

SÉRGIO EDUARDO FONTOURA-DA-SILVA

INTOXICAÇÃO POR AGROTÓXICOS NO ESTADO DO PARANÁ
E SUA ASSOCIAÇÃO COM A VARIABILIDADE GENÉTICA
DA COLINESTERASE DO SORO

Tese aprovada pelo Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Genética.

CURITIBA

1993

ORIENTADORA

Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia

A
meu pai,
onde ele estiver,
com amor e saudade.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia, orientadora e amiga, pela colaboração, orientação científica e sobretudo estímulo.

À Scheila, esposa e mãe, pelo incentivo e paciência nos momentos em que esta tese era redigida. À Samantha, filha, pelo simples motivo de sua existência que contribuiu para que eu pudesse trabalhar com mais afinco e dedicação na elaboração desta tese.

Aos amigos do Núcleo Profilático Universitário Prof. Pereira Filho, de modo especial à Dra. Silene Favorito, ao Sr. Renato Beatriz e aos motoristas Sérgio e Waldir, do Setor de Ciências da Saúde, sem cujo auxílio seriam impossíveis as coletas de material.

Aos agrônomos que recepcionaram e apoiaram a equipe do Núcleo Profilático Universitário nas diversas localidades visitadas.

Ao Prof. Dr. Lodércio Culpi, pela dedicação durante o curso de pós-graduação.

Aos Profs. Sérgio Luiz Primo Parmo, Maria Angelina Cane - ver de Lourenço e Vânia Manfredini de Alcântara, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório e sugestões no desenvolvimento desta tese.

À Profa. Maria Luiza Petzl Erler, pelas críticas e sugestões apresentadas.

SUMÁRIO

RESUMO	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1 Objetivos	02
1.2 Colinesterase do Soro	02
1.2.1 Aspectos Fisiológicos	03
1.2.2 Aspectos Bioquímicos	03
1.2.3 Determinação Genética	03
1.3 Inseticidas Organofosforados	11
1.3.1 Efeitos Tóxicos e Terapia	11
1.3.2 Metabolização	22
1.4 Consumo de Agrotóxicos - Situação do Brasil e do Paraná	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	34
2.1 Amostra	34
2.1.1 Convênio Núcleo Profilático - Acarpa	34
2.1.2 Caracterização da Amostra	34
2.2 Medição da Atividade da Acetilcolinesterase Eri- trocitária	39
2.3 Fenótipos da Colinesterase do Soro	39
2.3.1 Loco <u>CHE1</u>	39
2.3.1.1 Método de Morrow e Motulsky(1968).	41
2.3.1.2 Método de Alcântara e cols.(1991).	43
2.3.1.3 Método de Dietz e cols. (1973)....	45
2.3.2 Loco <u>CHE2</u>	47
2.4 Estatísticas	46
3. RESULTADOS	51
3.1 Demonstração de que o Teste de Seleção de Intoxi- cados se Fundamenta na Atividade da Acetilcoli- nesterase Eritrocitária (ACHE)	51
3.2 Intoxicações Observadas nos Municípios Visitados	51
3.3 Agrotóxicos Utilizados pelos Lavradores da Amos- tra	53
3.4 Frequências Fenotípicas Observadas	53
3.4.1 Loco <u>CHE1</u>	56
3.4.1.1 Frequências Fenotípicas do loco CHE1 em Intoxicados e Controles' ..	56
3.4.1.2 Distribuição dos Fenótipos Usuais e Não Usuais em Intoxicados de Acordo com a Distribuição da Ati- vidade Relativa da Acetilcolines- terase	50

3.4.2 Loco <u>CHE2</u>	59
3.4.3 Locos <u>CHE1</u> e <u>CHE2</u>	59
3.5 Riscos Relativos de Intoxicação Por Compostos Agro- tóxicos Inibidores das Esterases, Frações Etioló- gica e Preventiva	62
3.6 Atividade da Colinesterase do Soro	63
3.6.1 Comparação Entre as Atividades Enzimáticas Observadas em Controles e Intoxicados	63
3.6.2 Correlação entre os Métodos de Dietz e cols. (1973) e de Lorrow e Notulsky (1968)	63
4. DISCUSSÃO	66
4.1 Intoxicações Observadas nos Municípios Visitados .	66
4.2 Agrotóxicos Utilizados pelos Lavradores da Amostra	68
4.3 Frequências Fenotípicas Observadas	70
4.3.1 Loco <u>CHE1</u> :	70
4.3.2 Loco <u>CHE2</u>	72
4.3.3 Locos <u>CHE1</u> e <u>CHE2</u>	72
4.4 Atividade da Colinesterase do Soro	74
4.5 Susceptibilidade e Proteção à Inibição da Colines- terase do Soro por Agrotóxicos Organofosforados e Carbamatos	75
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

RESUMO

Um total de 134 lavradores expostos a agrotóxicos, selecionados quanto ao grau de intoxicação pelo nível da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária, classificados em 72 intoxicados e 62 controles, foram estudados no que se refere à variabilidade genética da colinesterase do soro (EC 3.1.1.8).

A atividade relativa da acetilcolinesterase foi avaliada pelo método de Limpèros e Ranta (1953), conforme modificação de Edson e Fenwick (1955). A fenotipagem do loco CHE1 da colinesterase do soro foi feita com a utilização do método de inibição enzimática, de Morrow e Motulsky (1968) e as variantes não-usuais foram retipadas de acordo com Alcântara e cols. (1991). A fenotipagem do loco CHE2 foi feita de acordo com o método de eletroforese em gel de ágar de Van Ros e Vervoort (1973).

Os intoxicados mostraram frequência significativamente mais alta de variantes não-usuais do que os controles, revelando esses fenótipos um risco relativo de intoxicação cerca de 9 vezes maior do que o apresentado pelo fenótipo usual. Entre os indivíduos de fenótipos usuais, a presença do fenótipo CHE2 C5- parece predispor à intoxicação, com risco relativo de cerca de 4 vezes maior do que o do fenótipo CHE2 C5+. Nossa hipótese é que a colinesterase do soro seria inibida antes da acetilcolinesterase, constituindo-se em fator de proteção à inibição dessa última enzima. As variantes da colinesterase do soro com menor afinidade por compostos organofosforados e carbamatos e/ou com menor atividade permitiriam maior inibição da acetilcolinesterase e portanto predisporiam à intoxicação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Objetivos

Os compostos agrotóxicos organofosforados e carbamatos, além de agirem sobre os insetos, agem sobre os mamíferos, inibindo as esterases de um modo geral e a acetilcolinesterase de um modo mais específico, provocando sintomatologia característica. A colinesterase do soro, enzima que apresenta variabilidade genética bem conhecida, por ser uma esterase, é inibida por estes compostos. Considerando-se que a variabilidade genética pode levar a diferenças na atividade e na capacidade de inibição da colinesterase do soro, questionou-se se não levaria também a diferenças na susceptibilidade à intoxicação por agrotóxicos.

Por estas razões nasceu o interesse de se desenvolver o presente trabalho, cujos objetivos principais foram os seguintes:

1. Analisar a distribuição da variabilidade genética da colinesterase do soro em intoxicados por compostos inibidores de esterases usados na agricultura e compará-la com aquela de controles das mesmas regiões rurais. O estudo da variabilidade genética inclui a determinação dos fenótipos dos locos CHE1 e CHE2.

2. Caso os locos estejam relacionados com a susceptibilidade à intoxicação, tentar determinar se haveria papel preponderante de um deles nesse fenômeno de intoxicação.

Atingidos os objetivos propostos, teremos contribuído para fornecer informações que possam fundamentar a elaboração de futuro esquema epidemiológico, que leve a diminuir a frequência de intoxicações observada atualmente.

1.2 Colinesterase do Soro

A colinesterase do soro (butirilcolinesterase, pseudocolinesterase, acilhidrolase de acilcolina, EC 3.1.1.8), por volta de 1947, quando da introdução dos inseticidas organofosforados na lavoura, adquiriu uma importância prática muito grande, principal-

mente no diagnóstico e controle de intoxicações em operários de indústrias químicas e de lavradores que manipulam estes compostos (Holmstedt, 1959; Humiston e Wright, 1967).

1.2.1 Aspectos Fisiológicos

A colinesterase do soro é sintetizada no fígado do homem e de outros animais (Koelle, 1951; Gerebtzoff e cols., 1954). Alterações na atividade enzimática têm sido observadas em hepatopatias (Shih e cols., 1966; Kutty e cols., 1971). Por esta razão a medição da atividade da colinesterase do soro pode entrar na bateria de exames para avaliação da função hepática.

A atividade enzimática pode estar diminuída após a 10ª semana de gravidez, em mulheres com terapia com estrogênios (Sidell e Kaminskis, 1975) e em doenças renais crônicas (Dietz e cols., 1973). A tabela 1 sumariza diversas situações em que a atividade da colinesterase do soro pode estar diminuída. A atividade aumentada é observada em situações associadas com o metabolismo anormal de lipídeos, tais como: hiperlipoproteinemia, obesidade (revisão em Kutty, 1980) e diabetes (Antropol e cols., 1973). Também se encontrou elevada nos casos de síndrome nefrótica, principalmente associada com hiperlipoproteinemia (Way e cols., 1975). Foi demonstrada correlação positiva entre a atividade enzimática e as concentrações de colesterol total, triglicérides, LDL e VLDL (Magarian e Dietz, 1987).

A colinesterase do soro tem sido detectada no cérebro (Atack e cols., 1986); nos sistemas vascular, respiratório, digestivo e urogenital, em certas glândulas exócrinas e endócrinas (Kutty, 1980) e na pele (Ortonne e cols., 1979). Apesar desta ampla distribuição, no homem e em outros mamíferos, sua função ainda não foi devidamente esclarecida. La Du e Lockridge (1986) encontraram um alto grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos dos centros ativos da colinesterase do soro

humana e da acetilcolinesterase do peixe Torpedo californica que indica a conservação das colinesterases durante a evolução. A enzima hidrolisa uma variedade de ésteres da colina (acetilcolina, butirilcolina e benzoilcolina), além de outros ésteres como o ácido acetilsalicílico. Devido a esta ampla variedade de substratos ainda não é conhecido o seu substrato natural em condições normais (Harris, 1980).

Em mamíferos, o metabolismo de ácidos graxos ocorre principalmente no fígado. Foi proposto por Clitherow e cols. (1963) que a butiril-CoA produzida durante o processo metabólico possa formar butirilcolina em presença de colina. Este composto tem uma potente ação nicotínica e exercerá seus efeitos tóxicos se não for destruído imediatamente. Estes autores consideram que a principal função biológica da colinesterase do soro seria hidrolisar a butirilcolina no momento de sua formação.

É interessante notar a relação entre colinesterases e organofosforados. Em pássaros (codornizes) tratados com Azodrin e Bidrin (organofosforados) a colinesterase do soro foi amplamente diminuída, enquanto que a acetilcolinesterase cerebral permaneceu normal ou levemente diminuída (Shellenger e cols., 1966). Bajgar (1971) relatou que apenas 1% da dose tóxica injetada de IMPF (isopropil metilfosfonofluoridrato) penetrou no cérebro de camundongo, tendo o restante da dose permanecido ligado a proteínas plasmáticas. Observações anteriores, com ésteres organofosforados, têm demonstrado ligações destes compostos à albumina, colinesterase do soro e aliesterases (Myers, 1959; Christen e cols., 1969). Parece que o plasma sanguíneo faz um importante papel, como uma primeira linha de defesa, contra o envenenamento por organofosforados pela ligação de proteínas plasmáticas ao tóxico absorvido (Ecobicon e Comeau, 1973).

