Δ^9 -tetrahydrocannabinol. A anandamida também se liga ao CB1 do cérebro levando à catalepsia e à supressão da atividade espontânea. O sítio CB1 é bloqueado por diversos OPs, embora não se conheça a significância funcional disto^{26,27}.

O receptor CB1 parece também ter o papel de detoxificador, como mostra o estudo em que os sintomas induzidos por Δ^9 -tetrahydrocannabinol (catalepsia, hipomotilidade e hipotermia) parecem estar completamente ausentes nos camundongos deficientes para o gene CB1²⁸.

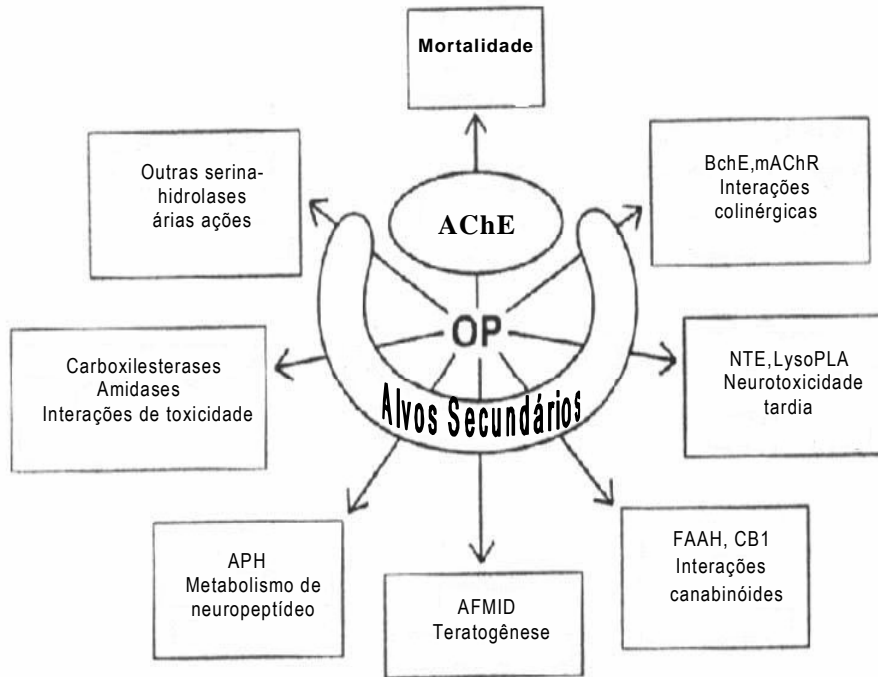


Figura 1 - Alvos primários e secundários dos organofosforados.

Fonte: Casida, 2004⁷

1.5 Esterase neurotóxica (NTE)

1.5.1 Inibidores de NTE neuropáticos e não-neuropáticos

A maioria dos compostos anticolinesterásicos age também inibindo a NTE, porém, esse fato por si só não explica o aparecimento de OPIDN. É preciso que ocorra uma reação chamada *aging* para que se evidenciem os sintomas. Essa reação vai determinar a diferenciação entre compostos neuropáticos e não-neuropáticos.

Os compostos conhecidos como neuropáticos estão entre as classes dos fosfatos, fosfonatos e fosforoamidatos e são capazes de causar a inibição de NTE seguida de rápida reação de *aging*. São exemplos de compostos neuropáticos: leptofós, tri-orto-cresil-fosfato (TOCP), di-isopropil-fosfato (DFP), etil-para-nitrofenil-feniltiofosfonato (EPN), triclorfon, diclorvós, fention, isofenfós e clopirifós²⁹. A maioria dos compostos não neuropáticos faz parte da classe dos fosfinatos, carbamatos e sulfonatos³⁰. São capazes de inibir NTE porém não induzem a reação de *aging*. São exemplos de compostos não neuropáticos o etil-paraoxon (etPXN)³¹ e o tetra-etil-pirofosfato (TEPP)³². Estudos^{33,34} mostram que os compostos não neuropáticos teriam *efeito protetor* no desenvolvimento de OPIDN, quando administrados antes dos compostos neuropáticos em doses capazes de inibir de 30 a 40% da atividade de NTE. Quando administrados após uma pequena dose de um composto neuropático (>40-50% inibição), os compostos não neuropáticos atuam *promovendo* o aparecimento de neuropatia severa.

1.5.2 NTE: características e desenvolvimento de OPIDN

A NTE, principal alvo dos OP neuropáticos, foi descoberta por Martin Johnson e foi originalmente definida como uma população de sítios marcados radioativamente com disopropilfluorofosfato (DF[P³²]) e como uma esterase presente em homogeneizados de cérebro. Tanto os sítios marcados radioativamente quanto a esterase são bloqueados por OP neuropáticos, como o mipafox, mas não por OP não neuropáticos, como o paraoxon^{32,35}. Ele mostrou que uma dose de OP neuropático suficiente para inibir a atividade de NTE acima de 70% seria uma dose preditiva para causar os sinais clínicos de OPIDN³⁶.

Essa enzima é encontrada em tecidos do sistema nervoso, tais como cérebro, medula e nervos periféricos, e também em outros tecidos, tais como intestino, placenta e linfócitos.

A atividade de NTE dos linfócitos é correlacionada com a atividade de NTE cerebral³⁷. Recentes estudos com a purificação e caracterização de NTE mostram que ela está localizada na face citoplasmática do retículo endoplasmático (RE), onde está ancorada via um segmento transmembrana N-terminal³⁸. É uma proteína integral de membrana com 1327 aminoácidos³⁹, com domínio regulatório (que pode estar ligada a AMP cíclico, já que tem uma seqüência de aminoácido similar às proteínas ligadas ao AMP cíclico⁴⁰) e um domínio catalítico, contendo um resíduo serina (S966) que reage com OP neuropáticos⁴¹. Um de seus substratos sintéticos, o valerato de fenila (PV)⁴², é altamente seletivo para NTE sendo de 74%¹⁷ em relação às outras esterases resistentes ao PNX.

A NTE atua sobre ésteres carboxílicos e é inibida por OP através do mecanismo geral de toda serina-esterase (Figura 2). O oxigênio do grupamento hidroxila do resíduo serina do sítio ativo da enzima faz um ataque nucleofílico ao átomo de carbono ou fósforo dos seus substratos naturais ou de organofosforados, respectivamente. Isso resulta na formação de um intermediário alquil-enzima e na liberação do radical alcoólico do substrato. Os compostos OP agem de maneira análoga aos substratos formando uma fosforil-enzima covalente com liberação de um grupo ligado ao fósforo. Se comparado com o intermediário alquil-enzima, a taxa de hidrólise da enzima fosforilada é muito menor do que quando comparada com a alquil-enzima. Assim, a enzima permanece inibida enquanto fosforilada¹⁵.

Entretanto, a NTE sofre uma segunda reação que parece estar essencialmente ligada ao aparecimento de OPIDN, e que a diferencia de outras serina-hidrolases, pois além de ocorrer muito rapidamente, há a transferência intramolecular (no caso de NTE inibida por DFP) do grupamento isopropil, formando um aduto com outro resíduo de aminoácido de NTE chamado sítio Z, ao invés de ser liberado para o meio reacional⁴¹.

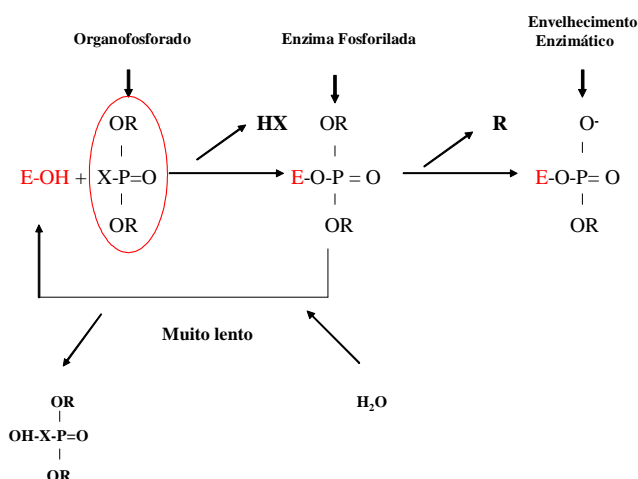


Figura 2 - Mecanismo de reação com substratos e inibidores

Fonte: Glynn, 2003⁴⁵

De uma maneira geral, a reação de *aging* resulta da perda de um dos grupamentos ligados ao átomo de fósforo o que deixa o resíduo de serina do sítio ativo da enzima ligado covalentemente a um radical mono-organo-fosforil carregado negativamente que é muito mais resistente à ação de agentes nucleofílicos, tais como as oximas, que agem desfosforilando e reativando a enzima. A taxa de *aging* da enzima fosforilada é dependente da natureza do grupamento R, geralmente sendo menor com grupamentos metil¹⁵. Os organofosfinatos, nos quais as substituições no fosfato estão diretamente ligadas ao átomo de fósforo, também reagem covalentemente com o sítio ativo serina mas não sofrem a reação de *aging*, sendo mais prontamente reativados por oximas⁴³.

A NTE é definida operacionalmente como a porção da atividade de hidrólise de valerato de fenila em homogeneizados de tecidos que é resistente ao etil-paraoxon (etPXN), um OP não neuropático, e sensível ao mipafox (MPX), um OP neuropático⁴². Em um ensaio diferencial pareado, alíquotas de uma mesma amostra são colocadas separadamente com etPXN (A) e com uma mistura de etPXN e MPX (B) e a atividade de NTE é calculada diminuindo A de B. Essa é a principal forma que tem sido usada para triagem de inseticidas OP com potencial neuropático¹⁶.

A função biológica da NTE ainda não é bem conhecida e, portanto, o mecanismo pelo qual se desenvolve a OPIDN é foco de uma grande indagação. Estudos recentes com sequenciamento de DNA complementar (cDNA) a partir de NTE humana, revelaram a existência de homologia com moscas, vermes e leveduras. Esses resultados indicam um papel em algum processo fundamental comum às células eucarióticas¹⁶. A localização celular de NTE é compatível com um papel no metabolismo de fosfolipídios de membrana. Segundo Glynn³², a NTE teria o papel de dealquilar a fosfatidilcolina, principal fosfolipídio das membranas eucarióticas, formando glicerofosfocolina e duas moléculas de ácido graxo. A colina (Cho) extracelular é levada para dentro da célula por transporte mediado por proteína e é fosforilada via colina-quinase. A fosfocolina (PCho) é condensada com a citidina trifosfato (CTP), mediada pela CTP-fosfocolina citidiltransferase para formar a citidina difosfocolina (CDP-Cho). A CDP-Cho reage com diacilglicerol, catalisado pela colina-fosfotransferase, formando a fosfatidilcolina, que é dealquilada pela NTE (NTE1 p em leveduras) formando glicerofosfocolina (GroPCho) e duas moléculas de ácido graxo (Figura 3)³⁶

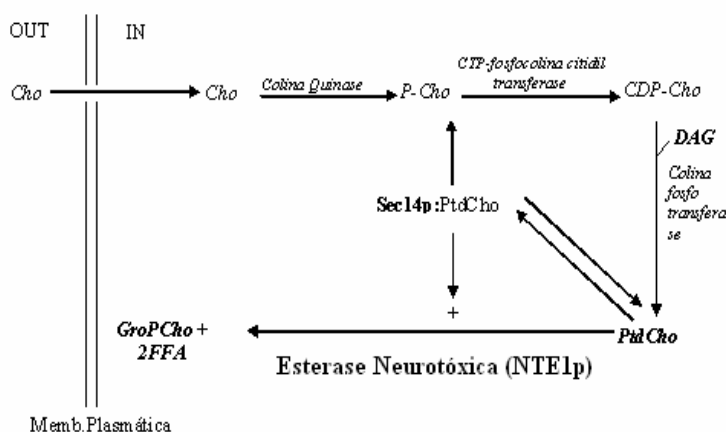


Figura 3 - Caminho de síntese e dealquilação de colina.

