

Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias

Organophosphate-related ototoxicity: Description of the vestibulocochlear system ultrastructural aspects of guinea pigs

Daiane Körbes ¹, Aron Ferreira da Silveira ²,
Miguel Ângelo Hyppolito ³, Gisiane Munaro ⁴

Palavras-chave: células ciliadas auditivas, cóclea, inseticidas organofosforados, microscopia eletrônica de varredura, vestibulo do labirinto.

Keywords: microscopy, labyrinth, insecticides, vestibule, organophosphates.

Resumo / Summary

Os agrotóxicos organofosforados são amplamente utilizados na agricultura, e atualmente fazem parte do grupo de agentes químicos que podem levar à perda auditiva, no qual já estavam incluídos os solventes, os metais e os asfixiantes. **Objetivo:** Analisar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados na citoarquitetura do sistema vestibulococlear. Trata-se de um estudo experimental prospectivo. **Material e Método:** Foram utilizadas cobaias albinas machos, divididas em três grupos, nos quais se administrou água destilada (grupo 1 - controle), agrotóxico - 0,3mg/Kg/dia (grupo 2), agrotóxico - 3 mg/Kg/dia (grupo 3), durante sete dias consecutivos. O agrotóxico utilizado foi Tamaron BR (metamidofós). A avaliação anatômica da cóclea, sáculo e utrículo foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura, após o período de aplicação do agrotóxico. **Resultados:** As cobaias submetidas ao organofosforado apresentaram alterações morfológicas cocleares, com lesões nas três espiras analisadas, bem como alterações ciliares de sáculo e utrículo, intensificadas de acordo com a dosagem recebida do agente. **Conclusão:** As alterações morfológicas observadas nas células ciliadas nos grupos expostos a doses diárias de organofosforado promovem evidências de um efeito agudo degradante dos agrotóxicos no sistema vestibulococlear.

Organophosphate toxic agents are used in agriculture and are currently part of the group of toxic agents which can lead to hearing loss, in which we have solvents, metals and asphyxiation agents. **Aim:** to analyze the acute ototoxic action of a group of organophosphate agents in the vestibulocochlear system. This is a prospective experimental study. **Materials and Methods:** we used male albino guinea pigs, broken down into three groups, to which we provided distilled water (group 1 - control), agrototoxic agent - 0.3mg/Kg/day (group 2), agrototoxic - 3 mg/Kg/day (group 3), during 7 seven consecutive days. The most used agrototoxic agent was Tamaron BR (metamidophos). The anatomical evaluation of the cochlea, saccule and utricle was carried out by means of electronic scanning microscopy after the use of the agrototoxic agent. **Results:** the guinea pigs submitted to the organophosphate presented cochlear morphological alterations with lesions on the three turns analyzed, as well as cilia alterations in the saccule and utricle, intensified according to the agent dosage. **Conclusion:** the morphological alterations seen in the hair cells exposed to daily doses of organophosphate promote evidences of an acute deleterious effect of agrototoxic agents on the vestibulocochlear system.

¹ Fonoaudióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² Professor Titular, Chefe do Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³ Professor-Doutor, Docente do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Fonoaudióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da BJORL em 18 de junho de 2009. cod. 6460

Artigo aceito em 13 de agosto de 2009.

INTRODUÇÃO

O trabalhador agrícola está exposto a vários agentes nocivos à saúde, incluindo ruídos, vibrações e produtos químicos específicos, como agrotóxicos. A ação destes agentes pode ser simultânea, favorecendo o comprometimento da audição. Na maioria das vezes, os trabalhadores agrícolas, que estão em contato com diversos tipos de agrotóxicos, não têm acompanhamento periódico no que diz respeito principalmente à saúde auditiva. Pela influência destes fatores no sistema auditivo, é possível que esses indivíduos sejam candidatos a apresentarem alterações na audição¹.

Recentemente, os agrotóxicos organofosforados foram introduzidos no grupo de alta prioridade para pesquisa relacionada à ototoxicidade devido à exposição ocupacional, da qual já faziam parte os solventes industriais, além de metais pesados, e outros compostos, de natureza química diversa, que comumente apresentam ação asfixiante, caso do monóxido de carbono e cianeto de hidrogênio²⁻⁴.