1.2.2 Aspectos Bioquímicos

Nas colinesterases (do soro e acetilcolinesterase) supõe-se a existência de um centro ativo com dois sítios: aniônico e esterásico (Fig. 1a). O primeiro estaria constituído por um carbono eletrofílico de uma carbonila e atrairia o nitrogênio da colina por forças de Van der Waals. O segundo constaria do imidazol de uma histidina, que exalta a nucleofilidade de uma hidroxila serínica. Como consequência da atração da molécula do substrato para os dois sítios, se origina o complexo enzima-substrato (Fig. 1b). A acetilcolina se quebra, liberando a enzima acetilada e deixando livre a molécula de colina (Fig. 1c). Por hidrólise (Fig. 1d), a enzima regenera-se e libera ácido acético (revisão em Roses, 1979). O'Brien (1969) propôs a existência de três sítios no centro ativo: um iônico, um hidrofóbico e um esterásico. Roufogalis e Quist (1972) propuseram três sítios compreendendo um catalítico (alfa-aniônico) e dois alostéricos, um dos quais seria regulador (beta-aniônico) e o outro sítio acelerador (gama-aniônico).

A colinesterase do soro é diferente da colinesterase dos eritrócitos, ou acetilcolinesterase (Alles e Hawes, 1940; Aldridge, 1953a). Mendel e cols. (1943) e Nachmansohn e Rotherberg (1945) estabeleceram características que distinguem a acetilcolinesterase (colinesterase verdadeira, acetilcolina hidrolase, EC 3.1.1.7) da colinesterase do soro, incluindo o uso de compostos organofosforados, como inibidores diferenciais em estudos in vitro.

A maior parte da enzima circulante é um tetrâmero com um peso molecular de aproximadamente 340.000. As subunidades estão arranjadas como um dímero de dímeros, com cada dímero composto de duas subunidades idênticas ligadas por pontes dissulfetos. Cada dímero contém apenas uma ponte dissulfeto intercadeia entre duas subunidades. Estas pontes dissulfeto intercadeia não são necessárias nem para a estrutura tetramérica nem para a atividade. As quatro subunidades permanecem unidas por ligações covalentes e cada subunidade contém 3 ou 5 pares de pontes dissulfeto.

Centro Ativo das Colinesterases

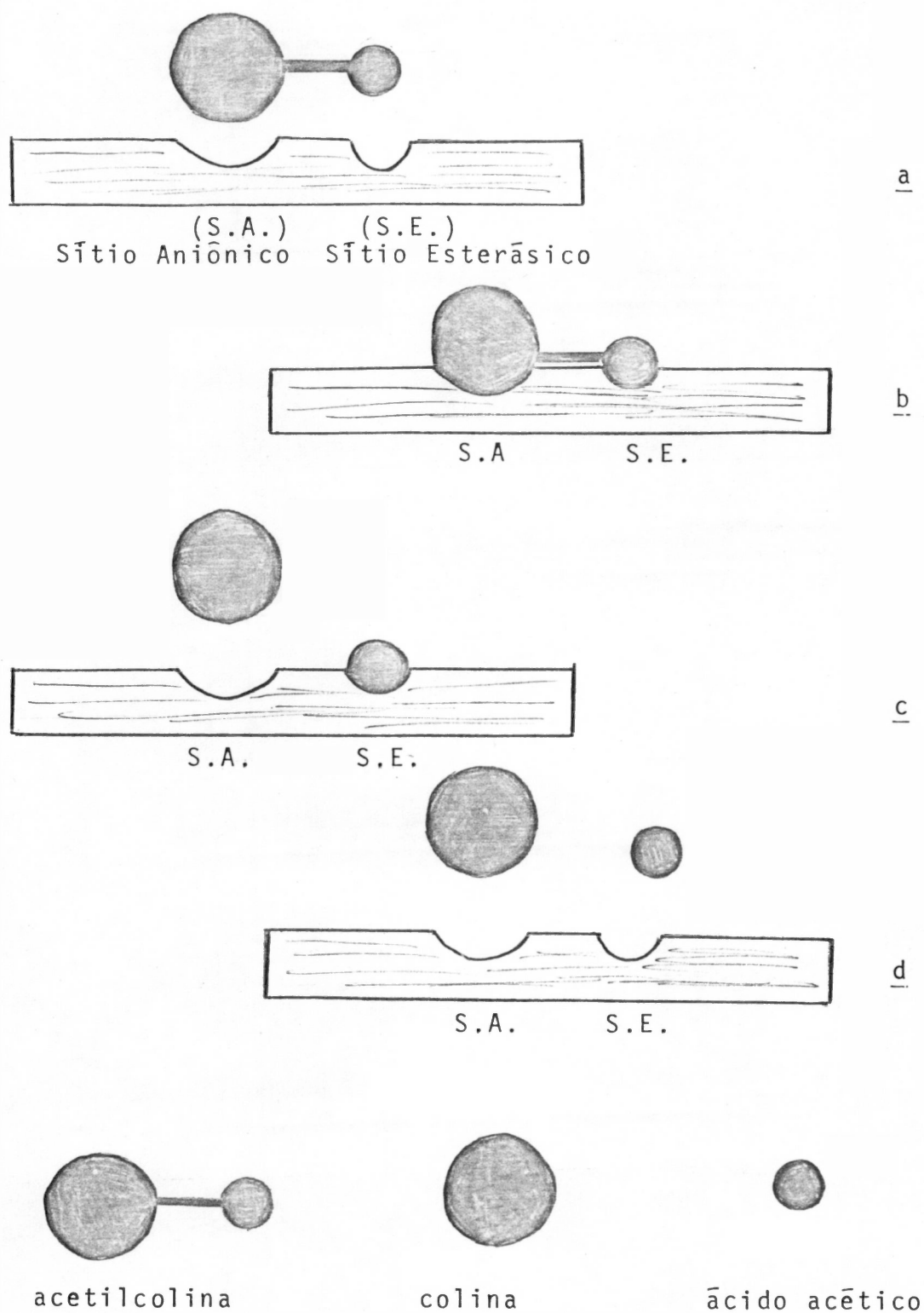


Fig.1. Esquema do processo de hidrólise catalisado pelas colinesterases.

to intracadeia (Lockridge e cols., 1979).

A colinesterase do soro apresenta quatro formas moleculares principais: C_1 , C_2 , C_3 e C_4 , as quais são interconvertíveis (LaMotta e cols., 1965). C_1 corresponde ao monômero, C_3 ao dímero e C_4 ao tetrâmero (Scott e Powers, 1972). O componente C_2 corresponde ao monômero ligado à albumina (Masson, 1979).

A seqüência de aminoácidos da colinesterase do soro foi determinada por Lockridge e cols. (1987), e a enzima é constituída por 574 aminoácidos por subunidade e 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 resíduos de asparagina. A serina do centro ativo é o 198º aminoácido da seqüência aminoterminal.

1.2.3 Determinação Genética

As variações hereditárias da colinesterase do soro vieram à luz após a introdução da succinildicolina (suxametônio) como miorelaxante, no início da década de 1950. Normalmente os efeitos da droga são pequenos, pois é rapidamente hidrolisada pela colinesterase do soro em produtos inativos (succinato e colina). Entretanto, alguns indivíduos (1 em 2.000 europeus) são sensíveis a seus efeitos. Nestes indivíduos uma dose padrão pode desenvolver uma paralisia muscular prolongada e apnéia por duas horas ou mais. Estudos nesta área demonstraram que os indivíduos eram portadores de variantes da colinesterase do soro (revisão em Harris, 1980).

Dois locos autossômicos (CHE1 e CHE2) não ligados (Harris e cols., 1963) determinam a colinesterase do soro. O primeiro está localizado no cromossomo 3 (Kidd e Gusella, 1985, segundo Zelinski e cols., 1987). Este apresenta um alelo muito comum (usual, CHE1*U) e os alelos atípicos (CHE1*A - Kalow e Genest, 1957) re-

sistente ao fluoreto (CHE1*F - Harris e Whittaker, 1961), silencioso S (CHE1*S - Liddell e cols., 1962), silencioso T (CHE1*T - Goedde e cols., 1965), silencioso R (CHE1*R - Scott e Wright, 1976), resistente à succinildicolina (CHE1*SU - Agarwal e cols., 1976), J (CHE1*J - Garry e cols., 1976), K (CHE1*K - Rubinstein e cols., 1978), H (CHE1*H - Whittaker e Britten, 1987) e Newfoundland (CHE1*NFLD - Simpson e Elliot, 1981). As variantes não usuais condicionam uma atividade enzimática mais baixa e estão relacionadas com a sensibilidade ao suxametônio. As variantes J, H e K somente são distinguidas em heterozigotos para outro alelo não usual (Evans e cols., 1980; Evans e Wardell, 1984; Whittaker e Britten, 1987). Através de estudos familiares os genótipos CHE1*K/CHE1*S e CHE1*K/CHE1*K puderam ser descobertos (Whittaker e Britten, 1988; Whittaker e cols., 1988).

Através de estudos de seqüenciamento do DNA foram caracterizadas determinadas mutações. Assim o alelo CHE1*A teria origem numa mutação de ponto ocorrida no nucleotídeo 209 (GAT→GGT) causando, na proteína, a substituição de um aminoácido na posição 70 (Asp→Gly), a variante quantitativa CHE1*K possui uma treonina no lugar de uma alanina (nucleotídeo 1615 GCA→ACA) (revisão em La Du, 1989). A variante CHE1*H, na posição 142 possui uma substituição de um aminoácido (Val→Met) devido a outra mutação de ponto: GTG→ATG (Jensen e cols., 1990). Num tipo de variante silenciosa, variante Ann Arbor, ocorre uma mutação do tipo frameshift (Nogueira e cols., 1990). Duas mutações foram relacionadas com a resistência ao fluoreto: fluoreto 1 (ACG→ATG, posição 243 Thr→Met) e fluoreto 2: (GGT→GTT, posição 390 Gly→Val; Bartels e cols., 1990).

O loco CHE2, cuja localização cromossômica ainda não está definida, apresenta apenas dois alelos identificados, CHE2*C5+ e

CHE2*C5- (Harris e cols., 1962). Os portadores do alelo CHE2*C5+ apresentam, em média, uma atividade 25% mais elevada (Harris, 1980). Estes indivíduos apresentam uma banda extra, denominada C_5 , observada eletroforéticamente. Tortolero e Medina (1978) propuseram que esta banda fosse uma modificação do isômero C_4 . Scott e Powers (1974) sugeriram que C_5 representa um híbrido dos componentes C_4 e C_5 , pois em indivíduos CHE2 C5+ heterozigotos para o alelo atípico, a banda C_5 sofre a mesma inibição por dibucaína que as demais bandas condicionadas pelo loco CHE1. A isozima C_5 representa um tetrâmero C_4 associado a uma outra molécula (Primo-Parmo e cols., 1990), a qual não é nem albumina nem um fragmento de colágeno, nem um fragmento de imunoglobulina e nem um fragmento de fibronectina (Masson e cols., 1990).

As variantes do loco CHE1 são caracterizadas através de ensaios enzimáticos, com o uso de inibidores da colinesterase do soro, e muitas substâncias para este fim já foram testadas, tais como: dibucaína (Kalow e Genest, 1957), extrato aquoso de batata (Harris e Whittaker, 1959), fluoreto de sódio (Harris e Whittaker, 1961), Ro2-0683 (Harris e Robson, 1963; Morrow e Motulsky, 1968), álcool n-butírico (Whittaker, 1968a), cloreto de sódio (Whittaker, 1968b), uréia (Hanel e Mogensen, 1971), cátions bivalentes e tampões (Garry, 1971a,b; Garry e cols., 1972), cloridrato de fenilciclídina - Sernylan (Becker, 1972), propranolol (Whittaker e cols., 1981). Uma técnica fundamentada na taxa de hidrólise entre dois substratos (procaína e tetracaína) foi desenvolvida por Smith e Foldes (1972) para a identificação dos portadores do alelo atípico. As variantes do loco CHE2 são determinadas por técnicas eletroforéticas, utilizando-se principalmente suportes de amido (Harris e cols., 1962), poliacrilamida (Simpson, 1972) e ágar (Van Ros e Vervoort, 1973).