Fonte: Glynn, 2005³⁶

Estudos com camundongos knock-out^{44,45} com genótipo *nte*^{-/-}, nulo para a expressão dessa enzima, mostraram que a NTE tem função muito importante na embriogênese, sendo essencial para o desenvolvimento do embrião, uma vez que esse

camundongo morreu na metade da gestação por má formação da placenta. O camundongo heterozigoto apresentou redução de 50% na atividade de NTE, apesar de ter o desenvolvimento normal dos órgãos. A NTE se mostrou essencial no desenvolvimento da camada labiríntica e de células secundárias gigantes da placenta⁴⁴.

O provável evento molecular responsável pelo desenvolvimento de OPIDN é o desequilíbrio na homeostase fosfolipídica do retículo endoplasmático (RE) provocado pela inibição da atividade de NTE nos neurônios. Uma vez que todo o material destinado ao transporte axonal passa pelo RE, esse processo, inevitavelmente, está prejudicado com a inibição de NTE. Além disso, existe uma grande interdependência entre axônios e suas glias associadas e, portanto, um dano em uma dessas estruturas automaticamente teria um efeito deletério na outra⁴⁶. Isso explicaria, também, porque as partes distais dos nervos longos sofrem degeneração mais rapidamente do que outras, uma vez que o transporte axonal fica bloqueado, a reposição da NTE produzida no corpo celular do neurônio levaria mais tempo para atingir os axônios terminais, devido a grande distância entre o ponto de síntese e o local de reposição¹⁶.

Estudos evidenciam que a OPIDN pode ser evitada, ou até mesmo ter seu efeito minimizado, pelo tratamento com prednisona e complexos vitamínicos B. A prednisona é um hormônio sintético cortico-adrenal usado em processos inflamatórios. Já o complexo vitamínico B é muito utilizado na manutenção da saúde de nervos e das funções cerebrais²⁹.

Diante do fato de que o uso de agrotóxicos é uma realidade e de que ainda faltam biomarcadores acessíveis para avaliação do potencial neuropático de substâncias químicas, ressalta-se a importância de se agregar mais uma ferramenta, a inibição da NTE, às já existentes para a avaliação da exposição a OP, ou seja, a inibição de AChE e BChE.

Evidências mostram que a NTE, além de estar distribuída no sistema nervoso, também está presente no tecido linfático. Essa observação levou à idéia de que os linfócitos poderiam ser utilizados como um marcador biológico de exposição a OP causadores de OPIDN. A partir do protocolo *in vitro* criado por Johnson⁴², internacionalmente aceito, Bertocin⁴⁷ estabeleceu um protocolo utilizando linfócitos e mipafox como inibidor neuropático para a determinação de NTE.

2 OBJETIVOS

Implantação de uma metodologia que possa permitir a avaliação da exposição de trabalhadores rurais a pesticidas neurotóxicos de forma precoce auxiliando a prevenção de OPIDN.

2.1 Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo padronizar uma metodologia de determinação de NTE linfocitária, tendo por base a metodologia clássica para determinação de NTE.

2.2 Objetivos específicos

Coleta e processamento da amostra

- Avaliar a estocagem das células.
- Relacionar o número de células com a quantidade de proteínas totais

Dosagem de NTE

- Testar inibidores alternativos;
 - Avaliar a concentração de substrato;
 - Avaliar a reprodutibilidade da metodologia escolhida;
 - Avaliar os níveis de NTE linfocitária em voluntários saudáveis.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções e reagentes

3.1.1 Preparação da amostra

Tampão Tris-HCl: Trihidroxi-metil-aminometano 50mM contendo EDTA.Na₂ 0,2mM HCl pH 8,0 (tampão de análise);

PBS: Cloreto de sódio 137mM contendo fosfato monobásico de potássio 1,4mM, fosfato dibásico de sódio 10mM, cloreto de potássio 2,7mM e pH 6,8-7,4.

Ficoll: Ficoll-Histopaque Sigma, número de catálogo 1077

3.1.2 Determinação do teor de proteínas totais⁴⁸

CTC (Cobre-Tartarato-Carbonato): Carbonato de sódio 20% contendo tartarato de sódio e potássio 0,2% e sulfato de cobre pentahidratado 0,1%. Preparar o sulfato de cobre e adicioná-lo ao tartarato. A solução de carbonato de sódio deve ser adicionada lentamente à solução de sulfato-tartarato, sob agitação constante, para evitar a formação de precipitado.

SDS: Dodecil sulfato de sódio 10%.

NaOH: Hidróxido de sódio 0,8M.

Reagente de fenol: Reagente de Folin & Ciocalteu comercial a 2N.

Reagente A: Partes iguais de CTC, SDS, NaOH e água destilada.

Reagente B: Reagente de fenol diluído em água destilada na proporção 1:6

Padrão: Solução de albumina bovina segundo Cohn a 1mg/mL

3.1.3 Determinação segundo Johnson (NTE)

Tampão de análise: Trihidroxi-metil-aminometano (Tris) 50mM contendo EDTA.Na₂ 0,2mM, pH 8,0 com HCl;

Tampão citrato: Ácido cítrico 50mM, pH 6,0 com Tris;

PBS: Cloreto de sódio 137mM contendo fosfato monobásico de potássio 1,4mM, fosfato dibásico de sódio 10mM, cloreto de potássio 2,7mM e pH 6,8-7,4.

Substrato: Valerato de fenila disperso em dimetilformamida a 15mg/mL e disperso em Triton 0,03% na proporção de 1:30 em volume;

SDS: Dodecil sulfato de sódio 1% contendo aminoantipirina 0,025%;

Solução estoque de etPXN: etil-paraoxon 8mM em acetona;

Solução estoque de MPX: mipafox 10mM em Tampão 50mM Tris-citrato pH 6,0; (MPX foi gentilmente doado pelo Dr. Paul Glynn)

Ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) 0,4%.

3.1.4 Método alternativo (NTElike)

Tampão de análise: Trihidroxi-metil-aminometano (Tris) 57,12mM contendo EDTA.Na₂ 0,228mM, pH 8,0 com HCl;

Substrato: Valerato de fenila disperso em dimetilformamida a 15mg/mL e disperso em Triton 0,03% na proporção de 1:30 em volume;

Solução estoque de CPO: clorpirifós-oxon 2,8mM em metanol;

Solução estoque de mPXN: metil-paraoxon 1,5mM em metanol;

Ácido perclórico 0,3M;

Tampão de neutralização: Tris 1,71M pH 9,0 contendo aminoantipirina 0,025%;

Ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆): 0,4%.

3.2 Procedimentos

3.2.1 Preparação da amostra

Foram coletados 20ml de sangue venoso de cada doador em tubos tipo Vacutainer® com heparina. Ficoll-Histopaque foi colocado por 10 minutos em banho-maria a uma temperatura de 37°C. O sangue foi adicionado cuidadosamente com pipeta automática, de forma perpendicular à parede de tubos Falcon (tubos cônicos) contendo o Ficoll, respeitando a proporção 1:1 de sangue e Ficoll. Os tubos foram centrifugados (400g/30min/21°C) com rampa de aceleração suave (3 minutos e 40 segundos para o estabelecimento da velocidade máxima). Após a centrifugação, a interface opaca entre o plasma e o Ficoll foi aspirada e cuidadosamente transferida (aproximadamente 2,0mL) para outros tubos Falcon vazios. PBS foi adicionado na proporção de 5 vezes o volume de amostra, homogeneizando -se cuidadosamente por inversão. Após centrifugação (1000g/10min/21°C), o sobrenadante foi aspirado e descartado preservando-se um sedimento de cerca de 1,0mL por tubo. As células foram ressuspensas em 2,5 vezes o volume inicial de amostra com PBS e novamente homogeneizada por inversão. Esse último processo de lavagem foi repetido mais duas vezes, sendo o último sedimento levado exatamente 2,0mL com PBS. Uma alíquota de 1,0mL dessa suspensão de linfócitos" foi retirada para a dosagem de proteína e para a contagem de linfócitos e ao restante do sedimento (1mL) foram adicionados 2,0mL de tampão de análise para a lise das células. Essa preparação foi usada para a determinação de NTE.

3.2.2 Determinação do número de células

Uma alíquota da suspensão de linfócitos em PBS foi diluída 1:10 na mesma solução e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer.

3.2.3 Determinação do teor de proteínas totais⁴⁸

Foram adicionados 10µL e 100 µL do padrão de albumina (P10 e P100, respectivamente), em tubos contendo água destilada para um volume final de 1,0 mL. Uma alíquota de 50µL da suspensão de linfócitos em PBS foi utilizada para a determinação de proteína e levada a 1mL com água destilada. Em todos os tubos foram adicionados 1,0mL do reagente A. Após 10min, 0,5mL do reagente B foi adicionado a todos os tubos, sob intensa agitação. Após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 750nm.

A quantificação de proteína na amostra foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}) = (I \times A)^S;$$

$$S = \log (h / l) / \log (A750h / A750l);$$

$$I = \text{antilog} ((\log h) / S - \log A750h);$$

onde h e l são a maior e a menor quantidade do padrão de proteína, respectivamente 100 e 10µg, e A750h e A750l os seus respectivos valores de absorvância a 750nm.

3.2.4 Dosagem de NTE

3.2.4.1 Determinação segundo Johnson (NTE)

A NTE foi descrita por Johnson em 1969 como sendo a atividade de hidrólise de valerato de fenila sensível a 50µM de mipafox e resistente a 40µM de etil paraoxon, sendo a metodologia proposta pelo mesmo autor em 1977⁴² a mais usada até o momento. Nesse trabalho, as atividades indicadas como “NTE” foram obtidas por esse método, com a redução do volume final de dosagem de 7,0 para 3,5 ou 1,75mL. Uma metodologia alternativa, indicada como “NTElike”, também foi utilizada.