A intoxicação pode ocorrer por inalação, pela ingestão ou através da pele^{5,6}. Uma série de manifestações clínicas pode ser observada em decorrência da ação deletéria dos agrotóxicos sobre a saúde humana, tais como náuseas, tonturas, zumbido, fraqueza, falta de apetite, nervosismo, dores de cabeça, alergias, lesões renais e hepáticas, câncer⁷⁻¹¹. Em decorrência da inespecificidade dos sintomas relacionados à intoxicação, sendo estes comuns a múltiplos fatores etiológicos, torna-se difícil, muitas vezes, estabelecer a manipulação do organofosforado com o nexo causal.

No sistema vestibulococlear, o efeito de agentes ototóxicos pode manifestar-se em lesões de células ciliadas externas (CCE), lesões do VIII par craniano, alterações no sistema vestibular e alterações no sistema nervoso central (SNC). A ação neurotóxica de algumas substâncias químicas encontradas nos ambientes de trabalho pode afetar não somente a audição e o equilíbrio, mas também o tronco cerebral e via auditivas centrais¹². Há evidências de que a alteração auditiva possa ser uma manifestação precoce de intoxicação por organofosforados¹.

É de conhecimento científico as inúmeras alterações provocadas pela intoxicação por organofosforados no ser humano, levando-se em consideração todos os sistemas e órgãos que o compõe. Apesar de a literatura concordar a respeito da associação existente entre a exposição a agrotóxicos e a ocorrência de alterações auditivas, são escassos os estudos que avaliam as alterações histológicas especificamente relacionadas ao sistema vestibulococlear.

Haja vista a semelhança anatomofisiológica existente entre o sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias, pesquisas realizadas com estes animais de laboratório são deveras importante, uma vez que os achados

podem ser correlacionados com a população humana, e servir assim, de alerta para os possíveis comprometimentos auditivos ocasionados pelo contato com agrotóxicos organofosforados.

Em razão do exposto, buscou-se analisar a ação ototóxica aguda de um agrotóxico do grupo dos organofosforados na citoarquitetura do sistema vestibulococlear de cobaias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo foram utilizadas 15 cobaias albinas machos. Os animais foram selecionados no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os cuidados seguiram as diretrizes do Manual sobre Cuidados e Uso de Animais de Laboratório do Institute of Laboratory Animal Resources¹³. O protocolo experimental seguiu ainda os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para a intoxicação das cobaias, administrou-se o organofosforado Tamaron (metamidophos), comercializado pela Bayer CropScience Ltda.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP, sob o protocolo número 100/2008.

Os animais foram selecionados no Biotério Central da FMRP-USP, com peso entre 300 e 500g, através da presença do Reflexo de Preyer.

Após a seleção, as cobaias foram submetidas à otoscopia externa através da visualização do meato acústico externo (MAE). Os animais que apresentaram sinais de otite externa ou média aguda, cerúmen de difícil remoção, alterações inflamatórias do MAE ou mesmo conduto auditivo muito estreito para adequar a sonda dos equipamentos, foram descartados do experimento. De acordo com a literatura¹⁴, as otites médias tornam o osso mais rígido, o que dificulta a abertura da bula timpânica para a fixação e facilita o dano a outras estruturas, como a cóclea, sistema vestibular e ossículos.

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da FMRP-USP.

As cobaias foram divididas em três grupos:

GRUPO 1: três animais - seis cócleas, sáculos e utrículos, com administração de água destilada intraperitoneal em dose única diária, no mesmo volume correspondente à dose de agrotóxico para o peso da cobaia, durante sete dias.

GRUPO 2: Seis animais - doze cócleas, sáculos e utrículos, com administração intraperitoneal de agrotóxico na dose única diária de 0,3mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos.

GRUPO 3: Seis animais - doze cócleas, sáculos e utrículos, com administração intraperitoneal de agrotóxi-

co na dose única diária de 3mg/Kg/dia durante sete dias consecutivos.