1.3 Inseticidas Organofosforados

A origem e utilização dos inseticidas químicos (Tabela 2) se deu inicialmente com materiais simples e disponíveis tais como os arsenicais, óleos de petróleo e produtos extraídos de vegetais (nicotina, piretróides, rotenona, etc). Mais tarde, apareceram os primeiros compostos orgânicos sintéticos: dinitrocompostos e tio-cianatos. Uma grande revolução no controle de pragas agrícolas se iniciou com a introdução do DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis-clorofeniletano) na lavoura. Outros compostos organoclorados tais como BHC, Toxafeno, Clordane, Aldrin e Dieldrin apareceram logo em seguida. A segunda revolução ocorreu com a síntese do Parathion pelo pesquisador alemão Schrader, em 1944, que também sintetizou outros compostos organofosforados como o Paraoxon, Syxtox, Tabun e Sarin, sendo os dois últimos criados e utilizados para fins bélicos. Os carbamatos, por sua vez, são um grupo relativamente recente de compostos sintéticos (revisão em Matsumura, 1985).

As pesquisas nas áreas de farmacologia e toxicologia dos compostos organofosforados iniciaram-se por volta de 1947, logo após o início de sua utilização na agricultura. O produto pioneiro, a ser introduzido, foi o Parathion (DuBois e Geiling, 1959), ainda hoje um dos mais utilizados.

1.3.1 Efeitos Tóxicos e Terapia

Os compostos organofosforados são inibidores das esterases em geral (Tabela 3), sendo que a única exceção é a esterase-A (hoje conhecida como paraoxonase) que consegue hidrolisá-los (Aldridge, 1953**b,c**). As colinesterases (do soro e acetilcolinesterase) são inibidas por estes compostos (Fig.2). Como a inibição pode ser diferencial, é possível utilizá-los em ensaios in vitro para

Tabela 2. Cronologia da síntese ou uso de produtos com ação inseticida (de acordo com Matsumura, 1985).

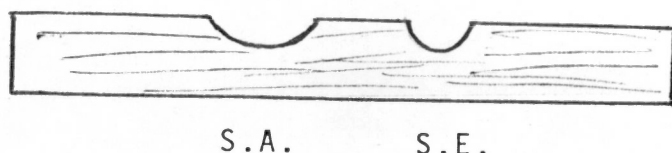
<u>Tipos de Produtos</u>	<u>Ano</u>	<u>Produtos e Local</u>
Produtos naturais	900*	arsenitos - China
	1690	tabaco - Europa
	1800*	piretróides - Cáucaso
	1845	fósforo inorgânico - Alemanha
	1848	pó de raízes - Malásia
Fumegantes e derivados do petróleo	1854	CS ₂ para fumegação - França
	1867	verde de Paris - EUA
	1868	derivados do petróleo - EUA
	1874	síntese do DDT (Zeidler)
	1918	cloropicrina - França
Primeiros inseticidas sintéticos	1925	dinitrocompostos
	1939	descoberta das propriedades inseticidas do DDT (Müller)
	1941	síntese dos 2-4-D - EUA
	1941	BHC - França
	1944	Parathion - Alemanha
	1940/50	Aldrin, Dieldrin, Endrin, etc
	1947	Carbamatos - Suíça
	1952	Malathion
Inseticidas modernos	1967	primeiros inseticidas miméticos hormonais - EUA
	1970/80	desenvolvimento dos inseticidas piretróides sintéticos - Reino Unido, Japão
	1980	descoberta das avermectinas

*Ano aproximado

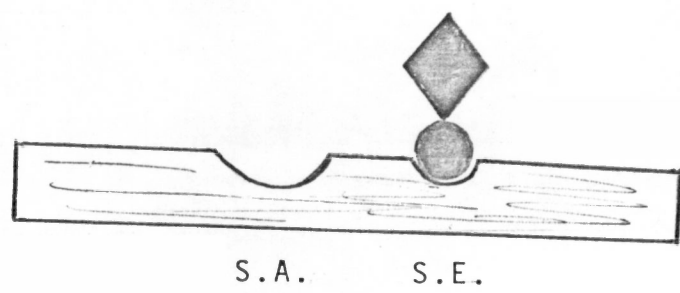
Tabela 3. Alguns compostos organofosforados inibidores de enzimas com atividade esterásica (modificado de Aldridge, 1953c).

Enzima	Inibidor
Quimiotripsina	Diisopropil fosfonofluoridrato (DFP) Difenil fosfonicloridrato Dietyl fosforofluoridotionato Tetraisopropilpirofosfato (TIPP) Tetraetilpirofosfato (TEPP) Tetrapropilditionopirofosfato (NPD)
Tripsina	Paraoxon
Colinesterases*	DFP e seus análogos Paraoxon TEPP, TIPP, NPD
Esterase hepática	DFP
Esterase de laranja e trigo	TEPP DFP
Esterase-B	Paraoxon TEPP

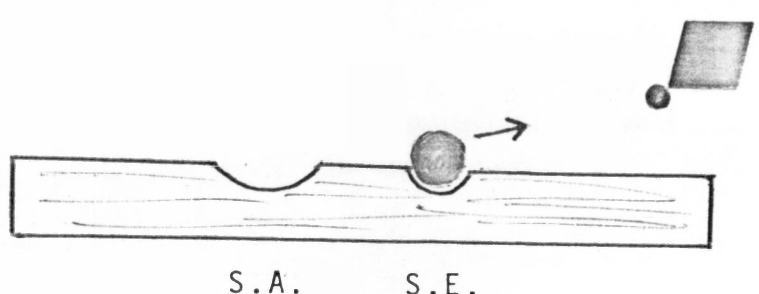
*do soro e acetilcolinesterase



1. Representação esquemática da enzima.



2. Composto organofosforado ligado ao sítio esterásico (ligação do tipo Coulomb).



3. Fosforilação da enzima no sítio esterásico.

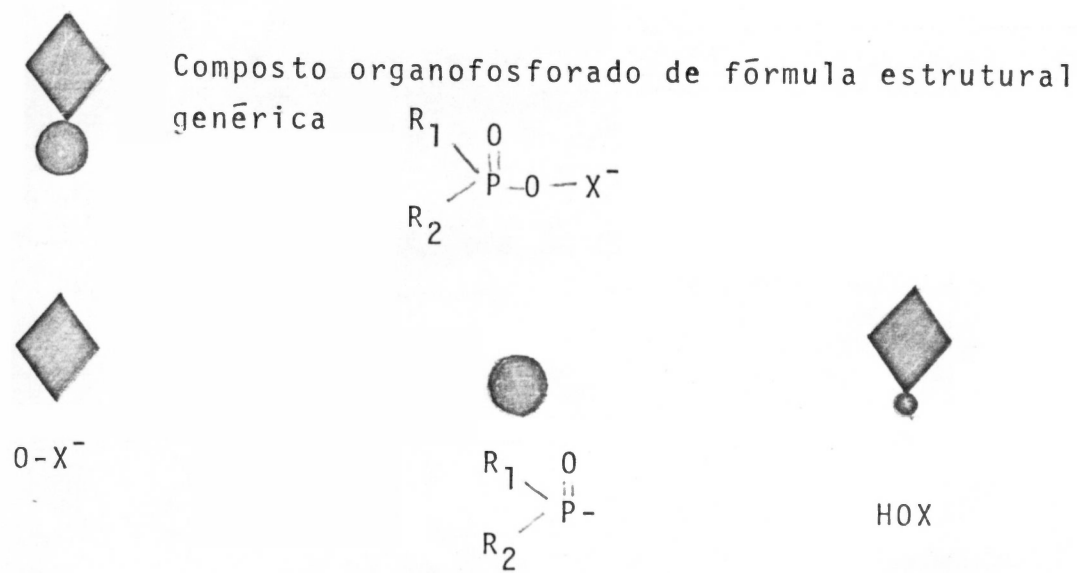


Fig.2. Diagrama do processo de inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados (de acordo com Matsumura, 1985)

diferenciá-las (Aldridge, 1953a,c).

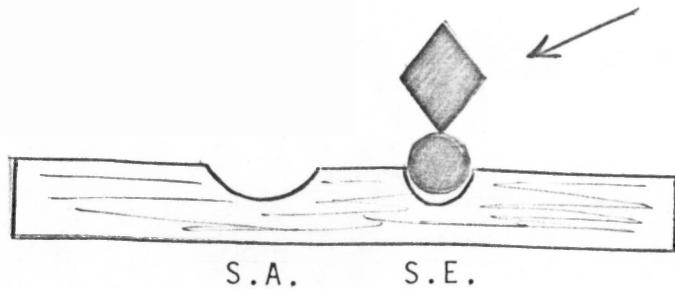
As manifestações clínicas das intoxicações por inseticidas organofosforados são consequência do acúmulo do neurotransmissor acetilcolina, devido à inibição da acetilcolinesterase, e se traduzem nos chamados efeitos muscarínicos, nicotínicos e efeitos sobre o sistema nervoso central (Edson, 1955; Holmstedt, 1959; Schvartsman, 1979), resumidos na tabela 4.

Os efeitos muscarínicos são consequência da ação da acetilcolina nas células nervosas pós-ganglionares e levam à estimulação das células efectoras. Os efeitos nicotínicos são resultado da ação sobre os elementos somáticos nervosos que levam à estimulação seguida por paralisia da musculatura voluntária. Os efeitos sobre o sistema nervoso central são originários da ação direta da acetilcolina sobre os neurônios (Radeleff, 1964, de acordo com Matsumura, 1985).

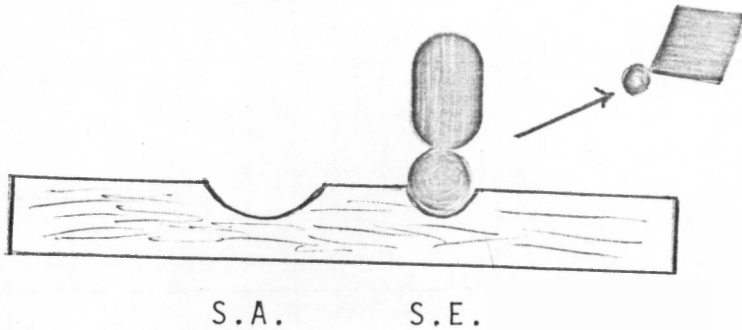
O esquema terapêutico atualmente utilizado, com resultados satisfatórios, compreende o uso de dois antídotos: sulfato de atropina e derivados das oximas. O primeiro funciona como antídoto farmacológico eficaz nas manifestações muscarínicas e distúrbios do sistema nervoso central. Seu uso deve ser precoce e prolongado por no mínimo, 24 a 48 horas. A introdução dos derivados das oximas na terapêutica, modificou radicalmente o aspecto das intoxicações por compostos organofosforados, permitindo a recuperação dos casos outrora considerados fatais. Segundo Askew (1956), Kewitz e Nachmansohn (1957), o antídoto pode reativar 80% da enzima inibida, em um minuto (Fig. 3). Os derivados mais utilizados das oximas são o PAM (piridina aldoxima metiodida) e o sulfoxilato de N-metil alfa piridilaldoxima

Tabela 4. Sinais e sintomas das intoxicações, classificados pelo órgão atingido (elaborada a partir dos dados de Schwartsman (1979)).