Em um tubo (A) foram adicionados: 200µL de preparação de linfócitos, 150µL de tampão de análise, 600 µL de tampão PBS, 5µL de etPXN e 45µL de tampão citrato. Em um outro tubo (B), foram adicionadas as mesmas quantidades de amostra, PBS, tampão de análise e de PXN mais 5µL de mipafox e 40µL de

tampão citrato. Essas condições garantem a inibição com 40 μ M de etPXN e 50 μ M de MPX. Os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria por 20 minutos. Depois do período de inibição, 1,0mL do substrato foi adicionado aos tubos A e B, que foram incubados da mesma forma por mais 15 minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram retirados do banho e a reação foi paralisada adicionando-se 1,0mL de solução de SDS. Em seguida, 500 μ L de ferricianeto de potássio foram adicionados gerando uma cor vermelha que foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510nm. Para cada amostra foi feito um branco, que continha todos os reagentes do ensaio porém com a amostra linfocitária sendo colocada depois do SDS e antes do revelador. A atividade de NTE foi calculada diminuindo a atividade no tubo A da atividade no tubo B utilizando-se 13900M⁻¹.cm⁻¹ como o valor para o Coeficiente de Absortividade Molar do produto corado formado⁴².

3.2.4.2 Método alternativo (NTElike)

No método alternativo de dosagem de NTE linfocitária foram feitas as seguintes modificações:

- (a) metil-paraoxon foi usado no lugar de etil-paraoxon;
- (b) clorpirifós-oxon foi usado no lugar do mipafox;
- (c) ácido perclórico, seguido de uma centrifugação, foi usado como paralisante da reação.^{49,50}

Em um tubo (A) foram adicionados: 200 μ L de preparação de linfócitos, 430 μ L de tampão de análise e 70 μ L de metanol contendo a quantidade de paraoxon (etPXN ou mPXN) necessária para atingir 40 μ M no meio de inibição. Em um outro tubo (B) foram adicionadas as mesmas quantidades de amostra, PBS, tampão de análise e de metanol contendo a mesma quantidade de paraoxon e a quantidade indicada de clorpirifós-oxon. Os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria por 20 minutos. Depois do período de inibição, 200 μ L do substrato foram adicionados aos tubos A e B, que foram incubados da mesma forma por mais 15 minutos.

Decorrido esse tempo, as amostras foram retiradas do banho e a reação foi paralisada pela adição de 300 μ L de ácido perclórico. Após passagem para Eppendorfs® e centrifugação (5min/12.000rpm em microcentrífuga), 1,0mL do sobrenadante foi coletado e colocado em tubo contendo 100 μ L de tampão de neutralização seguindo-se a adição de 100 μ L de ferricianeto, que gerou uma coloração vermelha que foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510nm. Para cada amostra foi feito um branco, que continha todos os reagentes do ensaio po-

rém com a amostra de linfócitos sendo colocada depois do ácido perclórico e antes do revelador. A atividade de NTE foi calculada diminuindo a atividade no tubo A da atividade no tubo B utilizando-se $13900\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ como o valor para o Coeficiente de Absortividade Molar do produto corado formado⁴².

3.3 Características da população analisada

A população estudada era composta de voluntários do CESTEH, adultos, saudáveis, sem doenças degenerativas do sistema nervoso, que não faziam uso de imunossupressores, com idade entre 18 e 60 anos e não expostos a nenhum tipo de praguicida neurotóxico em um período mínimo de 30 dias. Os voluntários foram informados do objeto da pesquisa e assinaram o termo de consentimento. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública sob protocolo de número 62/06.

4 RESULTADOS

Testes preliminares foram realizados na tentativa de implementar uma metodologia de dosagem de NTE menos laboriosa e mais aplicável ao trabalho de rotina. Os testes realizados foram: (a) a substituição dos inibidores, em especial do MPX, que não é vendido comercialmente, e que deve ser sintetizado no laboratório, e (b) a estocagem das preparações de linfócitos.

Por definição, NTE é uma esterase resistente ao etil-paraoxon (etPXN) e sensível ao MPX, mas existem outros OP descritos como inibidores de NTE. Nessa lógica, etPXN foi substituído por metil-paraoxon, já disponível no laboratório, e o MPX foi substituído por clorpirifós-oxon (CPO), que também estava disponível no laboratório e é fornecido comercialmente. Mas, com a troca de qualquer um dos inibidores que definem NTE, foi necessário introduzir o termo *NTElike* para as atividades medidas nessas condições. A concentração saturante de valerato de fenila (PV) não variou tendo mPXN ou mPXN e CPO como inibidores (Figura 4), tendo sido escolhida a concentração de 0,568mM para a determinação de *NTElike*.

O mPXN inibiu menos (62%) a atividade de hidrólise de valerato de fenila do que o etPXN (69%). Mesmo com essa diferença pequena na primeira inibição, a alteração da atividade de *NTElike* depois da inibição com CPO foi bastante significativa. O metanol, solvente do paraoxon, não inibiu a enzima quando presente na mesma concentração empregada na dosagem (Tabela 2). A concentração de CPO, 200 μ M, foi escolhida depois de uma curva de inibição (Figura 5).

A dosagem de NTE linfocitária é um processo que, normalmente, precisa ser realizado no dia da coleta do sangue total. A necessidade de transformar essa dosagem em um procedimento de campo, que possa tornar-se uma rotina, seria interessante dispor de algum tipo de estocagem. Para isso, foram testados alguns métodos de congelamento para as preparações de linfócito, conforme mostra a Tabela 3. O congelamento a -20°C em um período de dois a oito dias levou a uma perda de 70% da atividade enzimática. No congelamento a -170°C a perda foi de 19%. Esses resultados indicaram a impossibilidade de preservar a atividade da enzima por congelamento ficando estabelecida a determinação de NTE no mesmo dia da coleta do sangue.

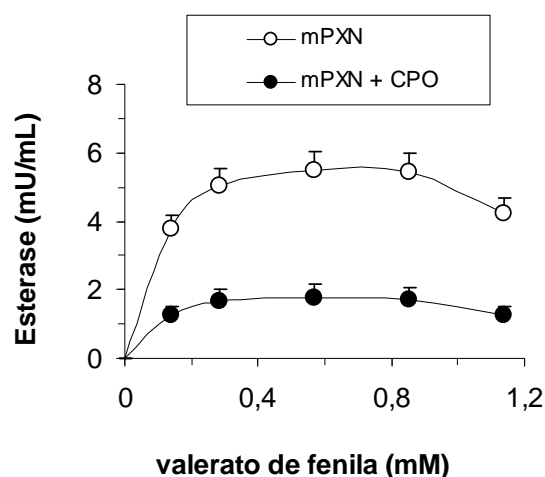


Figura 4 - Efeito da concentração do substrato na atividade de hidrólise de valerato de fenila de preparações de linfócito humanos.

Os círculos brancos representam a atividade na presença de 40 μ M de metil-paioxon (mPXN) e os círculos pretos a atividade na presença de 40 μ M de mPXN mais 200 μ M de clorpirifós-oxon (CPO). Todos os símbolos representam a média de 3 determinações independentes tendo por base a metodologia alternativa (NTElike) e a barra vertical um Desvio Padrão. (1U = 1 micromol de fenol/min).

Tabela 2 - Diferença do efeito inibidor de metil (mPXN) e etil-paioxon (etPXN) sobre a atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparações de linfócitos humanos.

Condição	Esterase (mU/mL)		
	Total	%	NTElike
Esterase total	13,70	0	
+ 10% de metanol	13,76	-0,4 ¹	
+ 10% de metanol + 40 μ M mPXN	5,26	62	
+ 10% de metanol + 40 μ M etPXN	4,20	69	
+ 10% de metanol + 40 μ M mPXN + 200 μ M CPO	1,99	85	3,27
+ 10% de metanol + 40 μ M etPXN + 200 μ M CPO	1,70	95	2,50

Todos os resultados representam a média de 3 determinações independentes.

¹Ativação em vez de inibição; 1U = 1 micromol de fenol/min

% = Percentagem de inibição em relação à atividade esterásica total;

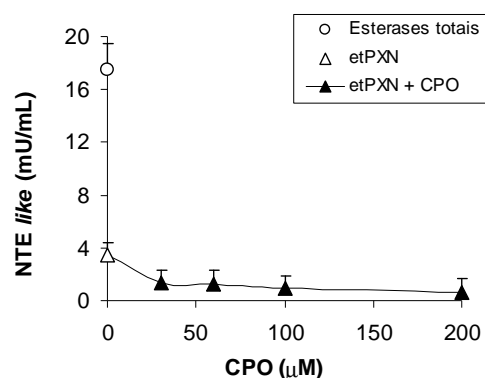


Figura 5 - Curva de inibição da atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparação de linfócito humano por clorpirifós-oxon (CPO) na presença de 40μM de etil-paraoxon (etPXN).

Os círculos brancos representam a atividade de hidrólise do substrato na ausência de inibidores (Esterases totais). Os triângulos brancos representam a atividade de hidrólise do substrato na presença de etPXN. Os triângulos pretos representam a atividade de hidrólise do substrato na presença de etPXN e diferentes concentrações de CPO. Todos os símbolos representam a média de 3 determinações independentes e a barra vertical um desvio padrão. (1U = 1 micromol de fenol/min).

Tabela 3 - Efeito do congelamento na atividade de hidrólise de valerato de fenila em preparações de linfócito humano.

Temperatura	Dias de Estocagem	Antes ¹ mU/mL	Depois ¹ mU/mL	Perda (%)
-20°C	2	8,66 ± 0,57	2,18 ± 0,73	75
-20°C	8	5,19 ± 0,48	1,54 ± 0,82	70
-170°C	6	6,96 ± 0,64	5,64 ± 0,67	19

Todos os resultados representam a média de 3 determinações independentes.

¹NTElike; 1U = 1 micromol de fenol/min.

A determinação de NTE_{like}, que emprega como inibidores mPXN e CPO, foi comparada com a metodologia descrita por Johnson em 1977⁴². A partir de uma mesma amostra de sangue, foram realizadas três determinações em triplicata para cada metodologia observando-se que a atividade de NTE foi muito maior do que a de NTE_{like} (Tabela 4). A determinação do fenol, produto formado pela hidrólise do valerato de fenila, é bastante diferente nas duas metodologias testadas. No sentido de avaliar não somente as diferenças entre MPX e CPO, esses inibidores foram comparados em um experimento tendo por base a determinação de NTE segundo Johnson. Os valores de atividades de NTE encontrados quando CPO foi utilizado no lugar de MPX foram diferentes, sendo ligeiramente maiores com CPO (Tabela 5). Isso implica em dizer que CPO inibe outras esterases além de NTE. A partir dessas observações, optou-se por utilizar a metodologia de Johnson³⁸ para a determinação de NTE.

[L1] Comentário: nanomol?

No sentido de diminuir o consumo de reagentes, o volume final de reação foi reduzido para a metade e para um quarto do volume original e foram realizadas dosagens de NTE de um mesmo paciente em dias diferentes, para que se pudesse avaliar a reprodutibilidade desse método com essas modificações. O coeficiente de variação da determinação de NTE foi muito menor com 3,5mL, metade do volume original descrito pelo autor, do que com 1,75mL de volume final, ficando estabelecido 3,5mL de volume final para a rotina (Tabela 6). Os níveis de proteínas totais das preparações de linfócitos foram utilizados para a correção da atividade, expressando-se os resultados em Unidades por grama de proteínas totais (U/g Ptn). Os limites de dosagem foram estabelecidos com uma curva de amostra, usando 1,75mL de volume final, sendo possível a determinação de atividades da ordem de 1mU (Figura 6).