Para a estimativa correta das doses, as cobaias eram pesadas diariamente, imediatamente antes da administração das drogas.

Em virtude da importância dos equipamentos de proteção individual para evitar contato com o agrotóxico, no momento da aplicação das doses diárias nos animais do experimento foram adotadas medidas de precaução, conforme prescrito na bula do produto.

No dia seguinte à última dose da droga ou da água destilada administrada em cada um dos grupos, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilasina 2% e cloridrato de ketamina 10%, via intramuscular, e sacrificados pelo método de decapitação. As bulas foram imediatamente retiradas bilateralmente e abertas, expondo-se as estruturas do sistema vestibulococlear.

Em seguida, foi injetada solução de fixação de glutaraldeído a 2,5% através da janela redonda da cóclea. Após esta fixação inicial com glutaraldeído, o material foi submetido a cinco lavagens com solução tampão-fosfato 0,1M e submetido à microdissecção expondo-se as espiras cocleares. Então foi novamente imerso em tampão-fosfato 0,1M por 12 horas depois de lavado com a mesma solução. Foi realizada a refixação em solução constituída de tetróxido de ósmio a 1% em tampão-fosfato a 0,1M durante 1 hora a 4°C. Em seguida o material foi lavado em 3 banhos de água bidestilada por 2 a 3 minutos cada e então imerso em solução de ácido tânico aquosa 1% por 1 hora também a 4°C.

A desidratação das estruturas foi realizada com banhos sucessivos de etanol em concentrações crescentes de 50%, 70%, 90% e 95% durante 10 minutos cada. A seguir utilizou-se etanol a 100% em 3 banhos de 20 minutos cada, deixando-se as estruturas imersas no último banho à temperatura ambiente por 12 horas.

A secagem da água ainda presente nas amostras foi realizada utilizando-se o equipamento BAL-TEC - CPD 030 - Critical Point Dryer (Balzers, Liechtenstein), através do processo de ponto crítico, sendo as amostras transferidas para a câmara do aparelho e recobertas por dióxido de carbono (CO₂) líquido.

Para a adequada observação à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as estruturas dissecadas e parcialmente preparadas foram fixadas em um porta-espécime cilíndrico de metal, utilizando-se pasta condutiva de carbono para fixação das cócleas e adesivo de carbono no caso dos sáculos e utrículos. As estruturas foram então cobertas por uma fina camada de ouro, através do processo de vaporização com o equipamento BAL-TEC - SCD 050 - Sputter Coater (Balzers, Liechtenstein), tornando-se eletricamente condutivas, conforme estudos realizados¹⁵⁻¹⁷.

As amostras foram então levadas para análise à MEV, por meio do microscópio eletrônico JEOL Scanning

Electron Microscope - JSM 5200. A análise estrutural das cócleas foi padronizada pelo estudo do terço médio das primeiras três espiras cocleares. A espira apical não foi incluída no estudo visto que o desarranjo natural das CCE e células ciliadas internas (CCI), tanto do padrão em "V" quanto do enfileiramento das células principalmente na 2ª e 3ª fileiras, dificulta uma análise criteriosa da presença e integridade das mesmas^{14,17}.

A condição de integridade ou lesão das células ciliadas foi definida pela análise dos estereocílios destas estruturas. Células que apresentaram estereocílios com forma e disposição perfeitas foram consideradas íntegras (normais). Células com estereocílios ausentes, disformes ou em padrão de desarranjo foram consideradas lesadas^{16,18,19}.

RESULTADOS

Nas cobaias do grupo 1, observou-se a manutenção da arquitetura normal das CCE e CCI, bem como ausência de alterações ciliares em sáculo e utrículo.

Quanto à MEV dos grupos nos quais foram administradas doses de agrotóxico, observou-se alterações morfológicas em 83,3% das cócleas do grupo 2 e em 100% das cócleas do grupo 3, sendo as lesões mais extensas neste último grupo. No que se refere ao labirinto vestibular, observou-se uma frequência de 50% de alterações ciliares tanto no sáculo como no utrículo das cobaias do grupo 2. Já no grupo 3, foram evidenciadas alterações nos cílios do sáculo em 90% das cobaias e nos cílios do utrículo em 83% delas.