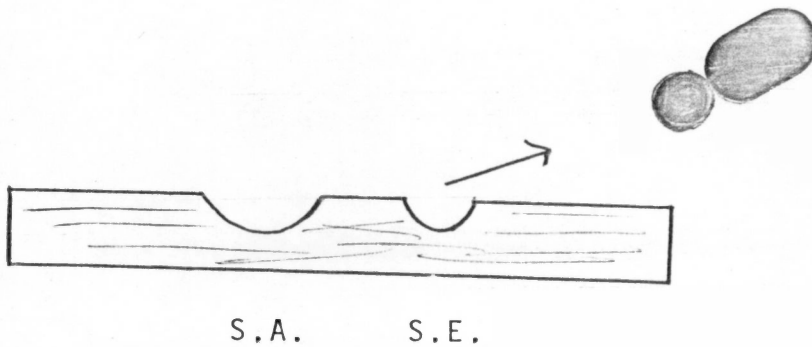
<u>Efeitos e órgãos atingidos</u>	<u>Sinais e Sintomas</u>
Muscarínicos	
trato gastrointestinal	anorexia, náuseas, vômitos, cólicas, aumento do peristaltismo e diarreia.
glândulas exócrinas	sudorese, sialorréia e lacrimejamento
trato respiratório	dispnéia, cianose, bronquioconstrição, acúmulo de secreções brônquicas levando a edema agudo pulmonar.
globo ocular	midríase inicial seguida de miose.
Nicotínicos	
musculatura esquelética	tremores de língua, lábios, pálpebras, espasmos musculares atingindo o pescoço e face.
Sobre o Sistema Nervoso Central	
	cefaléia, tonturas, tremores, ataxia, distúrbios da palavra, convulsões e coma.



1. Enzima inibida pelo composto organofosforado, e o derivado de oxima entrando em ação no processo de detoxicação.



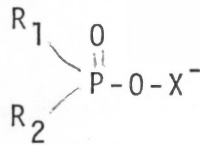
2. O composto organofosforado se liga ao derivado da oxima, mas ainda permanece ligado a enzima.



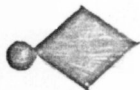
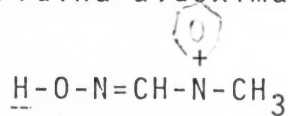
3. O composto organofosforado se desliga da enzima.



Composto organofosforado de fórmula estrutural genérica



Piridina aldoxima metiodida (derivado da oxima)



HOX



H

Fig.3. Mecanismo de ação do PAM (piridina aldoxima metiodida) sobre a enzima inibida por composto organofosforado (esquema elaborado a partir dos dados de Schwartsman, 1979)

(no Brasil com o nome comercial de Contrathion). Seus efeitos se fazem sentir principalmente sobre as manifestações nicotínicas para as quais a atropina é ineficaz (Schvartsman, 1979). A conduta terapêutica auxiliar é apresentada na tabela 5.

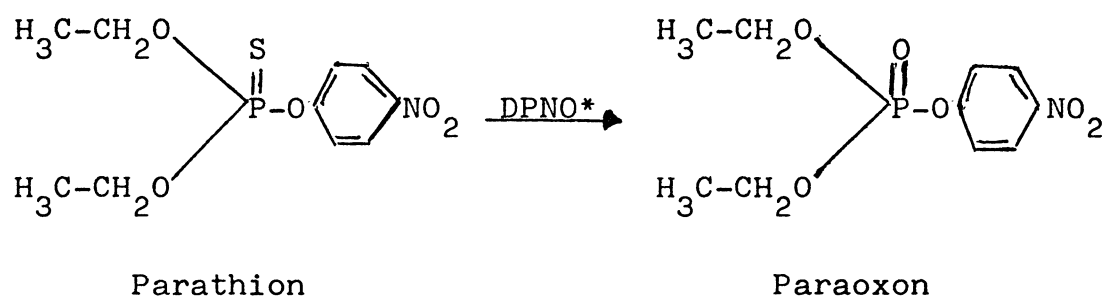
Alguns compostos organofosforados, como o Paraoxon, agem diretamente sobre a acetilcolinesterase sem sofrer alterações metabólicas prévias. No entanto, os tiofosfatos (como o Parathion), que constituem a maioria dos compostos atualmente utilizados, só se tornam tóxicos no fígado, após uma transformação metabólica, que consiste na troca do enxofre pelo oxigênio, catalisada pela difosfopiridina nucleotídeo oxigenase (DPNO) na fração microsomal hepática (Fig. 4). O análogo oxigenado resultante é o inibidor das esterases (DuBois e Geiling, 1959). Gage (1953) relatou a existência de uma outra substância que inibe a acetilcolinesterase nas intoxicações por Parathion, a qual é isômera deste composto (Fig. 5).

Os efeitos tóxicos dos inseticidas organofosforados não se restringem à inibição da acetilcolinesterase e da colinesterase do soro. Há evidências de que afetam outros órgãos não relacionados diretamente com a intoxicação. Shain e cols. (1977) perceberam uma alteração significativa na homeostasia prostática de ratos sobre a ação do Parathion e de outros compostos. Espir e cols. (1970) relataram a ocorrência de quatro casos de impotência sexual em cinco lavradores ingleses que utilizavam inseticidas e pesticidas. Os autores não conseguiram atribuir o fenômeno a um composto particular, porém as suspeitas recaem sobre o Metassystox, que é um organofosforado.

Há evidências de que muitos agrotóxicos, dentre os organofosforados e alguns organoclorados, seriam responsáveis por alterações hematológicas suficientemente graves para comprometer a resposta imune (Street e Sharma, 1975).

Tabela 5. Terapêutica complementar nos casos graves de intoxicação por compostos organofosforados (elaborada a partir dos dados de Schvartsman, 1979).

<u>Medida</u>	<u>Procedimento</u>
Assistência às condições respiratórias	Manutenção da permeabilidade das vias aéreas superiores, administração de oxigênio, aspiração enérgica e freqüente, entubação endotraquial, traqueostomia e respiração artificial quando necessário.
Medicação	Barbitúricos ou diazepínicos nos casos com convulsões.
Outros cuidados	Correção dos distúrbios hidroeletrólíticos, aporte calórico adequado, administração de analgésicos e anti-espasmódicos, antibióticos de largo espectro, monitorização e vigilância rigorosa pelo menos nas primeiras 48 horas.



*DPNO = difosfopiridina nucleotídeo oxigenase

Fig. 4. Transformação do Parathion no seu análogo oxigenado (Paraoxon), segundo DuBois e Geiling (1959).

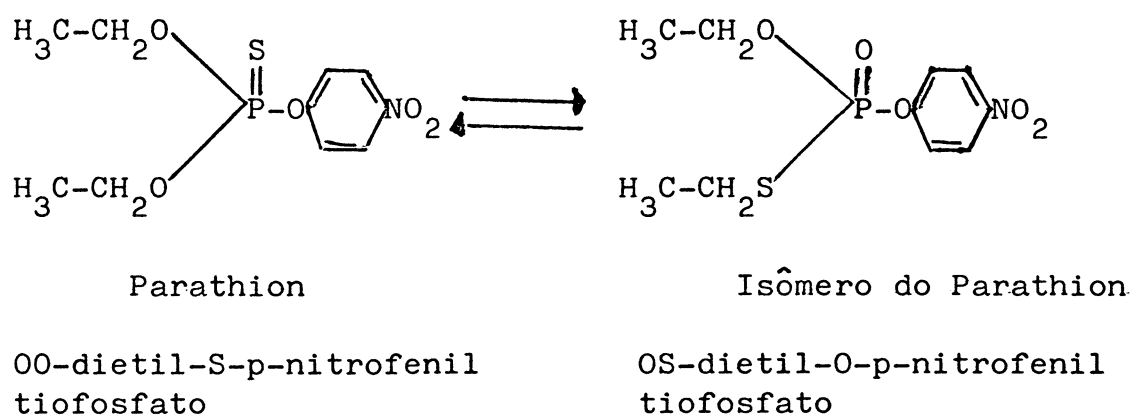


Fig.5 Isômero do Parathion capaz de inibir a acetilcolinesterase sem sofrer a transformação no fígado (Gage, 1953).

Já foi evidenciado o efeito de mutagênese, observado em bactérias (Centeno e cols., 1988), em camundongos (Salvadori e cols., 1985, 1986_{a,b} e Ribeiro e cols., 1986), no homem (Larripa e cols., 1983) e em Drosophila melanogaster (Velázquez e cols., 1986).

Como os compostos organofosforados inibem a atividade da acetilcolinesterase e da colinesterase do soro, os métodos de diagnóstico de intoxicações por estes compostos estão fundamentados nesta peculiaridade, como o método de Limperos e Ranta (1953) modificado por Edson e Fenwick (1955). Usando este mesmo princípio existem métodos de pesquisa de resíduos de organofosforados, principalmente em alimentos. Estes métodos detectam quantidades infinitesimais de organofosforados pela inibição de certa quantidade de enzima purificada (Nanda-Kumar e cols., 1976; Nanda-Kumar e Ramasundari, 1980; Udaya-Bhaskar e Nanda-Kumar, 1981, 1982). Para os carbamatos existem provas baseadas no mesmo princípio (Mendoza e Shields, 1970, 1971).

1.3.2 Metabolização

Entre os sistemas enzimáticos responsáveis pela degradação dos compostos organofosforados, dois grandes grupos distintos de sistemas enzimáticos são importantes. São os sistemas oxidativos e hidrolíticos. No fígado, quatro enzimas degradam vários compostos organofosforados: (a) uma esterase estimulada por íons Ca^{++} que degrada dietilfosfatos (Kojima e O'Brien, 1968, segundo Matsumura, 1985); (b) uma DFPase estimulada por íons Mn^{++} e Co^{++} (Mounter e cols., 1955); (c) uma Malathion carboxilase (Main e Braid, 1962) e (d) uma enzima que degrada Diclorvós e é caracterizada pela ativação por íons Mn^{++} . A última enzima seria idêntica a segunda, e a primeira é encontrada também no soro e muitas vezes conhecida como paraoxonase (Matsumura, 1985).

Aldridge (1953b) percebeu que a esterase aromática (esterase-A) de certos animais (cavalo, coelho e rato) era capaz de hidrolisar o Paraoxon. Na época, esta enzima foi denominada de esterase-E600. Em trabalho anterior, Aldridge (1953a) já mencionava o fato de que uma maior concentração de organofosforado é necessária para inibir a acetilcolinesterase eritrocitária na presença do soro. Atualmente, a esterase-E600 é conhecida como paraoxonase (EC 3.1.1.2) e catalisa a hidrólise do Paraoxon em produtos menos tóxicos: ácido dietilfosfórico e p-nitrofenol (Aldridge, 1953b) que são eliminados pela urina (Geldmacher -v. Mallinckrodt, 1978), como mostra a figura 6.

Ball e cols. (1954) perceberam que ratos pré-tratados com compostos organoclorados (Aldrin) eram mais resistentes ao Parathion. Os autores notaram um aumento na atividade da esterase-E600 (paraoxonase) com o pré-tratamento, o que explica em parte a resistência observada. Sabe-se também que os organoclorados possuem uma ação hepatotóxica, que poderia provocar algum dano ao fígado, de modo que o animal não pudesse transformar o Parathion em Paraoxon (ver Fig.4).

As diferenças quantitativas na atividade da paraoxonase refletem uma diferença qualitativa na enzima do soro de indivíduos de genótipos distintos (Eckerson e cols., 1983a). Dependendo destes genótipos haveria uma proteção maior ou menor contra a intoxicação por agrotóxicos organofosforados em indivíduos cronicamente expostos a eles (Geldmacher-v.Mallinckrodt e cols., 1979).