A atividade de NTE foi determinada em uma população de 27 voluntários saudáveis. Os principais resultados das rotinas analíticas estão descritos na Tabela 7. As atividades foram normalizadas pelo teor de proteínas totais e pelo número de células das preparações de linfócitos. Não foram observadas diferenças significativas entre homens e mulheres (Tabela 8).

Tabela 4 - Comparação dos métodos de determinação de NTE.

	NTE	NTElike
Média ¹	6,18	1,84
DP	0,74	0,19
CV	11,9	10,5

¹Cada resultado representa a média de 3 determinações feitas no mesmo dia, em triplicata (N = 9), à partir de uma mesma amostra de sangue, expressas como U/g de proteínas totais.

NTE representa os níveis de atividade de hidrólise de valerato de fenila resistente ao etil-paroxon (etPXN) e sensível ao mipafox MPX, determinados segundo Johnson (1977). **NTElike** representa os níveis de atividade de hidrólise de valerato de fenila resistente ao metil-paroxon (mPXN) e sensível ao clorpirifós-oxon (CPO) determinados pela metodologia alternativa descrita em Material e Métodos. 1U é igual à quantidade de enzima que forma 1 micromol de produto por minuto.

Tabela 5 - Memória de cálculo da determinação de NTE substituindo MPX por CPO

etPXN			Leituras (mA)						Atividade	
			etPXN+MPX			etPXN+CPO			NTE (MPX)	NTE (CPO)
mA	Media	CV	mA	Media	CV	mA	Media	CV	mU/mL	mU/mL
171	180	9	73	71	7	39	43	5	9,2	11,5
184			65			43				
204			65			43				
182			70			44				
175			72			45				
219			78							
164										
182										
174										
162										
171										
168										

Leituras (mA) representam os valores de miliAbsorvância (**Média**) e o Coeficiente de Variação (**CV%**) das leituras espectrofotométricas, descontados os respectivos brancos, depois da incubação por 15min a 37°C de uma alíquota de 200µL das preparações de linfócitos na presença de 40µM de etil-paroxon (**etPXN**) e da mesma quantidade de amostra incubada pelo mesmo tempo na presença de uma mistura de 40µM de etil-paroxon e 50µM de mipafox (**etPXN + MPX**) e 40µM de etil-paroxon e 200µM de clorpirifós-oxon (**etPXN + CPO**). **Atividade NTE (MPX)** representa os níveis de atividade de hidrólise de valerato de fenila resistente ao etPXN e sensível ao MPX e **Atividade NTE (CPO)** representa os níveis de atividade de hidrólise de valerato de fenila resistente ao etPXN e sensível ao CPO, sendo 1U igual à quantidade de enzima que forma 1 micromol de produto por minuto. As determinações foram conduzidas tendo por base a determinação de NTE segundo Johnson (1977) com a substituição de MPX por CPO em uma mesma amostra.

Tabela 6 – Reprodutibilidade da determinação de NTE em preparações de linfócitos humanos

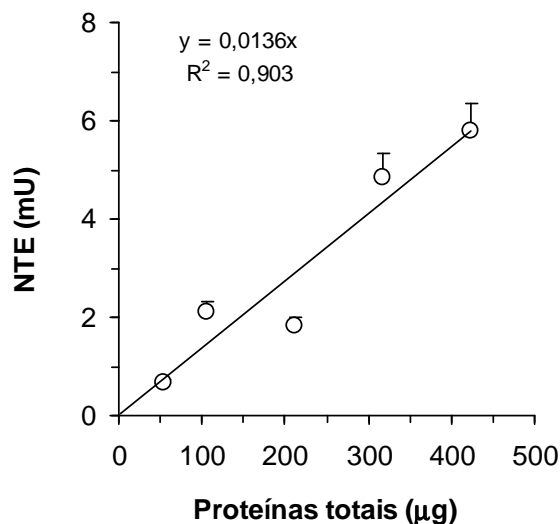
Data	Número de células ($\times 10^{-6}$)	Proteínas Totais (mg/mL)	N	NTE mU/mg Ptn	CV
19/10/06	1,93	0,82	4	12,3	9,2
26/10/06	1,12	1,06	15	13,2	19,3

N - Número de determinações feitas em triplicata, no mesmo dia, em diferentes alíquotas de uma mesma amostra de preparação de linfócitos de dois voluntários diferentes;

NTE - Média das determinações. 1U = 1 micromol de fenol/min;

CV - Coeficiente de Variação (%) dos resultados de NTE;

OBS – A amostra de 19/10/06 foi dosada com 3,5mL de volume final de dosagem (metade do volume indicado pelo autor) e a amostra do dia 26/10/06 foi dosada com 1,75mL de volume final de dosagem (um quarto do volume indicado pelo autor).

**Figura 6** - Efeito da quantidade de amostra na determinação de NTE.

NTE determinada em triplicata (Johnson, 1977), com volume final de 1,75mL. Proteínas totais pelo método Peterson em triplicata. Os círculos representam a Média e a barra vertical um Desvio Padrão.

Tabela 7 - Memória de cálculo das determinações de NTE em linfócitos humanos de 27 voluntários sadios.

Voluntários			Leituras (mA)				Atividade	Normalizadores			Atividade corrigida	
ID	Sexo	Idade	etPXN		etPXN+MPX		NTE	Ptn	Cels	NTE	NTE	
			Media	CV	Media	CV	mU/mL	mg/mL	10 ⁶ /mL	Ptn	Cels	
1	F	34	242	5	137	4	8,81	0,46	1,28	19,3	6,9	
2	M	52	204	9	98	4	8,90	0,41	1,75	21,9	5,1	
3	M	45	131	18	85	8	3,83	0,49	2,44	7,9	1,6	
4	F	20	187	3	106	7	6,76	0,73	3,44	9,2	2,0	
5	M	58	127	12	84	11	3,66	0,51	1,33	7,2	2,8	
6	F	22	169	3	80	4	7,53	0,38	1,42	19,6	5,3	
7	F	26	107	10	67	21	3,41	0,40	2,77	8,5	1,2	
8	M	22	205	3	186	22	1,58	0,44	0,91	3,6	1,7	
9	F	45	46	11	37	3	0,77	0,32	1,97	2,4	0,4	
10	F	20	54	18	24	5	2,51	1,04	0,20	2,4	12,8	
11	M	31	66	16	27	8	3,84	0,34	1,77	11,3	2,2	
12	F	34	145	3	129	9	1,39	1,13	5,50	1,2	0,3	
13	M	27	124	2	66	2	4,90	0,29	0,23	17,1	21,0	
14	F	26	66	12	37	22	2,43	0,48	1,90	5,0	1,3	
15	F	27	105	13	65	6	3,36	0,41	2,44	8,3	1,4	
16	M	62	131	6	76	5	4,66	0,33	1,76	14,3	2,6	
17	F	32	250	12	153	7	8,16	0,52	3,23	15,7	2,5	
18	M	27	208	3	113	11	8,01	0,37	2,26	21,9	3,5	
19	F	49	131	6	76	5	4,66	0,68	2,35	6,8	2,0	
20	F	37	79	1	27	20	4,34	0,23	0,33	18,9	13,4	
21	F	29	250	12	153	7	8,16	0,82	2,21	10,0	3,7	
22	F	25	208	3	113	11	8,01	1,29	3,97	6,2	2,0	
23	M	28	105	13	65	6	3,36	0,49	3,35	6,9	1,0	
24	M	31	190	3	123	8	5,67	0,42	2,15	13,5	2,6	
25	M	24	182	3	119	5	5,30	0,32	2,07	16,6	2,6	
26	M	38	223	9	152	1	5,95	0,40	2,03	14,7	2,9	
27	F	35	289	7	207	15	6,86	0,38	1,86	17,9	3,7	
Média		33,56	156		96		5,07	1,56	6,32	11,4	4,0	
DP		11,42	67		49		2,41	0,79	3,45	6,3	4,6	
CV		34	43		50		48	51	55	55	116	

Cada linha mostra os resultados de um voluntário.

Em **Voluntários** estão descritos: identificação (**ID**), sexo e idade dos 27 voluntários, sendo 15 mulheres (**F**) e 12 homens (**M**). **Leituras (mA)** representam os valores de miliAbsorvância (**Média**) e o Coeficiente de Variação (**CV%**) das 3 leituras espectrofotométricas, descontados os respectivos brancos, depois da incubação por 15min a 37°C de uma alíquota de 200µL das preparações de linfócitos na presença de 40µM de etil-paraoxon (**etPXN**) e da mesma quantidade de amostra incubada pelo mesmo tempo na presença de uma mistura de 40µM de etil-paraoxon e 50µM de mipafox (**etPXN + MPX**). **Atividade** representa os níveis de atividade de hidrólise de valerato de fenila resistente ao etPXN e sensível ao MPX, sendo 1U igual à quantidade de enzima que forma 1 micromol de produto por minuto (Johnson, 1977). **Normalizadores** indicam o nível de proteínas totais (**Ptn**) e o número de células (**Cels**) da preparação de linfócitos. **Atividade corrigida** indica os valores da atividade de NTE corrigidas pelos normalizadores indicados sendo **NTE Ptn** expressa como U/g e **NTE Cels** como U/10⁶células.

Tabela 8 - Dados estatísticos da atividade de NTE em linfócitos de 27 voluntários.

Parâmetro	Todos		Mulheres		Homens	
	NTE U/g Ptn	Idade	NTE U/g Ptn	Idade	NTE U/g Ptn	Idade
<i>Número de voluntários</i>	27		15		12	
Mínimo	1,20	20	1,20	20	3,60	22
Percentil 25%	6,80	26	5,00	25	7,55	27
Mediana	10,00	31	8,50	29	13,90	31
Percentil 75%	17,10	38	17,90	35	16,85	49
Máximo	21,90	62	19,60	49	21,90	62
Média ¹	11,42	33,6	10,09	30,7	13,08	37,1
Desvio Padrão	6,33	11,4	6,56	8,53	5,89	13,8
CV	55	34	65	28	45	37

¹Não existem diferenças significativas (teste *t*, *p* = 0,05) entre as médias para homens e mulheres, tanto para NTE quanto para idade;

1U = 1 micromol de fenol/min;

CV = Coeficiente de Variação (%).

5 DISCUSSÃO

A determinação da atividade de NTE está ligada à predição do aparecimento de OPIDN. A implementação de uma metodologia de dosagem de NTE em linfócitos humanos pode avaliar a exposição a agrotóxicos e detectar a possibilidade de OPIDN de forma precoce. Porém, a dosagem de NTE não é um procedimento simples, principalmente no que se refere à utilização de inibidores. A maior dificuldade está no fato do inibidor diferencial, o MPX, não estar disponível comercialmente, sendo obtido somente através da síntese no próprio laboratório^{53,55}.

A síntese de MPX é descrita por Johnson⁴², e é realizada em duas etapas:

(a) Reagir cautelosamente quatro mols de isopropalamina com um mol de oxicloreto de fósforo em tricloroetileno anidro;

(b) Em seguida, reação direta do produto formado dissolvido em tricloroetileno, sob agitação, com um pequeno excesso de uma solução saturada de fluoreto de potássio a 40-50°C.