A avaliação anatômica do grupo 2, no qual foi administrado doses de 0,3 mg/Kg/dia, mostrou lesão de CCE em nível da espira 3 (E3), caracterizadas por distorção ciliar com desarranjo no padrão em "V" e encurtamento dos cílios, ou ainda, ausência dos mesmos. As alterações foram observadas na 2ª e 3ª fileiras, mais evidentes nesta última. Já as CCI apresentaram alterações na espira basal, espira 2 (E2) e E3, com cílios presentes, porém, desarranjados.

Nas estruturas do vestíbulo do labirinto das cobaias do grupo 2, as alterações estruturais observadas foram um padrão de cílios encurtados e/ou fundidos. As alterações de cóclea, sáculo e utrículo encontram-se exemplificadas nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

As alterações morfológicas encontradas no grupo 3, que recebeu doses de 3 mg/Kg/dia do agrotóxico, foram mais extensas e caracterizadas por ausência dos cílios das CCE, desarranjo no padrão em "V", cílios dobrados e ausência parcial de um dos braços do "V". As alterações morfológicas encontradas na espira basal acometeram somente a 3ª fileira das CCE, enquanto que na E2 a 2ª e 3ª fileiras foram mais atingidas. Já na E3 observou-se lesão severa nas três fileiras das CCE. Os cílios das CCI também mostraram irregularidades na sua conformação, estando encurtados e fundidos nas três espiras analisadas.

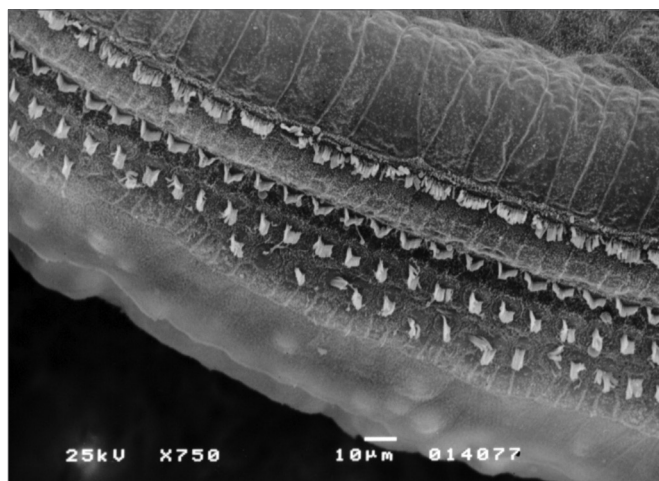


Figura 1. Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 2, evidenciando a E3. Aumento de 750 vezes.

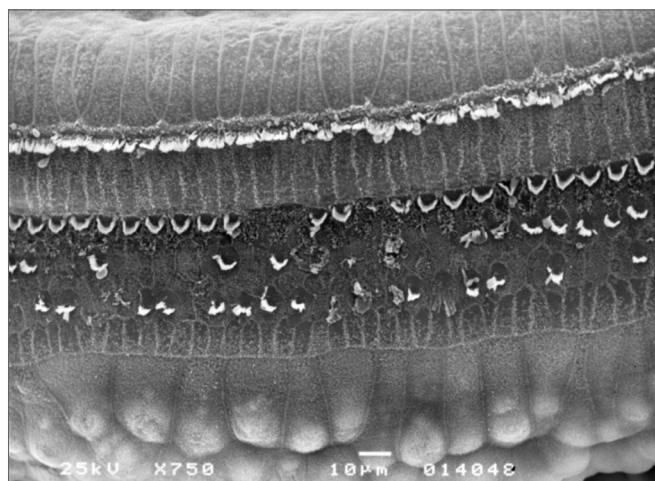


Figura 4. Fotomicrografia de órgão de Corti de cobaia do grupo 3, evidenciando a E3. Aumento de 750 vezes.