Mounter e Whittaker (1953) relataram uma esterase do soro humano capaz de hidrolisar o Paraoxon e o DFP. Esta enzima é a paraoxonase considerada por alguns autores como a arilesterase (EC 3.1.1.2). A atividade da arilesterase tem sido medida com

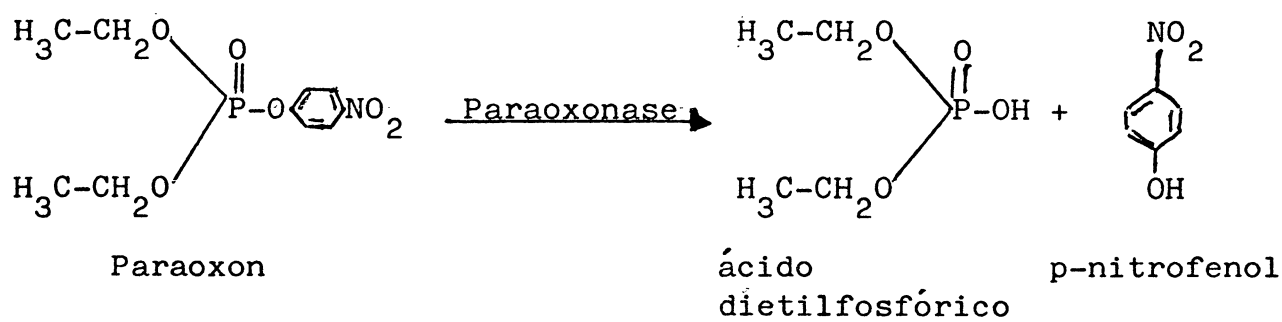


Fig.6 Hidrólise do Paraoxon pela paraoxonase (Geldmacher-v. Mallinckrodt, 1978).

vários substratos: fenilacetato (Kitchen e cols., 1973), o e p-nitrofenilacetato (Huggins e Lapidés, 1947), beta-naftilacetato (Burlina e cols., 1977), vinilacetato (Augustinsson, 1964) e tiofenilacetato (Mendoza e cols., 1976). Exatamente como a paraoxonase, requer íons Ca^{++} para a atividade (Marton e Kalow 1962), portanto é inibida em presença de EDTA e pelo PMB (p-hidroximercuribenzeno)(Augustinsson, 1961) e não o é por inibidores da colinesterase do soro. A estreita correlação entre a atividade da arilesterase e da paraoxonase dentro de três fenótipos (atividade alta, média e baixa) sugere que as duas atividades devam ser propriedade da mesma enzima (Eckerson e cols., 1983b).

1.4 Consumo de Agrotóxicos - Situação do Brasil e do Paraná

No período de 1964 a 1984 houve um acréscimo de 279% no consumo de agrotóxicos no Brasil. Os estados que mais consumiram foram: São Paulo (35%), Paraná (20%) e Rio Grande do Sul (18%). No mesmo período a produção nacional de agrotóxicos sofreu um estímulo de incentivos fiscais e outras facilidades, sendo que a produção no país em 1964 chegava a 25% dos agrotóxicos comercializados, alcançando 75% em 1984 (Rüegg e cols., 1986). A tabela 6 mostra os compostos organofosforados produzidos atualmente no Brasil.

O aumento do consumo tem trazido consequências ao meio ambiente. Cáceres e cols. (1987) descreveram a contaminação de águas de 38 reservatórios de 7 bacias hidrográficas localizadas no Estado de São Paulo, por agrotóxicos organoclorados (BHC, DDT, Heptacloro, Clordane, Aldrin, Dieldrin e Endrin). Como a comercialização e uso destes compostos no Brasil é proibida, é provável que dentro de algum tempo a contaminação destas águas

Tabela 6. Compostos organofosforados atualmente produzidos e utilizados no Brasil (segundo o Compêndio de Defensivos Agrícolas, 1987).

Nome Comercial	Princípio Ativo	Classe		Fabricante ³
		Uso ¹	Tox. ²	
Acefato Fersol	Acephate	I+A	III	11
Actellic 500	Pirimphos	I	III	15
Afigran	Disulfoton	I+A	I	17
Afugan CE	Pirazophos	F+I	II	13
Alacran 400 BR	Monocrotophos	I+A	I	18
Anthio	Formothion	I+A	I	21
Azincol 400 E	DOBT	I+A	I	27
Azodrin 75 UBV/400 E	Monocrotophos	I+A	I	23
Basudin	Diazinon	I	III	06
Biation 600	Parathion	I	I	28
Birlane 250 P	Chlorfenviphos	I	I	23
Briten 60 S	DHT	I	II	24
Cefanol	Acephate	I+A	IV	18
Ceratix	Ethion	I	III	07
Curacron 250/500 UBV	Profenophos	I+A	II	06
Cythion 1000	Malathion	I	II	08
Danex 50 LC	Trichlorphon	I+L	III	27
Danex 80 PM	Trichlorphon	I	III	27
DDVP CE/100 CE	DDVP	I+A	II	09
DDVP	DDVP	I+A	II	26
DDVP CE Pikapau	DDVP	I+A	II	22
Devepan	DDVP	I+A	II	18
Diazenon 600 CE	Diazinon	I+A	II	06
Dimecron 500	Phosphamidon	I	I	06
Dimetoato	Dimethoato	I+A	II	12
Dimetoato 500 CE	Dimethoato	I+A	I	26
Dimetol	Dimethoato	I	II	27
Dimexion	Dimethoato	I+A	I	13
Dipterex 500/Pó 25	Trichlorphon	I+L	II	04
Disyston GR 25/GR 50	Dissulfoton	I+A	I	04
Ekatin	Thiometon	I+A	II	21
Ethion 500	Diethion	I+A	II	07
Fenix	Ethoprophos	I+N	III	20
Folidol 600/Pó 1,5%	Parathion	I+A	I	04
Folimat	Omethoato	I+A	I	04
Fosfamidon	Phosphamidon	I	I	28
Fosferno 500 ED	Malathion	I+A	III	15
Fostiol 600	Parathion	I	I	23

Tabela 6. Cont.

Nome Comercial	Princípio Ativo	Classe		Fabricante ³
		Uso ¹	Tox. ²	
Fosvan	DDP	I+A	I	19
Frumin	Dissulfoton	I+A	I	21
Gesaverol 4	Malathion	I	III	06
Granutox	Phorato	I+A	I	08
Gusathion 400	Azinphos	I+A	I	04
Hinosan	Edifenphos	F	I	04
Hostathion 400 BR	Triazophos	I+A	I	13
Ihara Dimethoate 50	Dimethoato	I+A	II	16
Imidan	Phosmet	I	II	25
Kilvan 300	Vamidothion	I+A	II	20
Kitazin GR/Pó 25	IBP	F	IV	16
Kitazin 480 CE	IBP	F	II	16
Lebaycid EC/500	Fenthion	I+A	II	04
Lebaycid Pó	Fenthion	I+A	III	04
Lorsban 240 UBV/480 BR	Chlorpiriphos	I+A	II	10
Malafog	Malathion	I	II	08
Malagran	Malathion	I	III	08
Malathion 40 Pikapau	Malathion	I	IV	22
Malathion 50 CE	Malathion	I	III	26
Malational	Malathion	I	III	27
Malatol 20/40 P	Malathion	I	III	08
Malatol UBV	Malathion	I	III	08
Mata Gorgulhos	Malathion	I	III	02
Metassystox CE 250	Demethon	I+A	I	04
Methyl Parathion 600	Parathion	I	I	01
Narol CE	Chlorpiriphos	I+A	II	27
Nexion 400 CE	Bromophos	I	III	05
Nuvacron 250 UBV	Monocrotophos	I+A	I	06
Nuvan 1000 CE	Dichlorvos	I+A	I	06
Orthene 750/3% Pó	Acephate	I	III	14
Ortho Hamidop 600	Methamidophos	I+A	I	14
Parathion 60-E Pikapau	Parathion	I+A	I	22
Paratiol 60-E	Parathion	I	I	27
Perfecthion	Dimethoato	I	I	03
Phosdrin	Mevinphos	I	I	23
Pik-Rex Pikapau	Trichlorphon	I	IV	22
Rhodiatox 60	Parathion	I+A	I	07
Riton 100 CE	Dichlorvos	I	II	24
Roxion	Dimethoato	I	II	05
Shellgran	Malathion	I	IV	23

Tabela 6. Cont.

Nome Comercial	Princípio Ativo	Classe		Fabricante ³
		Uso ¹	Tox. ²	
Solvirex G 50/GR 100	Disulfoton	I+A	I	21
Sumapó. 2	Fenitrothion	I	IV	02
Sumifog	Fenitrothion	I+f	III	16
Sumithion PM/500 CE	Fenitrothion	I	II	16
Supraciol	Methidathion	I+A	I	06
Swingtox Malatol 600	Malathion	I	III	08
System 10 GR	Disulfoton	I	I	18
Tamacron BR	Methamidophos	I+A	I	04
Toxaparatiol 655-E	Parathion	I	I	27
Trichlorphon Pikapau	Trichlorphon	I	III	22
Trichlorphon 500	Trichlorphon	I	II	29
Trichlorphon 80 PS	Trichlorphon	I	II	28
Trifonal 50 S	Trichlorphon	I	III	18
Trithion TM 480 CE	Carbophenothion	I+A	II	20
Zolone 350 BR	Phosalone	I+A	I	25

1= Classe de uso: A= acaricida; F= fungicida; f= formicida
I= inseticida; L= larvicida; N= nematocida

2= Classe toxicológica: segundo portaria interministerial (MA/MS 220/79) que estabelece as classes toxicológicas e a cor da tarja que deve estar no rótulo do produto:

I= altamente tóxico = tarja vermelha

II= medianamente tóxico = tarja amarela

III= pouco tóxico = tarja azul

IV= praticamente atóxico = tarja verde

3= Fabricante: Código	Fabricante	Código	Fabricante
01	Agrocerec	16	Iharabras
02	Agro-química	17	Inabras
03	Basf	18	Ipiranga
04	Bayer	19	Labormax
05	Boehringer	20	Rhodia
06	Ciba-Geigy	21	Sandoz
07	CNDA	22	São Vicente
08	Cyanamid	23	Shell
09	Defensa	24	Sintesul
10	Dow	25	Stauffer
11	Fersol	26	Sultox
12	Herbitécnica	27	Usina Colombiana
13	Hoechst	28	Velsicon
14	Hokko	29	Diversos fabricantes
15	ICI		

seja por agrotóxicos organofosforados em quantidades crescentes.

A contaminação de águas traz uma consequência imediata: a ação dos produtos tóxicos sobre animais e plantas do meio aquático. Saroja e Bose (1982) perceberam que a alga unicelular Chlorella protothecoides tem seu crescimento inibido na presença de Parathion, além do fato de sofrer alterações no número e volumes celulares e conteúdo de pigmentos (clorofila e carotenóides).

Os compostos organofosforados, apesar de serem geralmente menos tóxicos e alguns biodegradáveis (Andrea e cols., 1982) não são isentos de perigos. Zambroni (1986, segundo Palermo-Neto e cols., 1987) relatou 141 casos de intoxicação aguda por estes compostos no período de 1984 a 1985, constituindo 23,8% das intoxicações por agrotóxicos verificadas no Centro de Controle de Intoxicações de Campinas (SP).

No Paraná foram oficialmente registradas, nos anos de 1984 e 1987, 4.598 casos de intoxicação por agrotóxicos de acordo com levantamento efetuado pela Divisão de Toxicologia da Secretaria de Estado da Saúde (SESA), como mostra a tabela 7. Em 1987 o órgão iniciou a classificação das intoxicações de acordo com os tipos de acidentes ocorridos com o uso de agrotóxicos (profissionais, acidentais, abuso, tentativa de suicídio, outros). Estes acidentes são mais comuns em homens (87,5% dos casos). A frequência de tentativas de suicídio utilizando agrotóxicos (13,6%) demonstra que existe certa facilidade ao acesso a esses produtos (tabela 8).

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde, estes números devem representar uma subestimativa, uma vez que estes acidentes não são de notificação compulsória.