O produto formado tem como características estar sob a forma de cristais brancos, ter ponto de fusão 61-62°C, e ser estável em temperatura ambiente na ausência de umidade.

Os produtos necessários à síntese encontram-se todos disponíveis comercialmente. Porém, sabendo-se que mipafox é um composto que causa permanente paralisia, sua preparação deve seguir cuidados mínimos de manipulação que, na maioria das vezes, só estão disponíveis em laboratórios de síntese orgânica. Dessa forma, optamos por não realizar a síntese de MPX que foi gentilmente doado pelo Dr. Paul Glynn da Universidade de Leicester na Inglaterra, o que possibilitou a implementação da técnica clássica de dosagem de NTE no laboratório de Toxicologia do CESTEHE.

Uma outra dificuldade, também inicialmente encontrada e descrita por alguns autores^{53,55}, está no fato de que o valerato de fenila, substrato mais comum para a NTE, muitas vezes também não se encontra disponível comercialmente, sendo também necessária a sua síntese.

Johnson⁴² também descreve a síntese do valerato de fenila, que é realizada a partir de uma única etapa:

(a) Reação direta de cloreto de valerila com excesso de fenol, a 100°C. O excesso de fenol é retirado com a adição de uma solução de éter de petróleo 60-80°C e uma lavagem com hidróxido de sódio 2N, seguido de lavagem com água. O excesso de água deve ser retirado com sulfato de sódio. Após evaporação do solvente, preparar uma solução a 15mg/mL em dimetilformamida que é estável durante meses se estocada a 15°C em local escuro.

A síntese de valerato de fenila (PV) foi a primeira etapa desse trabalho de modo a garantir os reagentes essenciais para a realização do ensaio de NTE. Os resultados não foram apresentados, pois não se caracterizou um objetivo produzir o PV em nosso laboratório. O procedimento foi realizado em caráter experimental da técnica de síntese, com a cooperação da Dra. Alessandra Valverde do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense.

Essa síntese teve algumas diferenças em relação às propostas de Johnson mas foi capaz de mostrar ser necessária uma aparelhagem relativamente simples para esse trabalho, como um condensador de refluxo e um destilador a vácuo, sem os riscos da síntese de MPX. Os reagentes necessários para a sua síntese estão disponíveis comercialmente. O produto final obtido foi realmente o valerato de fenila, como pode ser constatado posteriormente por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (resultados não-mostrados). Porém, o produto sintetizado não tinha pureza suficiente para ser utilizado como substrato no ensaio de NTE, sendo o PV utilizado nesse trabalho obtido comercialmente.

Esse substrato, quando hidrolisado pelas esterases, libera fenol. A quantidade de fenol é determinada colorimetricamente após sua conjugação oxidativa⁵⁰ com a 4-aminoantipirina na presença de ferricianeto de potássio, resultando em 4-N-(1,4-benzoquinoneimina)-antipirina, um cromóforo que tem absorção máxima no comprimento de onda de 510nm e um Coeficiente de Absortividade Molar⁴² de $13.9000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Considerando que a atividade de NTE só pode ser visualizada a partir de uma inibição diferencial, e que, de acordo com uma definição de NTE dada por Dudek e Richardson em 1982³⁷ e por Kropp em 2004³⁰, essa enzima é uma esterase resistente a inibidores não neuropáticos e sensíveis a inibidores neuropáticos, optou-se pela realização de testes iniciais para implementação do método de determinação de NTE com inibidores não neuropáticos (mPXN)⁵⁴ e neuropáticos

(CPO)⁵ disponíveis no laboratório. Essa atividade foi denominada *NTElike* por ter um comportamento muito semelhante ao da NTE, mesmo que por definição esses não sejam os dois inibidores clássicos para essa determinação. As duas metodologias utilizadas nesse trabalho, para a determinação do que chamamos de *NTElike* e para determinação de NTE, são baseadas em Johnson^{32,42}, respectivamente, e foram originalmente usadas para a determinação de NTE.

A primeira padronização da atividade de *NTElike* foi a concentração saturante do substrato valerato de fenila (PV). A Figura 4 mostra o efeito da concentração de PV sobre a atividade das esterases resistentes ao mPXN e ao CPO. A atividade de NTE só pode ser medida através de uma segunda inibição diferencial com um inibidor neuropático. Assim, na Figura 4, a curva que representa os resultados na presença de mPXN, ou seja, as esterases resistentes a esse inibidor presentes na preparação de linfócitos, mostra, efetivamente, o efeito da concentração do substrato sobre a atividade de NTE. Mas, essa curva também expressa as enzimas resistentes aos dois inibidores, mPXN e CPO, cuja atividade só é revelada na segunda curva, após inibição com CPO. As duas curvas indicam que 0,57mM de PV, concentração já utilizada para a determinação de NTE⁵⁶, também é saturante para a determinação de *NTElike*.

A NTE é uma serina hidrolase⁴¹ e, portanto, é capaz de hidrolisar diversas ligações, tais como ésteres, amidas e peptídeos, tornando-se difícil encontrar um substrato específico. Como foi possível visualizar na Figura 4, o substrato valerato de fenila, não é específico para NTE sendo hidrolisado por outras esterases presentes no sistema com a mesma afinidade. A tendência das duas curvas da Figura 4 (na presença de um e de dois inibidores) é muito semelhante e revela a inespecificidade desse substrato.

Estudos^{36,39,40,53,66} mostram que, na verdade, NTE é uma fosfolipase e, portanto, o substrato mais apropriado para a realização do ensaio seria um fosfolípido. A evidência dessa provável função fisiológica de NTE responde uma parte das questões relacionadas à escolha de substrato para essa determinação enzimática. O substrato inicialmente utilizado por Johnson⁶⁷ era o fenilacetato de fenila (PPA), posteriormente substituído pelo valerato de fenila (PV). Sendo NTE uma fosfolipase, é de se esperar uma maior afinidade por compostos hidrofóbicos. Logo, o acesso do substrato ao centro catalítico da enzima provavelmente é mais facilitado quando o substrato utilizado é o PV em vez do PPA. Uma demonstração da hidro-

fobicidade do PV é a necessidade da sua dispersão em água, não em uma solução, mas como uma emulsão com detergente, para que possa ser usado da determinação enzimática. Johnson⁶⁷ testou diversas concentrações de diferentes substratos, sempre acima do limite de solubilidade dessas substâncias, para que fossem alcançadas as maiores atividades. Os substratos hidrolisados mais rapidamente foram os ésteres de fenila.

Os resultados apresentados na Tabela 2 mostram o efeito dos inibidores escolhidos. Os testes iniciais foram realizados com mPXN, que, mesmo sendo um composto não neuropático^{54,67}, revelou que, em comparação com o etPXN, tem menor ação inibitória (7%) sobre as atividades das esterases totais. Segundo Johnson¹⁷, essas enzimas são irrelevantes mas precisam ser inibidas para que o ensaio possa ser realizado. Esse resultado vai de acordo com a literatura⁶⁷ que mostra que o aumento da natureza hidrofóbica dos substituintes de um alquil-fosfato aumenta seu poder de inibição. Segundo Johnson⁶⁷, mPXN e etPXN só inibem NTE em concentrações muito mais altas do que 40 μ M, que é a concentração utilizada na determinação dessa enzima. Assim, as diferenças encontradas entre mPXN e etPXN não devem ser atribuídas a uma inibição de NTE. Apesar dessa diferença ser pequena, como a literatura preconiza a utilização de etPXN, optou-se usar esse inibidor e abandonar o mPXN.

A utilização de um segundo inibidor se faz necessária para diferenciar a NTE do conjunto de esterases resistentes a compostos neuropáticos e não neuropáticos. A figura 5 mostra que a partir de 50 μ M de CPO já é possível observar uma inibição das esterases resistentes a CPO.

Esse resultado está em desacordo com Li⁵⁷ que, avaliando a ação de organofosforados sobre o crescimento celular e a formação de neuritos em células com propriedades neuronais, como forma preditiva de OPIDN, mostra que CPO na concentração de 200 μ M, próxima à concentração considerada citotóxica, não conseguiu inibir mais do que 50% desses processos. Esses resultados indicam que CPO não teria ação neuropática. Da mesma forma, Kroop⁵⁸ mostrou que a concentração de CPO necessária para inibir 50% da atividade de NTE em cérebro de galinha é 20 vezes maior do que a concentração de MPX. Apesar disso, a concentração de 50 μ M de CPO mostrou ter efeito inibitório de toda a atividade de NTElike (Figura 5). Mesmo assim, considerando que a potência inibitória do CPO sobre NTE, como

mostra a literatura^{57, 58}, é 20 vezes menor do que a de MPX, estabeleceu-se a concentração de 200µM de CPO como ideal para ser utilizada no ensaio de NTE_{like}.

Diversos estudos^{37,47,55,59} mostram que é possível a utilização de linfócitos como matriz para a dosagem de NTE e que esta atividade nos linfócitos está correlacionada com a atividade de NTE cerebral. A implementação da técnica de determinação de NTE em linfócitos, para utilização como bioindicador, requer inicialmente a separação de linfócitos a partir do sangue total. Porém, a técnica desse procedimento é um pouco demorada e necessita de pessoal com conhecimento técnico específico, o que impede, muitas vezes, que sejam realizadas muitas análises diariamente. O estudo de um método de estocagem visou aumentar o número de análises simultâneas, assim como, eventualmente, transportar os linfócitos já separados de trabalhadores ou pessoas expostas para determinação de NTE no laboratório. Como mostra a Tabela 3, a amostra de linfócito congelada a -20°C, sem nenhum tratamento prévio, teve uma perda de 75% na atividade de NTE após dois dias de estocagem. Bertoncin⁴⁷ descreve uma perda de 20% da atividade, mesmo com tratamento da amostra com glicerol, após três dias nessa mesma temperatura. A menor conservação que foi observada com as nossas amostras provavelmente deve-se ao não tratamento prévio. Quando a amostra foi congelada a -170°C a perda foi um pouco menor, de 19%, mesmo em um período de seis dias. Maroni⁶⁰ e Schwab⁵⁵ também demonstraram uma perda de cerca de 33% da atividade em amostras congeladas a 80°C com glicerol. Bertoncin⁴⁷ indica a possibilidade de um congelamento de até 30 dias a -80°C sem alteração da atividade de NTE. Assim como mostrou Sigolaeva⁵⁶, não foi possível garantir uma estocagem eficaz das preparações de linfócitos, o que traz várias limitações no uso de NTE como bioindicador.