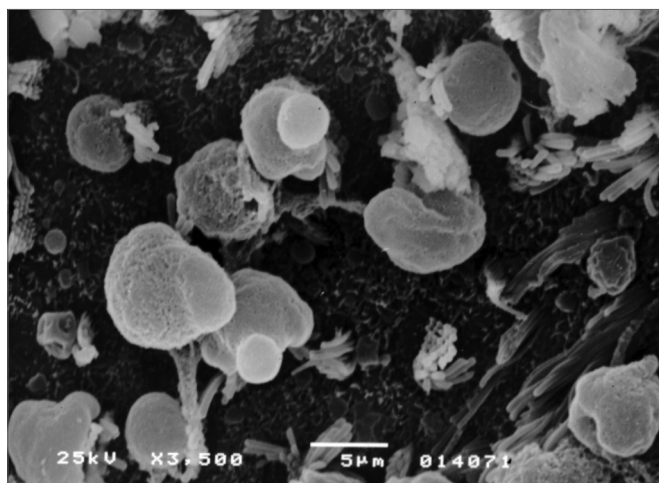


Figura 2. Fotomicrografia da mácula sacular de cobaia do grupo 2. Aumento de 3.500 vezes.



Figura 5. Fotomicrografia de mácula sacular de cobaia do grupo 3. Aumento de 3.500 vezes.

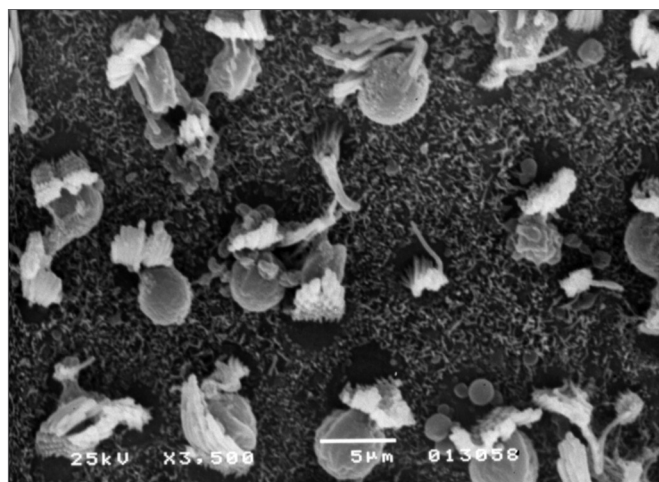


Figura 3. Fotomicrografia de mácula utricular de cobaia do grupo 2. Aumento de 3.500 vezes.

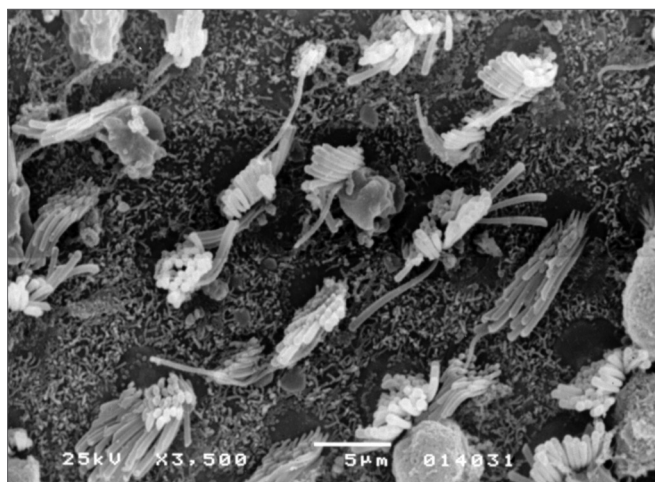


Figura 6. Fotomicrografia de mácula utricular de cobaia do grupo 3. Aumento de 3.5000 vezes.

Na Figura 4 podem ser observadas as alterações cocleares.