A tabela 9 mostra os compostos tóxicos que mais causaram intoxicações no Paraná nos anos de 1983 a 1984, sendo registrados

Tabela 7. Número de intoxicações por agrotóxicos e de óbitos por eles provocados, comunicados à Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, no período de 1984 a 1987.

<u>Ano</u>	<u>Nº de casos</u>	<u>%</u>	<u>Óbitos</u>	<u>%</u>
1984	2.164	47,1	158	7,3
1985	1.119	24,3	106	9,5
1986	748	16,3	72	9,6
1987	567	12,3	39	6,9
<u>Total</u>	<u>4.598</u>	<u>100,0</u>	<u>375</u>	<u>8,1</u>

Fonte: DT/DECD/FCMR/SESA

Tabela 8. Acidentes provocados pelo mal uso de agrotóxicos registrados no Paraná, no ano de 1987, segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná.

<u>Tipo de Acidente</u>	<u>Nº de Casos</u>	<u>%</u>
Profissional	363	64,0
Acidental	95	16,7
Abuso	14	2,5
Tentativa de suicídio	77	13,6
Outros	18	3,2
<hr/>	<hr/>	<hr/>
Total	567	100,0
<hr/>	<hr/>	<hr/>
Homens	496	87,5
Mulheres	71	12,5

Fonte:DT/DECD/FCMR/SESA

Tabela 9. Relação de agrotóxicos responsáveis pela maioria das intoxicações no Estado do Paraná, nos anos de 1983 e 1984 (segundo Skalisz, 1984).

Nome Comercial	Princípio Ativo	Número de Casos				
		1983	%	1984	%	Total
ORGANOFOSFORADOS						
Azodrin	Monocrotophos	201	12,8	205	12,4	406
Bidrin	Dicrotophos	44	2,8	87	5,2	131
Curacron	Profenophos	25	1,6	37	2,2	62
Dimetoato	Dimethoato	9	0,6	15	0,9	24
Diasyston	Disulfothon	5	0,3	26	1,6	31
Folidol 60	Parathion	191	12,2	209	12,6	400
Fostion 60	Parathion	44	2,8	27	1,6	71
Frumin	Disulfothon	79	5,0	40	2,4	119
Lorsban	Clorpirophos	29	1,8	37	2,2	66
Metassystox	Demethon	135	8,6	144	8,7	279
Nuvacron 400	Monocrotophos	186	11,9	154	9,3	340
Parathion 60	Parathion	73	4,7	73	4,4	146
Perfecthion	Dimetoato	29	1,8	52	3,1	81
Tamaron	Methamidophos	16	1,0	48	2,9	64
Total Organofosforados		1066	68,1	1154	69,6	2220
ORGANOCLORADOS						
Aldrin 40 TS	Aldrin	29	1,8	45	2,7	74
BHC	HCH	22	1,4	10	0,6	32
Dicarol	Dicofol	8	0,5	38	2,3	46
Endrex	Endrin	206	13,1	76	4,6	282
Endrin 20	Endrin	34	2,2	23	1,4	57
Thiodan EC	Endosulfan	34	2,2	74	4,5	108
Total Organoclorados		333	21,3	266	16,0	599
CARBAMATOS						
Furadan	Carbofuran	60	3,8	64	3,9	124
Rhodyauran	Thiran	12	0,8	8	0,5	20
Temik 10 G	Aldicarb	24	1,5	35	2,1	59
Total Carbamatos		96	6,1	107	6,4	203
OUTROS COMPOSTOS						
Decis	Deltamethrine	27	1,7	56	3,4	83
Gramoxone	Paraquat	16	1,0	26	1,6	42
Round up	Gliphosate	9	0,6	10	0,6	19
Trifluralina	Trifluralin	19	1,2	38	2,3	57
Total Outros Compostos		71	4,5	130	8,0	201
Total Geral		1566	100,0	1657	100,0	3223

3223 casos (Skaliesz, 1984). Segundo este autor estes dados também, muito provavelmente, devem se constituir numa subestimativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostra

2.1.1 Convênio Núcleo Profilático - Acarpa

O Núcleo Profilático Universitário Prof. Pereira Filho, órgão suplementar da Universidade Federal do Paraná (Setor de Ciências da Saúde), manteve um convênio com a Acarpa (Associação de Crédito e Assistência Rural do Paraná). Neste convênio o Núcleo Profilático media a atividade da acetilcolinesterase eritrocitária, em lavradores do interior do Paraná, com a finalidade de diagnosticar intoxicações por agrotóxicos (organofosforados e carbamatos). Por outro lado, a Acarpa era responsável pela reunião, em salões paroquiais, escolas, posto de saúde, etc, dos lavradores interessados em fazer o exame. Após a realização dos exames, os resultados já eram divulgados e os lavradores alertados sobre os riscos decorrentes do uso destes produtos.

No período compreendido entre agosto de 1984 e julho de 1986, foram visitados 29 municípios paranaenses, através deste convênio.

2.1.2 Caracterização da Amostra

As amostras de sangue foram coletadas nos locais onde foi feita a medição da acetilcolinesterase eritrocitária. Com base no resultado desta, selecionava-se um grupo de intoxicados (atividade entre 50,0 a 87,4%) e outro de controles (atividade entre 87,5 a 100,0%). Em alguns locais, entretanto, isto não foi possível, pois os escolhidos para um ou outro grupo se recusaram a colaborar com este trabalho. Nos locais do exame não foram encontradas atividades da acetilcolinesterase inferiores a 50%, o que indica não termos coletado dados de intoxicados muito graves (ver tabela 10).

Tabela 10. Caracterização da amostra de acordo com a atividade da acetilcolinesterase eritrocitária.

<u>Atividade da AChE*</u>	<u>Caracterização</u>	<u>Número</u>	<u>%</u>
50,0 a 62,4%	Intoxicado	26	19,4
62,5 a 74,9%	Intoxicado	30	22,4
75,0 a 87,4%	Intoxicado	16	11,9
87,5 a 100,0%	Controle	62	46,3
	Total	134	100,0

*Acetilcolinesterase eritrocitária

Para as coletas de sangue foram utilizados tubos Vacutainers (Becton-Dickinson), sendo que nas primeiras 60 amostras o anticoagulante foi o EDTA e nas 74 restantes, a heparina. Elementos figurados e plasma foram separados e estocados em freezer a -20°C .

Foram coletadas 134 amostras de sangue de lavradores que utilizaram agrotóxicos (organofosforados, carbamatos, organoclorados, piretróides, biperidílicos, etc), num total de 19 municípios (Tabela 11).

No momento da coleta foi preenchido um questionário de modo a se obter, de cada indivíduo, as seguintes informações: nome, idade, grau de instrução, naturalidade, local de nascimento dos pais e avós, endereço, resultado do exame da acetilcolinesterase eritrocitária e agrotóxicos que normalmente utiliza. Após a divulgação dos resultados dos exames, solicitava-se que os lavradores colaborassem com doação de pequena quantidade de sangue (10 ml).

A amostra foi caracterizada em controles e intoxicados, sendo 62 controles (atividade da AChE = 87,5 a 100,0%) e 72 intoxicados (atividade de 50,0 a 87,4%).

A idade média dos indivíduos amostrados ($\bar{x} \pm \text{E.P.}$) foi de $34,2 \pm 1,1$ anos, sendo a amplitude de variação de 14 a 73 anos. Nos intoxicados, a idade média foi de $33,7 \pm 1,6$ anos e nos controles de $34,7 \pm 1,4$ anos. Na amostra total há 13 mulheres e 121 homens.

A amostra total é constituída por paranaenses (67,2%), gaúchos (12,7%), catarinenses (9,7%), paulistas e mineiros (8,2%), nordestinos (1,5%) e um indivíduo nascido no Japão. Os integrantes da amostra são caucasóides em sua maioria (91,0%) e descendem principalmente de poloneses, italianos e portugueses. Também há negróides (mulatos claros e negros) com uma freqüência de 7,5% e asiáticos (1,5%). Foi constatada uma freqüência de analfabetismo

Tabela 11. Número de controles e intoxicados, classificados de acordo com os locais de coleta da amostra.

<u>Município</u>	<u>Controles</u>	<u>Intoxicados</u>
Antônio Olinto	3	0
Assis Chateaubriand	0	4
Borrazópolis	0	6
Cafelândia do Oeste	2	3
Cambará	6	10
Chopinzinho	19	0
Colombo	1	7
Imbituva	0	8
Ivaí	0	4
Marechal Mallet	2	3
Missal	0	3
Paula Freitas	3	3
Paulo Frontin	2	6
Quitandinha	2	2
Santa Terezinha de Itaipu	4	2
Santo Antônio da Platina	4	8
São João do Triunfo	4	3
São Mateus do Sul	7	0
Teixeira Soares	3	0
Total	62	72

Tabela 12. Número de controles e intoxicados, classificados de acordo com a origem.

Origem	Controles		Intoxicados	
	N	%	N	%
Paraná	38	61,3	52	72,2
Rio Grande do Sul	10	16,1	7	9,7
Santa Catarina	8	12,9	5	6,9
São Paulo-Minas Gerais	5	8,1	6	8,3
Nordeste	1	1,6	1	1,4
Japão	0	-	1	1,4
Total	62	100,0	72	100,0

da ordem de 11,9%, sendo que 44,8% dos integrantes da amostra não concluíram o primeiro grau, 29,1% têm o primeiro grau completo, 8,9% têm o segundo grau incompleto, apenas 4,5% completaram o segundo grau e 0,7% tem curso superior em agronomia (Tabela 13).

2.2 Medição da Atividade da Acetilcolinesterase Eritrocitária

A medição da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária foi realizada pelo método de Limperos e Ranta (1953), modificado por Edson e Fenwick (1955), usando-se perclorato de acetilcolina como substrato e azul de bromotimol como reagente de cor. As porcentagens de atividade em relação a um padrão normal (100%) foram lidas com o auxílio de um disco comparador de cor Lovibond 5/30. Este indicava as atividades de 0 a 100%, em intervalos de 12,5%. As cubetas utilizadas eram de cristal de 2,5 mm de largura e o volume de sangue total foi colhido com uma pipeta de 10 μ L (microlitros).

2.3 Fenótipos da Colinesterase do Soro

2.3.1 Loco CHE1

A determinação dos fenótipos do loco CHE1 foi realizada primeiramente pelo método de Morrow e Motulsky (1968), que separou os fenótipos CHE1 U e CHE1 UA. O substrato foi o acetato de alfa-naftila (Sigma); o reagente de cor, Fast Red (Sigma) e o inibidor Ro2-0683 (dimetilcarbamato de brometo de 2-hidroxi-5 - fenil-benzimetila amônio).

Numa segunda etapa foi utilizada a técnica de Alcântara e cols. (1991) desenvolvida a partir de Morrow e Motulsky (1968)

Tabela 13. Número de controles e intoxicados, classificados de acordo com o grau de instrução.

<u>Grau de Instrução</u>	<u>Controles</u>		<u>Intoxicados</u>	
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
Analfabeto	7	11,3	9	12,5
1º Grau Incompleto	19	30,6	41	56,9
1º Grau Completo	24	38,7	15	20,8
2º Grau Incompleto	9	14,5	3	4,2
2º Grau Completo	3	4,9	3	4,2
Superior	0	-	1	1,4
Total	62	100,0	72	100,0

e de Whittaker e cols. (1981) para que se definissem os fenótipos CHE1 UF e CHE1 AK. A técnica utiliza acetato de alfa-naftila como substrato, Fast Red como reagente de cor e os inibidores Ro2-0683 e DL-propranolol.