Os resultados apresentados até o momento foram obtidos sem o uso de MPX, na tentativa de contornar os problemas de síntese desse inibidor. Além disso, foi utilizada a metodologia que previa a paralisação da reação enzimática com ácido perclórico³², centrifugação e neutralização da acidez com adição de tampão. Johnson em 1977⁴² propôs a paralisação da reação por adição de SDS, que além de paralisar a reação clareia o meio reacional sem necessidade de centrifugação. A extinção destas etapas melhorou do ponto de vista prático, a utilização do método e principalmente sua implementação na rotina. Como nossos resultados indicaram dificuldades no uso de inibidores alternativos, uma amostra de MPX foi conseguida por doação permitindo a comparação das duas metodologias descritas nesse

trabalho. A Tabela 4 mostra que essas duas metodologias geram resultados diferentes para uma mesma amostra. É necessário ressaltar que a atividade de NTElike não necessariamente precisa ser igual a de NTE já que os inibidores são diferentes e inibem as esterases presentes no linfócito de forma diferente, conforme já mostrado. Mas, tendo agora acesso aos inibidores que definem NTE, optou-se por continuar o trabalho com uma metodologia internacionalmente aceita¹⁶.

Segundo Kayyali⁵⁰, a mudança na etapa de paralisação, proposta por Johnson⁴², sem mudar o Coeficiente de Absortividade Molar (ϵ) do cromóforo, pode levar a erros de quantificação do fenol produzido. Com a presença do detergente (SDS), o comprimento de onda deveria ter sido alterado de 510 para 490nm. Essa variação é devida à redução da atividade de água do meio reacional mas, mesmo assim, a utilização da metodologia de Johnson⁴² se mostrou mais apropriada para implementação de uma rotina, uma vez que tem menos etapas intermediárias, como transferência de amostras e centrifugação, o que diminui o tempo da análise, e a introdução de artefatos.

Talvez a única dificuldade encontrada na metodologia de Johnson⁴² está justamente no uso do SDS. Esse reagente mostrou ser uma possível etapa limitante do processo, principalmente se sua qualidade não for muito boa. Podem ocorrer grumos causando turbidez no meio reacional. Além disso, temperaturas ambientes muito baixas podem induzir a formação de micelas sendo necessário o aquecimento do meio reacional para que fique límpido. Mesmo assim, o método de Johnson⁴², que introduz o SDS como paralisante, mostrou ser mais adequado para uso em rotinas de avaliação clínica.

O uso de CPO como inibidor seletivo de NTE foi avaliado tendo por base a metodologia clássica de determinação de NTE. Os resultados da Tabela 5 indicam que o CPO inibe mais que o MPX, indicando que outras enzimas, que seriam resistentes ao MPX, estão sendo inibidas. Mesmo assim, a diferença foi muito pequena o que permite considerar o uso desse inibidor na construção de uma metodologia alternativa. Para a melhor avaliação de CPO como inibidor diferencial na determinação de NTE como um bioindicador de OPIDN seria necessária a aplicação das duas técnicas em duas populações, uma exposta e outra não, aliada a uma bateria de testes que confirmassem essa exposição. O diagnóstico dos casos de aparecimento de OPIDN são raros, e entre um dos principais fatores está a dificuldade da

realização do ensaio laboratorial de NTE, principalmente devido à limitação quanto ao uso de MPX.

Reinders⁶¹ mostrou, em estudos *in vitro* de inibição de NTE usando análogos de leptofós-oxon, que também é um potente inibidor de NTE, que CPO inibe, além de NTE, um grupo de esterases que hidrolisam PV e são insensíveis a MPX. Essa inibição, além de NTE, seria responsável por gerar um erro na hora de expressar a atividade enzimática. Seriam necessários estudos mais precisos para determinar que compostos inibiriam as esterases resistentes ao MPX, e determinar qual seria esta atividade residual, para que o valor de NTE pudesse ser corrigido.

Outro fator que contribui para a dificuldade do diagnóstico de OPIDN é descobrir a origem da polineuropatia que, muitas vezes, pode ter a causa confundida com diversas doenças, como diabetes⁶⁸, por exemplo. Por isso é importante que, juntamente com o aparecimento dos sintomas, sejam levantadas as substâncias envolvidas no quadro de intoxicação e seu histórico como possível composto neuropático, além da avaliação da inibição enzimática de NTE. Normalmente, o aparecimento de OPIDN é precedido de uma exposição aguda a algum composto que tenha potencial neuropático^{17,63,64}. Passada a fase crítica, o paciente tende a apresentar uma melhora no quadro devido, principalmente, ao tratamento dos sintomas colinérgicos mas começa a apresentar os primeiros sintomas de polineuropatia tardia após 15 dias da exposição.

A reprodutibilidade do método, outro problema crítico nesse tipo de método, foi avaliada em dois voluntários com determinação de NTE em triplicata, sendo uma das replicatas feita com um quarto do valor usado por Johnson⁴² e outra com a metade, como mostra a Tabela 6. A intenção foi testar a possibilidade de usar uma menor quantidade de reagentes sem interferir na precisão do método. O coeficiente de Variação (CV) ficou na faixa de 9,2 a 19,3%. O maior CV foi observado na metodologia com um quarto do volume (1,75mL). Utilizando metade do volume proposto (3,5mL), a variabilidade intra-ensaio foi mais compatível com um método de avaliação clínica tendo sido estabelecido esse volume para os testes com uma população de voluntários sadios. Mutch⁶⁵ indica um CV de 17% para a determinação de NTE linfocitária utilizando o mesmo método. Além disso, esse autor demonstrou que a repetição da determinação de NTE linfocitária em 5 indivíduos em quatro momentos diferentes levou a uma variação de 22,3% no CV da

dosagem dessa enzima em cada indivíduo. Isso indica o quanto é difícil o estabelecimento de valores normais em uma população.

O efeito da quantidade de amostra no ensaio de NTE foi avaliado em uma preparação de linfócitos com 1,06mg/mL de proteína totais, indicando uma boa correlação entre a quantidade de proteína e a atividade de NTE. Resultados equivalentes foram obtidos com 1,75 e 3,5mL de volume final (Figura 6) permitindo concluir que a metodologia proposta nesse trabalho é capaz de medir quantidades de NTE da ordem de 1mU com o volume final de 1,75mL. Esses resultados são compatíveis com os observados por Maroni⁶⁰ que indica proporcionalidade à partir de 3,0mU.

Foram determinadas as atividades de NTE em preparações de linfócitos de 27 voluntários saudáveis como um teste para a implantação de uma rotina de uso dessa técnica como um bioindicador para OPIDN. As atividades observadas variaram de 1,2 a 21,9U/g de proteína, com um valor médio de 11,4U/g (Tabela 7).

Mutch⁶⁵, avaliando NTE linfocitária em 113 indivíduos saudáveis, indica uma faixa de variação de 2,5 a 16,2U/g de proteínas com uma mediana de 7U/g. Já Maroni⁶⁰, avaliando 68 homens saudáveis, encontrou $13,34 \pm 2,42$ U/g de proteínas para a NTE linfocitária. Bertoncini⁴⁷, avaliando 108 pessoas saudáveis, encontrou o valor de $11,5 \pm 2,5$ U/g de proteínas para a determinação dessa enzima. Com base nesses resultados, podemos concluir que a metodologia implantada gera resultados compatíveis com a literatura. Precisa ser ressaltado que a faixa de normalidade indicada por Mutch demonstra uma grande variação dessa determinação em uma população saudável. Maroni e Bertoncini indicam faixas mais estreitas, com CV de 18 e 22% respectivamente. Outros autores⁵ fazem referência a esses resultados na indicação da faixa de normalidade para NTE linfocitária.

Mas, algumas dificuldades devem ser apontadas quanto ao valor de normalidade para a NTE linfocitária humana. Poucos trabalhos foram realizados em termos de população para que fosse estabelecida uma faixa internacionalmente aceita de normalidade. Além disso, trabalhos realizados com modelos animais^{34,69}, indicam ser necessária a inibição de pelo menos 70% da atividade da NTE cerebral para que possam começar a serem observados os sintomas de OPIDN. Sabendo-se que é necessário a reação de “aging” para que esses sintomas apareçam, não é possível indicar somente a inibição de NTE como causa para o aparecimento do OPIDN. Mas,

mesmo assim, como ferramenta de bioindicação, podemos considerar que toda e qualquer inibição de NTE indica um potencial de geração da doença.

Além disso, tendo em vista a complexidade dessa determinação, muitos são os fatores que podem introduzir erros analíticos. Os processos de contagem de células ou de determinação de proteínas na preparação final podem alterar resultados que, de fato, deveriam ser iguais ou muito próximos. Mas, por outro lado, não é possível estabelecer os valores normais de NTE sem um parâmetro de normalização para a preparação de linfócitos, já que essa não é uma matriz biológica naturalmente presente nos indivíduos. Além disso, é necessário considerar a possível variação do teor dessa enzima na população, somados aos possíveis erros analíticos.

Em um estudo⁵⁹ com trabalhadores expostos a clorpirifós, o grupo controle (n=30) apresentou atividade normal variando de 1 a 7,3U/g de proteínas, sendo a atividade média do 3,75U/g. O grupo exposto apresentou atividade média de 5,06U/g proteínas, indicando não uma inibição mas um aumento na atividade de NTE linfocitária. Isso pode refletir uma resposta adaptativa do organismo à exposição à organofosforados, fazendo com que os linfócitos danificados sejam retirados da circulação, selecionando uma sub população de linfócitos mais resistentes e com NTE ativa⁶⁵. Portanto, são estritamente necessários estudos com subpopulações de linfócitos para que se estabelecer os limites a serem considerados normais.

Maroni⁶⁰ sugere a utilização de plaquetas como matriz mais apropriada para a dosagem de NTE, já que apresenta menos contaminação e requer um volume menor de sangue total para ser obtida. Porém, as plaquetas não representariam, verdadeiramente, uma exposição a OP neuropáticos visto que seu tempo de vida na circulação é de 10 dias, enquanto os linfócitos podem durar até alguns meses. Por isso, apesar do extenso trabalho de separação de linfócitos, essa ainda parece ser a melhor matriz a ser utilizada em humanos.

A contagem manual de linfócitos é um processo trabalhoso e que requer habilidade por parte do analista. Porém, alguns laboratórios já dispõem de equipamentos analíticos que transformam essa contagem em um método simples e de rotina. A dosagem de proteínas totais, no entanto, é um procedimento mais simples e que tem uma boa reprodutibilidade⁴⁸. Nesse trabalho, adotamos a normalização da atividade de NTE linfocitária pelo teor de proteínas totais das preparações que, apesar de ter

apresentado um coeficiente de variação muito alto, se mostrou melhor do que a normalização por número de células, como mostrou Bertocin⁴⁷.

Na Figura 7, descrita a seguir, é possível ver a falta de correlação entre a quantidade de proteínas totais e o número de células nas 27 determinações apresentadas na Tabela 7. Outros autores também indicaram não ser possível estabelecer uma correlação entre o número de linfócitos e a quantidade de proteínas^{47,60}. Esses autores sugerem que a contagem de células, nas preparações de linfócitos, tem uma variação muito grande, que vai muito além da variação interindividual⁶⁵.