No labirinto vestibular, as alterações ciliares encontradas caracterizaram-se por encurtamento dos cílios, bem como presença de fusão ciliar e apoptose destas estruturas. As alterações encontradas no sáculo e no utrículo encontram-se ilustradas nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

DISCUSSÃO

Os efeitos adversos observados no organismo decorrentes da intoxicação por agrotóxicos vêm sendo descritos na literatura. Em pesquisas realizadas em animais de laboratório buscando analisar os efeitos do agrotóxico no SNC, observou-se que, em exposições crônicas, o organofosforado provoca hipotrofia da camada molecular do córtex cerebral, e pode levar também à perda ou afilamento de ramificações neuronais^{20,21}. Já na intoxicação aguda, foi observada alteração estrutural no cerebelo após aplicação de dose única do organofosforado, caracterizada por apoptose nas células de Purkinje e dano estrutural no citoesqueleto dos animais sobreviventes²². Em outro estudo ainda, no qual foram aplicados dois inseticidas organofosforados em ratas durante o período gestacional e de lactação, os autores observaram que os animais nascidos apresentaram alteração nos períodos de desenvolvimento dos dentes, pelos e orelhas, bem como nos reflexos postural, palmar e startle²³.

Na pesquisa otológica os animais que são mais frequentemente utilizados são a cobaia e o rato devido à similaridade da orelha destes animais com a orelha humana¹⁴. Neste estudo, o modelo experimental utilizado foi a cobaia em virtude de a mesma ser um animal dócil, de fácil manejo, com orelha média e interna de bom tamanho e acesso, facilitando a dissecação e o estudo, e, ainda, pela semelhança anatomofisiológica do sistema auditivo periférico de humanos e de cobaias^{15,17,18}. De acordo com outro autor²⁴, a cobaia é também utilizada em estudos relacionados à labirintologia, visto que a mesma apresenta um sistema vestibular que se assemelha sensivelmente ao do homem.

Seguindo a metodologia descrita na literatura por pesquisa de autores²⁵ que buscaram avaliar a ototoxicidade de drogas medicamentosas, este estudo procurou fazer uma análise descritiva dos achados à MEV.

Analisando os dados encontrados na MEV, pode-se inferir que as lesões provocadas pelo organofosforado no órgão de Corti são predominantemente nas CCE e progridem do ápice para a base da cóclea. Nas espiras analisadas, a terceira fileira de CCE é a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e primeira fileiras. Esta sequência de lesões também coincide com a altura das CCE, sendo a E3 a primeira a ser lesada; a segunda espira que sofre maior lesão do organofosforado é a E2; a espira basal é a terceira espira com o maior número

de alterações. As células localizadas na espira apical não foram analisadas, uma vez que esta espira naturalmente apresenta uma configuração de desarranjo celular.

Estes achados confirmam a tendência de progressão das lesões morfológicas conforme o grau de intoxicação ocorrido com o organofosforado, visto o maior número de lesões observadas no grupo 3 em relação ao grupo 2, sendo que o primeiro foi aquele cujas cobaias receberam uma dose maior do agrotóxico.

Estudos realizados em cobaias submetidas a drogas ototóxicas revelam resultados divergentes aos do presente estudo, na observação à MEV. Na exposição à amicacina, lesões ocorreram predominantemente nas duas primeiras espiras que, desta forma, apresentaram um menor número de CCE normais do que na E3. As alterações estruturais foram mais intensas na primeira fileira de CCE, seguidas pela segunda fileira²⁶.

Estes achados concordam com dados obtidos por outros pesquisadores¹⁸, que referiram que os aminoglicosídeos provocam lesões no órgão de Corti predominantemente nas CCE, com progressão da agressão da base para o ápice da cóclea, sendo a primeira fileira de CCE também a primeira a ser lesada, seguindo-se para a segunda e terceira fileiras.

Em pesquisas realizadas com cisplatina, autores²⁵ descreveram lesões extensas das CCE na porção basal da cóclea, concordando com outro estudo¹⁹, segundo os quais as alterações mais evidentes também foram verificadas na espira basal, com ausência de cílios nas três fileiras de CCE, seguida pela E2 e E3, respectivamente. Em nível de CCI também foram observadas modificações ciliares, com cílios presentes, porém em padrão de desarranjo.

Quanto ao padrão de lesão encontrado neste estudo, a análise morfológica mostrou como alterações predominantes a ausência de estereocílios e deformidades na conformação em "V" dos mesmos, observações encontradas também nas pesquisas realizadas por outros estudiosos^{15,17,26}.