Alguns plasmas (14 ao todo), devido a problemas de transporte, apresentaram-se hemolisados e, portanto não foram examinados para o loco CHE1

2.3.1.1 Método de Morrow e Motulsky (1968)

O princípio do método é a hidrólise do acetato de alfa-naftila pela colinesterase do soro, dando origem ao alfa-naftol que se liga ao sal diazônio (cloreto de 5-cloro-2-toluenodia-zônio = Fast Red), produzindo cor púrpura proporcional à concentração de alfa-naftol produzido, que depende da atividade enzimática. Em presença do inibidor (Ro2-0683) a enzima usual apresenta maior grau de inibição, enquanto que a enzima atípica sofre uma inibição menor a ponto de se poder fazer uma distinção entre os indivíduos com fenótipo usual (CHE1 U), atípico (CHE1 A) e intermediário (CHE1 UA).

O soro é diluído (1/100) em tampão fosfato, o qual é preparado do seguinte modo:

Solução A: Na_2HPO_4 0,2 M = 670 ml

Solução B: NaH_2PO_4 0,2 M = 330 ml

O pH é medido em potenciômetro e ajustado (pH 7,1), se necessário, com uma das soluções (A ou B).

A solução estoque de substrato é preparada da seguinte maneira (0,03 mol/L):

acetato de alfa-naftila	56 mg
acetona P.A.	5 ml
água destilada	5 ml

O substrato é inicialmente dissolvido em acetona e, em seguida, adiciona-se água destilada. A solução é estável à temperatura de 4 a 8°C por 30 dias e, para uso, dilui-se 1 ml desta solução em 20 ml de tampão e completa-se o volume para 100 ml com água destilada.

A solução de Fast Red era preparada no momento do uso da seguinte forma:

Fast Red 50 mg
 Duponal (lauril sulfato de sódio) a 3% em água destilada 10 ml
 Água destilada 15 ml

A solução de inibidor (Ro2-0683 10^{-3} mol/L) era preparada da seguinte maneira:

Ro2-0683 39,3 mg
 Tampão fosfato 100,0 ml

A solução estoque é mantida em geladeira e para uso deve ser feita uma diluição de 1/1.000 em tampão fosfato.

O esquema abaixo ilustra o procedimento:

Reagentes	Tubos (ml)		
	Branco	Teste	Inibição
Soro (1/100)	-	0,5	0,5
Tampão fosfato pH 7,1	0,5	0,5	-
acetato de alfa-naftila (0,03 mol/L)	3,5	3,5	3,5
Ro2-0683 (10^{-3} mol/L)	0,5	-	0,5
Incubação a 37°C por 60 minutos			
Fast Red	0,5	0,5	0,5
Água destilada	5,0	5,0	5,0

Aguardar 15 minutos à temperatura ambiente.

Após este procedimento, os tubos teste e de inibição foram lidos contra o branco, em espectrofotômetro a 555 nm.

A porcentagem de inibição era calculada da seguinte maneira:

$$P = \frac{T - I}{T} \times 100$$

onde: T = absorbância do tubo teste

I = absorbância do tubo de inibição

2.3.1.2 Método de Alcântara e cols. (1991)

Foi desenvolvido um método baseado em dois outros. O primeiro é o de Morrow e Motulsky (1968), o qual já foi previamente descrito. O outro é o de Kalow e Genest (1957) como adaptado por Whittaker e cols. (1981) que utiliza benzoilcolina como substrato e propranolol como inibidor. A temperatura de reação é de 26°C e a leitura, em espectrofotômetro, é feita num comprimento de onda de 240 nm.

O método base foi o de Morrow e Motulsky (1968), acrescentando-se a ele o inibidor propranolol (do método de Whittaker e cols., 1981).

A caracterização dos fenótipos é feita calculando-se a porcentagem de inibição da reação enzimática na presença do inibidor quando comparada com a reação na sua ausência.

O preparo das soluções de substrato (acetato de alfa-naftila), tampão fosfato pH 7,1, o inibidor Ro2-0683 e o reagente de cor (Fast Red) já foi esquematizado no item anterior.

A solução estoque de propranolol ($8,45 \times 10^{-4}$ mol/L) é preparada do seguinte modo:

cloridrato de propranolol 25 mg
 tampão fosfato pH 7,1 100 ml

Para uso foi feita ainda uma diluição de 1/10.

Os tubos utilizados no ensaio podem ser representados do seguinte modo:

B = branco
 T = teste (tubo sem inibidor)
 Ir = tubo com Ro2-0683
 Ip = tubo com propranolol

O esquema a seguir indica o procedimento:

Reagentes	Tubos (ml)			
	<u>B</u>	<u>T</u>	<u>Ir</u>	<u>Ip</u>
soro (1/100)	-	0,2	0,2	0,2
tampão fosfato pH 7,1	0,4	0,2	-	-
Ro2-0683 (10^{-3} mol/L)	-	-	0,2	-
propranolol ($8,45 \times 10^{-4}$ mol/L)	-	-	-	0,2

Os tubos foram levados ao banho-maria a 37°C , onde foram acrescentados 1,4 ml de substrato (acetato de alfa-naftila $0,03$ mol/L) a cada um. Após incubação por 60 minutos, os tubos foram retirados do banho e acrescentaram-se 0,2 mililitros de reagente de cor (Fast Red) e 2,0 ml de água destilada.

Após 15 minutos foram feitas as leituras, em espectrofotômetro a 555 nm, calibrando-se o aparelho com o branco. A percentagem de inibição foi calculada da seguinte forma:

$$P = \frac{T - I}{T} \times 100.$$

onde: T = absorbância do tubo sem inibidor

I = absorbância do tubo com inibidor

2.3.1.3 Método de Dietz e cols. (1973)

O método de Dietz e cols. (1973) foi utilizado para medir a atividade da colinesterase do soro.

O método está baseado na propriedade da colinesterase do soro em hidrolisar a propioniltiocolina liberando ácido propiônico e tiocolina. A tiocolina possui um grupamento sulfidril (SH) que reage com o DTNB (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)), produzindo ácido 5 tio-2-nitrobenzóico que, em solução aquosa se encontra em equilíbrio com o íon 5 tio-2-nitrobenzoato, o qual fornece a cor amarela à reação, com intensidade proporcional à atividade enzimática.

A leitura é realizada em espectrofotômetro a 410 nm.

Reagentes:

a) Tampão fosfato pH 7,6

a1) Na_2HPO_4 4,73 g
 água destilada 1.000 ml

a2) KH_2PO_4 13,61 g
 água destilada 1.000 ml

A solução a2 é adicionada à solução a1 até se obter o pH 7,6 (proporção aproximada de 1.000 ml para 60 ml, respectivamente).

b) Substrato para o volume de 1 ml (iodeto de propioniltiocolina - 0,02 mol/L).

iodeto de propioniltiocolina..... 6,064 mg
 tampão fosfato pH 7,6 1 ml

c) Reagente de cor (DTNB ($4,23 \times 10^{-4}$ mol/L)

DTNB 167 mg
 Tampão fosfato pH 7,6 1.000 ml

Esta solução foi estocada em frasco escuro recoberto com papel laminado à temperatura ambiente.

d) Solução de sulfato de quinidina

Sulfato de quinidina 0,5 g
 Água destilada 100 ml

O soro é diluído 1/100 em água destilada.

No momento do uso, a solução de substrato é ainda diluída em igual volume de água destilada.

A seguir o procedimento é esquematizado:

Reagentes	Tubos (ml)	
	Branco	Teste
DTNB ($4,23 \times 10^{-4}$ mol/L)	1,5	1,5
Incubação por 5 minutos a 37°C		
iodeto de propioniltiocolina (0,02 mol/L)	0,5	0,5
soro diluído 1/100	-	0,5
3 minutos a 37°C		
sulfato de quinidina	0,5	0,5
soro diluído 1/100	0,5	-
água destilada	2,0	2,0

As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco.

A atividade da colinesterase do soro é expressa em Unidades Internacionais (UI = $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{ml}$ a 37°C) e é calculada pela fórmula:

$$\text{UI} = \frac{\text{V.d.A}}{13,6.t} ,$$

onde: V = volume final em ml (5ml)

d = diluição do soro (100)

A = absorbância do teste

13,6 = absortividade molar do 5-tio-2-nitrobenzoato para uma cubeta de 1 cm

t = tempo de incubação em minutos (3 minutos).

$$\text{Desta forma, UI} = \frac{5.100.A}{13,6.3} = 12,25.A$$

2.3.2 Loco CHE2

A técnica de Robinson e cols. (1957) modificada por Van Ros e Vervoort (1973) permite a definição dos fenótipos do loco CHE2, por eletroforese em gel de ágar, em pH ácido.

A solução de ágar (Bactoagar, DIFCO) é feita a 1% em tampão de ácido cítrico-citrato de sódio, pH 6,2 (0,05 M).

Solução tampão:

Citrato de sódio 147 g

Água destilada 600 ml

Ajusta-se o pH 6,2 com 400 ml de solução saturada de ácido cítrico e mede-se o pH em potenciômetro.

No momento do uso, para cada parte de solução estoque, adicionam-se 9 partes de água e ajusta-se o pH 6,2 com solução saturada de ácido cítrico.

A solução de ágar é levada ao fogo, fervendo até ficar clara e, em seguida, é derramada em placas de vidro (23 cm x 16 cm). Após repouso de cerca de uma hora, aplicam-se, no gel, as amostras de plasma embebidas em tiras de papel de filtro. Durante uma hora, submete-se a placa a 75 mA, medidos no gel com amperímetro. Após este tempo, retiram-se os papéis de filtro, onde as amostras foram aplicadas, cuidando para que bolhas de ar não sejam formadas durante o processo. Em seguida, a corrente elétrica é ajustada em 35 mA, permanecendo assim por 16 horas.

Após eletroforese, processa-se a coloração da placa de gel de ágar. Sobre a película de ágar, previamente cortada no sentido horizontal, derrama-se a solução preparada de modo e ordem a seguir:

Fast Red	20 mg em 0,5 ml de água
Tampão fosfato pH 7,1...	20 ml
acetato de alfa-naftila..	0,5 ml

A placa é colocada em estufa, a 37°C por 30 minutos. Lava-se a placa e, no dia seguinte, processa-se a sua secagem. A placa é colocada entre dois suportes de vidro, dos quais é separada por folha de papel de filtro e de papel cartão. Após secagem, a película, fixa na folha de papel cartão pode ser arquivada.

2.4 Estatísticas

Todos os dados foram processados em computador DEC-10, do Centro de Computação Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

As análises estatísticas, com exceção do teste de qui-quadrado, foram desenvolvidas com base nos programas SPSS (Statistical Package for Social Sciences) e MINITAB. No teste qui-quadrado aplicou-se a correção de Yates para esperados inferiores a cinco.

Também foi estimado o risco relativo de intoxicação por agrotóxicos organofosforados, dentro das classes de fenótipos dos locos CHE1 e CHE2 observados na presente amostra, através do método proposto por Woolf (1955), apresentado a seguir:

$$x = \frac{h.K}{H.k} ,$$

onde: h = número de indivíduos com o fenótipo cujo risco relativo será testado, no grupo intoxicado;

H = número de indivíduos com estes fenótipos, no grupo controle;

k = número de indivíduos sem o referido fenótipo, no grupo intoxicado;

K = número de indivíduos sem o referido fenótipo, no grupo controle.

A seguir, este risco era testado através de X^2 , do seguinte modo:

$$y = \ln x$$

$$V = 1/h + 1/K + 1/k + 1/H$$

$$X_1^2 = y^2/V$$

Foi possível, a partir do cálculo do risco relativo, estimar a fração etiológica (EF) e a fração preventiva (PF). A fração etiológica indica a proporção de intoxicação que pode ser atribuída à presença dos fenótipos analisados e a fração preventiva indica a frequência de redução do número de casos na população, devida ao efeito do fenótipo cujo risco relativo é menor que 1 (Miettinen, 1974).