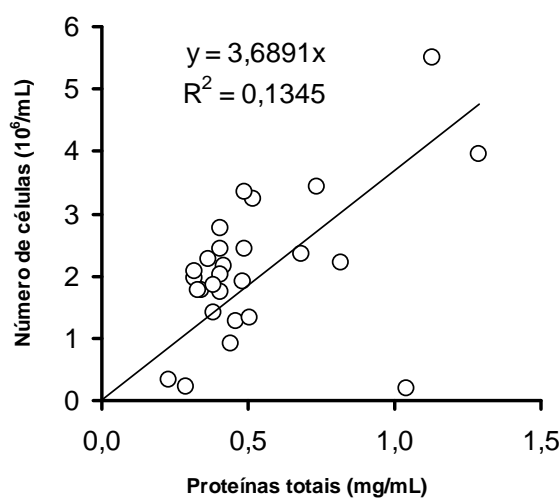


Figura 7 - Relação entre o número de células e o teor de proteínas totais em preparações de linfócitos humanos

Os círculos representam o número de células, determinado em Câmara de Neubauer com a contagem de pelo menos 8 campos, e o teor de proteínas totais, determinado em triplicata pelo método de Peterson, em 27 preparações de linfócitos humanos de doadores voluntários.

A presença de NTE em vários tipos de tecido, incluindo o linfático³⁷, permite a determinação dessa enzima em linfócitos como forma de prevenção do possível aparecimento de OPIDN. Porém, essa determinação não traduz os eventos moleculares responsáveis pela patogênese de OPIDN. Não há nenhuma indicação de como a inibição de NTE linfocitária possa fazer parte desse processo, principalmente porque a função fisiológica de NTE^{36,53,70} ainda não está completamente esclarecida.

A evidência de que a NTE é uma fosfolipase^{39,40,53,66} pode trazer algumas considerações importantes a respeito do desenvolvimento de OPIDN. Os humanos possuem mais de 100 hidrolases lipídicas, podendo ocorrer mais de uma isoforma em uma mesma célula. A lisolecitina, conhecida como lisofosfatidilcolina, é um produto de hidrólise da fosfatidilcolina e está presente na membrana celular de muitos tecidos, incluindo o nervoso. O aumento desse tipo de lisofosfolípídeo na membrana é responsável pela desmielinização das bainhas neuronais, acompanhada de lesões axonais. Segundo Quistad⁷¹, a inibição de NTE causaria um aumento localizado dos níveis de lisolecitina o que pode contribuir para o aparecimento de OPIDN em humanos.

Ainda relacionado à patogênese de OPIDN, Choudhary⁷⁰ sugere que o acúmulo de proteínas do citoesqueleto, tais como microtúbulos e neurofilamentos, prejudica o transporte e aumenta a degeneração axonal. Uma forma de tratamento sugerida é a utilização de bloqueadores de cálcio, uma vez que ele estaria envolvido na regulação da dinâmica dos microtúbulos. A diminuição do cálcio intracelular impediria a fosforilação de proteínas quinases associadas aos microtúbulos, evitando assim seu acúmulo.

Já Glynn¹⁶ sugere o desequilíbrio na homeostase fosfolipídica das membranas do retículo endoplasmático (RE) como sendo o principal produto da inibição da atividade de NTE nos neurônios. Uma vez que todo o material destinado ao transporte axonal passa pelo RE, esse processo, inevitavelmente, está prejudicado com a inibição de NTE.

Diante das diversas possibilidades das causas de OPIDN, os linfócitos não poderiam ser considerados biomarcadores de efeito, mas sim de exposição. Eles indicariam a exposição a um composto com potencial neuropático de forma qualitativa, sendo necessário, também, conhecer previamente o histórico dos compostos envolvidos na exposição assim como utilizar outros biomarcadores para exposição a OP com valores de normalidade estabelecidos.

O ideal seria que as atividades de NTE pudessem ser avaliadas em trabalhadores expostos e não expostos, ou ainda, utilizando o próprio indivíduo como seu controle, visto a dificuldade no estabelecimento de um valor de normalidade.

6 CONCLUSÕES

- Não é possível, para a determinação de NTE em linfócitos, a substituição dos inibidores etPXN e MPX por mPXN e CPO, respectivamente, mesmo sendo esses compostos exemplos de inibidores não neuropático e neuropático, respectivamente, pois os níveis de inibição são diferentes.
 - Não é possível a preservação da atividade de NTE linfocitária através do congelamento o que obriga que a determinação de NTE seja feita no mesmo dia da coleta do sangue.
 - A paralisação da reação enzimática com SDS, eliminando a etapa de centrifugação quando do uso de ácido perclórico, garante melhores resultados e acelera o processo de dosagem.
 - A reprodutibilidade da determinação de NTE em preparações de linfócitos humanos indicada nesse trabalho foi semelhante à descrita na literatura, apesar de ser muito baixa para um método de aplicação clínica.
 - A atividade de NTE linfocitária em uma população de 27 voluntários saudáveis variou de 1,20 a 21,90U/g de proteína, com média de 11,4 e desvio padrão de 6,3U/g, não sendo observadas diferenças significativas entre homens e mulheres.
 - Não houve correlação entre o número de células e a quantidade de proteína das preparações de linfócitos humanos, sendo mais adequada a normalização pela quantidade de proteína por ser uma determinação com menor variação.
 - A implementação da dosagem de NTE em linfócitos humanos foi alcançada mas devem ser melhor estudados os fatores que possam introduzir erros analíticos de modo a confirmar as altas variações encontradas em uma população não exposta.
-

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ecobichon DJ. Toxic Effects Of Pesticides. In: Curtis D. Klaassen Ed. Casarett and Doull's. Toxicology: The Basic Science of Poisons. New York: Ed. McGraw-Hill Professional; 2001.p. 506-512.
 - 2- Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 2003; 12:345-363.
 - 3- Nauen R, Bretschneider T. New modes of action of insecticides. *Pestic. Outlook* 2002;13: 241-245
 - 4- Aldridge WN. The esterases: perspectives and problems. *Chemico-Biological Interactions* 1993;87:5-13.
 - 5- Lotti M, Moretto A, Zoppellari R, Dainese R, Rizzuto N, Barusco G. Inhibition of lymphocytic neuropathy target esterase predicts the development of organophosphate-induced delayed polyneuropathy. *Arch. Toxicol* 1986; 59: 176-179.
 - 6- Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Hardman, J.G., Limbird, L. E. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Editora Mc Graw-Hill; 2001.p. 175-91.
 - 7- Casida J, Quistad GB. Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 2004; 17 (Pt 8):983-998.
 - 8- Brown JH. and Taylor P. (2001) – Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: Hardman, J.G., Limbird, L. E. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: Editora Mc Graw-Hill; 2001. p 184.
 - 9- Bardin PG, van Eeden SF, Moolman, JA. Organophosphate and carbamate poisoning. *Arch Intern. Med.*1994; 154: (Pt 13): 1433-1441.
 - 10- Senanayake, N, and Karalliedde, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. *N Engl J Méd.* 1987; 316(Pt 13):761-763.
 - 11- Sudakin DL, Mullins ME, Horowitz BZ, Abshier V, Letzig L. Intermediate syndrome after malathion ingestion despite continuous infusion of pralidoxime. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38 (Pt 1): 47-50
 - 12- Xie M, Yang D, Matoney L, Yan B. Rat NTE-related esterase is a membrane-associated protein, hydrolyzes phenyl valerate, and interacts with diisopropylfluorophosphate through a serine catalytic machinery. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003; 416:137-146.
-

- 13- Ecobichon DJ. Organophosphorus ester insecticides. In: Ecobichon DJ, Joy RM. *Pesticides and Neurological Diseases.*, Boca Raton, Florida: CRC Press Editora; 1982. p.151-203.
 - 14- Smith MI, Lillie RD. The histopathology of triorthocresyl phosphate poisoning. The etiology of so-called ginger paralysis (third report). *Arch Neurol Psychiatry* 1931; 26: 976-992.
 - 15- Glynn P. Neural development and neurodegeneration: two faces of Neuropathy Target Esterase. *Progress in Neurobiology* 2000; 61:61-74.
 - 16- Glynn P. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy. *Toxicology Letters* 2006; 162: 94-97.
 - 17- Johnson MK. Sensitivity and selectivity of compounds interacting with neuropathy target esterase. Further structure-activity studies. *Biochemical Pharmacology* 1988; 37 (Pt 21):4095-4104.
 - 18- Abou-Donia MB, Lapadula DM. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: Type I and Type II. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1990; 30:405-440.
 - 19- Abou-Donia MB. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Archives of Environmental Health*, 2003; 58:484-497.
 - 20- McConnell R, Delgado-Téllez E, Cuadra R, et al. Organophosphate neuropathy due to methamidophos: biochemical and neurophysiological markers. *Arch. Toxicol.* 1999. 73.
 - 21- Sparks SE., Quistad GB, and Casida, J.E. Organophosphorus pesticide-induced butyrylcholinesterase inhibition and potentiation of succinylcholine toxicity in mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol* 1999; 13: 113-118.
 - 22- Herschman Z, Aaron C. Prolongation of cocaine effect. *Anesthesiology* 1991; 74: 631-632.
 - 23- Hoffman RS, Henry GC, Wax PM. Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 263: 698-702.
 - 24- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acide amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 2002; 66:201-210.
 - 25- Quistad GB, Sparks SE, Casida JE. Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 173:48-55.
 - 26- Deutsch DG, Omeir R, Arreaza G, Salehani D, Prestwich GD, Huang Z, et al. Methyl arachidonyl fluorophosphate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol* 1997; 53:255-260.
-

- 27- Deutsch DG, Lin S, Hill WAG, Morse, KL, Salehani D, Arreaza G, et al. Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:217-221.
 - 28- Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG. Increased mortality, hypoactivity and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5780-5785.
 - 29- Piao F, Ma N, Yamamoto H. Effects of prednisolone and complex of vitamin B1, B2, B6 and B12 on organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity. *Journal of Occupational Health* 2004; 46: 359-364.
 - 30- Kropp TJ, Glynn P, Richardson R. The mipafox-inhibited catalytic domain of human neuropathy target esterase ages by reversible proton loss. *Biochemistry* 2004. 43: 3716-3722.
 - 31- Petroianu G, Toomes HM, Rufer R. High-doses intravenous paraoxon exposure does not cause organophosphate-induced delayed neuropathy (OPIDN) in mini pigs. *Journal of Applied Toxicology*, 2001. 21:263-268.
 - 32- Johnson MK. The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. Identification of the phosphorylation site as an esterase. *Biochemical Journal*, 1969. 114:711-717.
 - 33- Céspedes MV, Escudero JB, Sogorb MA. Discrimination of carboxylesterases of chicken neural tissue by inhibition with a neuropathic, non-neuropathic organophosphorus compounds and neuropathy promoter. *Chemico-Biological Interactions* 1997. 106:191-200.
 - 34- Lotti M, Moretto A, Capodicasa E. Interactions between neuropathy target esterase and its inhibitors and development of polyneuropathy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1993. 122: 165-171.
 - 35- Johnson MK. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochemical Journal* 1969. 111:487-495.
 - 36- Glynn P. Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1736:87-93. Review.
 - 37- Dudek BR, Richardson RJ. Evidence for the existence of neurotoxic esterase in neural and lymphatic tissue of the adult hen. *Biochemical Pharmacology* 1982; 31 (Pt 6): 1117-1121.
 - 38- Li Y:Dinsdale D, Glynn P. Protein domains, catalytic activity, and subcellular distribution of neuropathy target esterase in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278 (Pt 10): 8820-8825.
 - 39- Atkins J, Luthjens LH, Hom ML. Monomers of the catalytic domain of human neuropathy target esterase are active in the presence of phospholipid. *Biochem J* 2002; 361: 119-123.
-