A presença de alterações anatômicas nas estruturas do sistema vestibulococlear analisadas neste estudo confirmam a ototoxicidade do agrotóxico organofosforado, que até então havia sido comentada somente por pesquisas nas quais se verificaram alterações funcionais nos sistemas auditivo e vestibular.

Diversos autores evidenciaram em suas pesquisas casos de perda auditiva neurossensorial decorrentes da exposição aos agrotóxicos, cujo grau varia de leve a moderado^{27,28}, podendo até ser observada perda auditiva bilateral profunda ocasionada por intoxicação aguda ao organofosforado²⁹. A literatura refere maior incidência de comprometimento dos limiares auditivos das altas frequências^{1,11,30}, no entanto autores citam ainda alterações observadas nas frequências de 1.000 e 2.000 Hz¹.

Estudos realizados com trabalhadores rurais demonstram que a ação prejudicial do agrotóxico pode

também ser observada no sistema vestibular. Autores comentam a presença de alterações do equilíbrio corporal, caracterizadas por síndrome vestibular periférica irritativa¹¹. Prejuízos na estabilidade postural também foram relatados em outras pesquisas³¹⁻³³, sugerindo um possível efeito subclínico envolvendo a propriocepção e o sistema vestibular.

Trabalhos de pesquisa que investiguem o ototoxicidade - cocleotoxicidade e vestibulotoxicidade - utilizando agrotóxicos permitem aprimorar os conhecimentos sobre anatomofisiologia da orelha interna e vias auditivas, sendo este o passo inicial para a descoberta de meios de prevenção e proteção mais eficientes do órgão de Corti.

Os resultados obtidos demonstram a necessidade de pesquisas complementares com característica de intoxicação não somente aguda, mas também de caráter crônico, para esclarecer o impacto dos agrotóxicos no organismo, especificamente nos sistemas auditivo e vestibular, através de trabalhos com animais experimentais que promovam perspectivas de aplicabilidade na espécie humana.

CONCLUSÃO

A observação de alterações morfológicas na cóclea, sáculo e utrículo de cobaias pertencentes aos grupos expostos a doses diárias de organofosforado promove evidências de um efeito degradante dos agrotóxicos no sistema vestibulococlear.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às equipes do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia e do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Manjabosco CAW, Morata TC, Marques SJM. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. *Arq Int Otorrinolaringol*. 2004;8(4):284-95.
2. Morata TC. Chemical exposure as a risk factor for hearing loss. *J Occup Environ Med*. 2003;45(7):676-82.
3. Azevedo APM. Efeito de produtos químicos e ruído na gênese de perda auditiva ocupacional [dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública; 2004.
4. Mello AP, Waismann W. Exposição ocupacional ao ruído e químicos industriais e seus efeitos no sistema auditivo: revisão de literatura. *Arq Int Otorrinolaringol*. 2004;8(3):226-34.
5. Lemus R, Abdelghani A. Chlorpyrifos: an unwelcome pesticide in our homes. *Rev Environ Health*. 2000;15(4):421-33.
6. Lima FJC, Marques PRBO, Nunes GS, Tanaka SMCN. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. *Rev Ecotoxicol Meio Ambiente*. 2001;11:17-34.
7. Ames RG, Steeland K, Jenkins B, Chrislip D, Russo J. Chronic neurological sequelae to cholinesterase inhibition among agricultural pesticide applicators. *Arch Environ Health*. 1995;50:440-4.
8. Pires DX, Caldas ED, Recena MCP. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no Período de 1992 a 2002. *Cad Saude Publica*. 2005;21(3):804-14.
9. Delgado IF, Paumgarten FJR. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do Município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1):180-6.
10. Soares WL, Freitas EAV, Coutinho JAG. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis/RJ. *Rev Econ Sociol Rural*. 2005;43(4):687-701.
11. Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(6):912-8.
12. Bernardi APA. Testes utilizados na avaliação de trabalhadores expostos a níveis de pressão sonora elevados e solventes. Em: Bernardi APA. Conhecimentos essenciais para atuar bem em empresas: audiologia ocupacional. Coleção CEFAC. São José dos Campos: Pulso; 2003. p. 67-80.
13. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Manual sobre cuidados e uso de animais de laboratório. Goiânia, GO, 2003.
14. Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA, Hyppolito MA. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75(1):43-9.
15. Oliveira JAA, Canedo DM, Rossato M. Autodefesa contra a ototoxicidade de antibióticos aminoglicosídeos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68(1):7-13.
16. Hyppolito MA, Oliveira JAA, Canedo DM, Rossato M, Holanda F. Ototoxicidade da cisplatina e otoproteção pelo extrato de ginkgo biloba às células ciliadas externas: estudo anatômico e eletrofisiológico. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(4):504-11.
17. Aquino TJM. Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais [tese]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
18. Oliveira JAA, Bernal TMO. Ototoxicidade de aminoglicosídeos e otoproteção. Em: Campos CAH, Costa HOO. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Roca; 2003. p. 148-67.
19. Hyppolito MA, Oliveira JAA, Lessa RM, Rossato M. Otoproteção da amifostina aos efeitos ototóxicos da cisplatina: estudo em cobaias albinas por emissões otoacústicas produzidas por distorção e microscopia eletrônica de varredura. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005;71:268-73.
20. Pelegrino JR, Calore EE, Saldiva PHN, Almeida VF, Peres NM, Vilela-de-Almeida L. Morphometric studies of specific brain regions of rats chronically intoxicated with the organophosphate methamidophos. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;64(2):251-5.
21. Perez NM, Calore EE, Vilela-de-Almeida L, Narciso ES, Puga FR. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):50-3.
22. Quilodrán J, Miranda JP, Jiménez L. Efecto del agropesticida Cipermetrina en dosis única intraperitoneal sobre el cerebelo del ratón. *Int J Morphol*. 2006;24:5-113.
23. Godinho AF, Silva DAF, Mercadante A, Sartori AMA. Neonatal rat exposure to pyrethroid and organophosphate insecticides: a physiological and biochemical trial of progeny. *Rev Cienc Farm*. 2003;24(2):159-67.
24. Oliveira JAA. Audio-vestibular toxicity of drugs. Florida: CRC Press; 1989. p. 560.
25. Kasse CA, Cruz OLM, Ilha LCN, Costa HO, Lopes EC, Coelho F. O uso de Maytenus ilicifolia na prevenção da ototoxicidade induzida pela cisplatina. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(5):712-7.
26. Aquino TJM, Oliveira JAA, Rossato M. Ototoxicidade e otoproteção em orelha interna de cobaias utilizando gentamicina e amicacina: aspectos ultra-estruturais e funcionais. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(6):843-52.
27. Ernest K. Delayed effects of exposure to organophosphorus compound. *Indian J Med Res*. 1995;101:81-4.

-
28. Beckett W, Chamberlain D, Hallman EA. Hearing conservation for farmers: source apportionment of occupational and environment factors contributing to hearing loss. *J Occup Environ Méd.* 2000;42: 806-13.
 29. Harell M, Shea JJ, Ermett JR. Bilateral sudden deafness following combined insecticide poisoning. *Laryngoscope.* 1987;88:1348-51.
 30. Teixeira CF, Brandão MFA. Efeitos dos agrotóxicos no sistema auditivo dos trabalhadores rurais. *Cad Inf Prev Acid.* 1998;19:46-52.
 31. Sack D, Linz R, Shuka C, Rice A, Bhattacharya A, Suskind R. Health status of pesticide applicators: postural stability assessments. *J Occup Méd.* 1993;35:1196-202.
 32. Yokoyama K, Araki S, Murata K, Nishikitani M, Okumura T, Ishimatsu S, Nakasu NA. Preliminary study on delayed vestibulo-cerebellar effects of Tokyo subway Sarin poisoning in relation to gender difference: frequency analysis of postural sway. *J Occup Environ Med.* 1998;40:17-21.
 33. Dick RB, Steenland K, Krieg EF, Hines CJ. Evaluation of acute sensory-motor effects and test sensitivity using termicide workers exposed to chlorpyrifos. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23:381-93.