- 40- Van Tienhoven M, Atkins J, Glynn P. Human neuropathy target esterase catalyzes hydrolysis of membrane lipids. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 20942-20948.
 - 41- Atkins J, Glynn P. Membrane association of and critical residues in the catalytic domain of human neuropathy target esterase. *J Biol Chem* 2000; 275:24477-24483.
 - 42- Johnson MK. Improved assay of neurotoxic esterase for screening organophosphates for delayed neurotoxicity potential. *Arch Toxicol* 1977; 37:113-115.
 - 43- Aldridge WN, Reiner E. Enzyme inhibitors as substrates. Interactions of esterases with Ester of organophosphorus and carbamic acids. North-Holland, Amsterdam (Front Biol. 26)
 - 44- Moser M, Li Y, Vaupel K, Kretzschmar D, Kludge R, Glynn P, et al. Placental failure and impaired vasculogenesis result in embryonic lethality for neuropathy target esterase-deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24 (Pt 4):1667-1679.
 - 45- Glynn P. NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? *BioEssays* 2003; 25:742-745.
 - 46- Edgar JM, Garbern J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res* 2004; 76:593-598.
 - 47- Bertoncin D, Russolo A, Caroli S, Lotti M. Neuropathy Target Esterase in Human Lymphocytes. *Arch Environ Health* 1985; 40 (Pt 3):139-143;
 - 48- Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry* 1977; 83: 346-356.
 - 49- Johnson MK. The delayed neuropathy caused by some organophosphorus esters: mechanism and challenge. *Crit. Rev. Toxicol.* 1975; 3:289-316.
 - 50- Kayyali US, Moore TB, Randall JC, Richardson RJ. Neurotoxic esterase (NTE) assay: optimized conditions base don detergent-induced shifts in the phenol/4-aminoantipyrine chromophore spectrum. *Journal of Analytical Toxicology* 1991; 15:86-89.
 - 51- Moretto A, Lotti M. Organ distribution of neuropathy target esterase in man. *Biochem. Pharm.* 1988; 37(15):3041-3043.
 - 52- Oliveira GH, Moreira V, Goes SR. Organophosphate induced delayed neuropathy in genetically dissimilar chickens: studies with tri-ortho-cresyl-phosphate (TOCP) e trichlorfon. *Toxicology Letters*, 2002.136: 143-150.
-

- 53- Chen R, Chang PA, Liong DX et al. G protein β 2 subunit interacts directly with neuropathy target esterase and regulates its activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007. 39:124-132.
 - 54- Ohkawa H, Oshita H, Miyamoto J. Comparison of inhibition activity of various organophosphorus compounds against acetylcholinesterase and neurotoxic esterase of hens with respect to delayed neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology*, 1980. 29:2721-2727.
 - 55- Schwab BW, Richardson RJ. Lymphocyte and brain neurotoxic esterase: dose and time dependence of inhibition in the hen examined with three organophosphorus esters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1986. 83: 1-9.
 - 56- Sigolaeva LV, Makower A, Eremenko AV et al. Bioelectrochemical analysis of neuropathy target esterase activity in blood. *Analytical Biochemistry*, 2001. 290: 1-9.
 - 57- Weiwei Li, Casida, JE. Organophosphorus neuropathy target esterase inhibitors selectively block outgrowth of neurite-like and cell process in cultured cells. *Toxicology Letters*, 1998. 98:139-146.
 - 58- Kropp TJ, Richardson RJ. Relative inhibitory potencies of chlorpyrifos-oxon, chlorpyrifos and mipafox for acetylcholinesterase versus neuropathy target esterase. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2003. 66:1145-1157.
 - 59- Dyer SM, Cattani M, Pisanello DL, et al. Peripheral cholinesterase inhibition by occupational chlorpyrifos exposure in Australian termicide applicators. *Toxicology*, 2001. 169: 177-185.
 - 60- Maroni M, Blecker ML. Neuropathy target esterase in human lymphocytes and platelets. *Journal of Applied Toxicology*, 1986. 6(1):1-7
 - 61- Reinders JH, Hansen LG, Metcalf RL. In vitro neurotoxic esterase assay using leptophos-oxon analogs as inhibitors. *Toxicology Letters*, 1983. 17:107-111.
 - 62- Moretto A, Nicolli A, Lotti M. The search of the target of promotion: Phenylbenzoate esterase activities in hen peripheral hens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007. 219:196-201.
 - 63- Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998. 64: 463-468.
 - 64- Vasconcellos LF, Leite AC, nascimento OJ. Organophosphate-induced delayed neuropathy. Case report. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 2002. 60(4):1003-1007.
 - 65- Mutch E, Blain PG, Williams F. Interindividual variations in enzymes controlling organophosphate toxicity in man. *Human & Experimental Toxicology*, 1992. 11:109-116.
-

- 66- Zaccheo O, Dinsdale D, Meacock A, Glynn P. Neuropathy target esterase and its homologue degrade phosphatidylcholine to glycerophosphocholine in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(23):24024-24033.
 - 67- Johnson, MK. Structure-activity relationships for substrates and inhibitors of hen brain neurotoxic esterase. *Biochemical Pharmacology*, 1975. 24:797-805.
 - 68- Manual Merck de saúde para a família: neuropatia periférica.
<http://www.manualmerck.net/?url=/artigos/%3Fid%3D96%26cn%3D903>
(acessado em 06/Ago/2007)
 - 69- Lotti M, Moretto A, Bertolazzi M. Organophosphate polyneuropathy target esterase: studies with methamidophos and its resolved optical isomers. *Archives of Toxicology*, 1995. 69: 330-336.
 - 70- Choudhary S, Verma SK, Raheja G, Kaur P, Joshi K, Gill, KD. The L-type calcium channel blocker nimodipine mitigates cytoskeletal proteins phosphorylation in dichlorvos-induced delayed neurotoxicity in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006. 98: 447-455.
 - 71- Quistad GB, Barlow C, Winrow CJ, Sparks SE, Casida J. Evidence that mouse brain neuropathy target esterase is a lysophospholipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003. 100: 7983-7987.
-

8 ANEXOS

8.1 Termo de consentimento

(Em acordo às Normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde-MS)

Instituições participantes do Estudo:

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - CESTEHE/ENSP da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Título do Estudo:

Padronização e implementação de metodologia de um indicador biológico para avaliação de neuropatia tardia induzida por organofosforados

Investigadores:

Equipe do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana, ENSP, FIOCRUZ.

Coordenador: Ana Carolina Ferrante

Você está sendo convidado a participar de um estudo, patrocinado pela Fundação Oswaldo Cruz, com o objetivo de desenvolver uma metodologia para avaliação de toxicidade no sistema nervoso (neurotoxicidade) dos compostos organofosforados como ferramenta de monitoramento na avaliação da exposição aos OP.

Este documento procura fornecer informações sobre este estudo e a experiência que será realizada, explicando como serão os exames, quais os benefícios e os riscos que podem estar relacionados com a sua participação, ou seja, informações necessárias para que você possa dar o seu consentimento para colaborar com esta pesquisa. A sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você poderá desistir de participar da pesquisa e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os exames e procedimentos aplicados serão gratuitos.

Antes de assinar este termo, você deve tirar todas as suas dúvidas sobre o mesmo, não hesitando em fazer perguntas sobre qualquer ponto que julgar necessário esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

Está sendo desenvolvido um método modificado de dosagem de enzimas sensíveis a praguicidas que afetam o sistema nervoso, que seja mais barato e de fácil realização do que o método já existente. Os praguicidas são substâncias muito utilizadas nas lavouras para o controle de pragas, e também são conhecidos pelo termo agrotóxicos.

A dosagem destas enzimas, e particularmente de uma enzima conhecida como esterase neurotóxica, é muito importante do ponto de vista da saúde pública, uma

vez que a inibição desta enzima pode ter como consequência o aparecimento (três semanas depois da exposição) de efeitos tóxicos como a paralisia de pés e pernas, e diversas pessoas estão expostas a estes compostos direta e indiretamente, através do seu uso no controle de pragas de lavouras.

Para tal realização, será necessário coletar um pequeno volume de sangue, mais ou menos a quantidade de uma colher de sopa, utilizando-se para isso agulhas individuais e descartáveis. Você pode sentir uma ligeira sensação de ardência, após a coleta, no local onde será introduzida a agulha.

A sua participação se dará somente no momento da coleta da amostra e os resultados deste estudo nos ajudarão a validar um método mais barato e mais fácil de ser realizado, que poderá ser unida a outras ferramentas de avaliação da exposição aos agrotóxicos para que se possa fazer uma avaliação do risco associado a esta exposição.

Nome e assinatura do pesquisador responsável

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana

Tel: (21) 2598-2820 – (21) 2598-2819 – Fax: (21) 2270-3210

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome e assinatura do voluntário

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

8.2 Questionário

1-Identificação: _____

2-Data: ___/___/___

3-Nome: _____

4-Data de nascimento: ___/___/___

5-Idade: _____

6-Sexo: 1-feminino 2-masculino

7-Telefone para contato: _____

8-Raça/Etnia:

1-branco 2-negro 3-mestiço 4-asiático 5-índio

9- Trabalha?

1-sim 2-não

10- Qual o tipo de trabalho que faz? _____

11-Qual a frequência com que você trabalha?

- 1-trabalha diariamente
 2-trabalha quando não está na escola
 3-trabalha quando solicitado pela família

12-Alguém da sua casa trabalha na agricultura? _____

13-Há quanto tempo foi a última desinsetização da sua casa?

- 1-1 dia 2-2 dias 3-3 dias 4-4 dias 5-5 dias
6- 1 semana
 7-entre 1sem e 15 dias 8-entre 15 dias e 1 mês 9-mais de 1 mês

14- Lembra como era o produto? _____

15-Tem alguma horta na sua casa?

1-sim 2-não

16-As plantas ou a horta da sua casa são tratadas com agrotóxico?

1-sim 2-não

17-Você consome os alimentos que planta na horta da sua casa?

1-sim 2-não

18-Você tem agrotóxico em casa?

1-sim 2-não 3-não sabe

19-Você usa a embalagem do agrotóxico vazia para outro fim?

1-sim 2-não

19a -Se sim, para que? _____

20 -Já foi intoxicado por algo?

1-sim 2- não 3-não sabe

21- Qual foi o produto? _____

22-Há quanto tempo ocorreu a intoxicação?_____

23- Faz uso de algum medicamento?

1-sim 2-não

23a-Se sim, para que? _____

24- Já teve algum sintoma semelhante a estes?

- 1- Fraqueza das pernas
- 2- Formigamento
- 3- Fortes câimbras nas pernas

25- Faz uso de vitamina B?

- 1- sim
- 2- não

25 a- Se sim, que tipo?