A fração etiológica é calculada pela seguinte fórmula:

$$EF = \frac{x - 1}{x} \cdot f ,$$

onde: x = risco relativo

f = frequência do fenótipo na amostra de indivíduos intoxicados.

A fração preventiva é calculada por:

$$PF = \frac{(1 - x) \cdot f}{x \cdot (1 - f) + f}$$

3. RESULTADOS

3.1 Demonstração de que o Teste de Seleção de Intoxicados se Fundamenta na Atividade da Acetilcolinesterase Eritrocitária (AChE)

No laboratório foram testados soros e hemácias de 10 indivíduos, tomados ao acaso, pelo método de Limperos e Ranta (1953) modificado por Edson e Fenwick (1955). Quando as hemácias foram examinadas obtiveram-se os mesmos resultados encontrados na análise feita no campo e, por outro lado, ao se testarem os soros, o indicador de pH (azul de bromotimol), que indica a hidrólise do perclorato de acetilcolina, não sofreu alteração. Este achado demonstra que a atividade medida no campo era apenas da acetilcolinesterase eritrocitária. Assim, nosso processo de seleção de intoxicação se baseou apenas nos dados da acetilcolinesterase.

3.2 Intoxicações Observadas nos Municípios Visitados

No período de 1984 a 1986, a equipe móvel do Núcleo Profilático Universitário Prof. Pereira Filho visitou 29 municípios paranaenses. A tabela 14 mostra as frequências de intoxicações no Paraná, de acordo com o exame da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária pelo método de Limperos e Ranta (1953) modificado por Edson e Fenwick (1955). Foi considerado intoxicado o indivíduo que apresentou atividade entre 50 e 87,4%. As intoxicações observadas podem ser consideradas como de pouca gravidade, uma vez que não se acompanharam de distúrbios clínicos aparentes.

Tabela 14. Frequências de intoxicação observadas nos municípios visitados

Município	Nº de Exames	Frequência de Intoxicação		
		N	%	E.P.
Antônio Olinto	23	1	4,3	+ 4,2
Assis Chateaudriand	591	56	9,5	+ 1,2
Cafelândia do Oeste	322	48	14,9	+ 2,0
Cambará	540	146	27,0	+ 1,9
Céu Azul	190	30	15,8	+ 2,6
Chopinzinho	533	122	22,9	+ 1,8
Colombo	107	47	43,9	+ 4,8
Faxinal	138	70	50,7	+ 4,2
Grandes Rios	118	76	64,4	+ 4,4
Imbituva	98	16	16,3	+ 3,7
Irati	387	24	6,2	+ 1,2
Ivaí	86	23	26,7	+ 4,8
Lapa	360	46	12,8	+ 1,8
Lunardelli	138	26	18,8	+ 3,3
Marechal Mallet	84	48	57,1	+ 5,4
Missal	373	38	10,2	+ 1,6
Palotina	1.179	209	17,7	+ 1,1
Pato Branco	763	109	14,3	+ 1,3
Paula Freitas	42	10	23,8	+ 6,6
Paulo Frontin	98	40	40,8	+ 5,0
Porto Amazonas	75	57	76,0	+ 4,9
Quitandinha	166	15	9,0	+ 2,2
Santa Terezinha de Itaipu	144	19	13,2	+ 2,8
Santo Antônio da Platina	307	173	56,3	+ 2,8
São João do Ivaí	350	161	46,0	+ 2,7
São João do Triunfo	193	37	19,2	+ 2,8
São Mateus do Sul	484	91	18,8	+ 1,8
São Miguel do Iguaçu	233	44	18,9	+ 2,6
Teixeira Soares	76	9	11,8	+ 3,7
Total	8.198	1.791	21,8	+ 0,4

A maior frequência de intoxicação foi observada no município de Porto Amazonas (76,0% \pm 4,9%), e as menores nos municípios de Antônio Olinto (4,3% \pm 4,2%) e de Irati (6,2% \pm 1,2%). No município de Antônio Olinto, entretanto, o número de indivíduos examinados foi muito pequeno (23 pessoas). Nestes 29 municípios visitados, foram examinados 8.198 indivíduos e 1.791 foram considerados intoxicados, revelando uma frequência de intoxicação de 21,8% \pm 0,4%.

Durante este período também foi visitado o município de Borrazópolis. No entanto, os resultados dos exames, referentes a esta localidade, não puderam ser levantados.

3.3 Agrotóxicos Utilizados Pelos Lavradores da Amostra

Para a presente análise foram entrevistados 134 lavradores, cujas respostas ao questionário serviram de base para elaborarmos a tabela 15. Esta tabela mostra os 52 produtos agrotóxicos utilizados, que apareceram 440 vezes, perfazendo uma média de 3,3 produtos por lavrador.

Os compostos organofosforados foram os mais utilizados (45,93%) e, dentre estes, o mais frequente foi o Folidol (16,59%). Em seguida, apareceram os compostos de outros grupos químicos, não inibidores de esterases (piretróides, organoclorados, derivados da anilina, etc) com 42,26%. Apesar da proibição em vigor, os organoclorados ainda eram utilizados com uma frequência de 4,33%. Os carbamatos, como os organofosforados, são inibidores de esterases e aparecem com uma frequência de 11,81%. Neste grupo de compostos utilizados pelos lavradores da amostra, 57,74% inibem a colinesterase do soro.

Tabela 15. Compostos agrotóxicos utilizados pelos lavradores da amostra estudada

<u>Produtos</u>	<u>Grupo Químico</u>	<u>Nº</u>	<u>Frequência (%)</u>
1. Folidol	Organofosforado	73	16,59
2. Trifluralina	Dinitroanilina	64	14,54
3. Nuvacron	Organofosforado	38	8,64
4. Azodrin	Organofosforado	23	5,23
5. Manzate	Carbamato	17	3,86
6. Perfecthion	Organofosforado	16	3,64
7. Gramoxone	Biperidílico	15	3,41
8. Primextra	Anilida	14	3,18
9. Bazagran	Triadizina	13	2,95
10. Dipterex	Organofosforado	12	2,73
11. Fostiol	Organofosforado	11	2,50
12. Teflan	Triazina	10	2,27
13. Aldrin	Organoclorado	9	2,05
14. Sevin	Carbamato	9	2,05
15. Endrex	Organoclorado	8	1,82
16. Round-up	Sopropilamina	8	1,82
17. Sencor	Triazina	8	1,82
18. Esteron	Fenoxiacético	7	1,59
19. Herbadox	Dinitroanilina	7	1,59
20. Lorsban	Organofosforado	7	1,59
21. Orthene	Organofosforado	7	1,59
22. Rhodiauran	Carbamato	7	1,59
23. Dithane	Carbamato	6	1,36
24. Descis	Piretróide	4	0,91
25. Parathion	Organofosforado	4	0,91
26. Antracol	Carbamato	3	0,68
27. Benlate	Carbamato	3	0,68
28. Dual	Anilida	3	0,68
29. Furadan	Carbamato	3	0,68
30. Cerconil	Clorotalonil	2	0,45

(Continua)

3.4 Frequências Fenotípicas Observadas

3.4.1 Loco CHE1

3.4.1.1 Frequências Fenotípicas do loco CHE1 em In- toxicados e Controles

Foram examinados 120 indivíduos quanto ao loco CHE1, sendo 59 controles e 61 intoxicados. No primeiro grupo foi encontrado um indivíduo com fenótipo CHE1 UA, o que demonstra uma frequência fenotípica de $1,7\% \pm 1,7\%$. Nos intoxicados foram caracterizados 8 portadores de fenótipos não usuais, assim distribuídos: 3 com fenótipo CHE1 UA ($4,9\% \pm 2,8\%$), 3 com fenótipo CHE1 UF ($4,9\% \pm 2,8\%$) e 2 com fenótipo CHE1 AK ($3,3\% \pm 2,3\%$). O teste estatístico X^2 baseado nos dados da tabela 16 mostrou diferença significativa entre as frequências fenotípicas observadas nesses dois grupos ($X^2 = 4,11$; $P < 0,05$, corrigido de acordo com Yates).

3.4.1.2 Distribuição dos Fenótipos Usuais e Não-usuais em Intoxicados de Acordo com a Distribuição da Atividade Relativa da Acetilcolinesterase

A média da atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária nos intoxicados foi de $68,9\% \pm 9,0\%$, sendo que a dos portadores de fenótipo não usual foi de $60,9\% \pm 6,5\%$ e a dos indivíduos com fenótipo usual foi de $70,1\% \pm 8,7\%$. A média relativa da atividade nos portadores de fenótipos não usuais é estatisticamente menor que a encontrada no grupo usual ($t = 3,55$; $P < 0,01$).

A tabela 17 mostra a distribuição dos portadores de fenótipos usuais e não usuais, classificados de acordo com a atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária em intoxicados.

Tabela 16. Frequências fenotípicas observadas nos grupos controle e intoxicado, quanto ao loco CHE1.

<u>Fenótipo</u>	<u>Controles</u>		<u>Intoxicados</u>		<u>Total</u>
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	
usual	58	98,3	53	86,9	111
não usual	1	1,7	8	13,1	9
Total	59	100,0	61	100,0	120

($\chi^2_1 = 4,11$; $P < 0,05$, corrigido de acordo com Yates)

Tabela 17. Distribuição da atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária (AChE) em intoxicados, classificados pelos fenótipos usual e não usual.

Atividade relativa da AChE (%)	Fenótipos				<u>Total</u>
	<u>usual</u>	<u>%</u>	<u>não usual</u>	<u>%</u>	
50,0 a 62,4	10	18,9	5	62,5	15
62,5 a 74,9	27	50,9	3	37,5	30
75,0 a 87,4	16	30,2	0	0,0	16
Total	53	100,0	8	100,0	61

($\chi^2_2 = 5,21$; $P > 0,05$, corrigido de acordo com Yates)

A distribuição da atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária não difere nos dois grupos ($\chi^2_2 = 5,21$; $P > 0,05$, corrigido de acordo com Yates). Contudo, o número de indivíduos de fenótipos não usual é muito pequeno para permitir conclusão segura a esse respeito.

3.4.2 Loco CHE2

Foram examinadas 134 amostras pertencentes a 62 controles e a 72 intoxicados. As frequências do fenótipo CHE2 C5+ em controles e intoxicados foram, respectivamente, $19,4\% \pm 5,0\%$ e $8,3\% \pm 3,3\%$, apresentados na tabela 18, as quais não foram significativamente diferentes ($\chi^2_1 = 3,48$; $P > 0,05$). No grupo controle o alelo CHE2*C5+ apareceu com uma frequência de $10,2\% \pm 2,6\%$, enquanto que nos intoxicados foi observada uma frequência de $4,3\% \pm 1,7\%$.

Considerando-se apenas os indivíduos examinados quanto ao loco CHE1 e caracterizados como de fenótipo usual, contamos com 58 controles e 53 intoxicados. As frequências fenotípicas observadas para o loco CHE2 foram, respectivamente, $19,0\% \pm 5,1\%$ e $5,7\% \pm 3,2\%$, as quais são significativamente diferentes ($\chi^2_1 = 4,45$; $P < 0,05$), conforme a tabela 19. O alelo CHE2*C5+ apareceu com uma frequência de $10,0\% \pm 2,8\%$ e $2,9\% \pm 1,6\%$, em controles e intoxicados, respectivamente.

3.4.3 Locos CHE1 e CHE2

Quando examinamos a distribuição de fenótipos quanto aos dois locos em controles (N = 59) e intoxicados (N = 61), não encontramos diferença significativa ($\chi^2_3 = 6,36$; $P > 0,05$). Entretanto, quando consideramos a comparação entre intoxicados e controles, no que se refere a duas classes de fenótipos, isto é, CHE1 U CHE2 C5+ e os demais fenótipos, encontramos diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_1 = 5,49$; $P < 0,02$).

Tabela 18. Frequências fenotípicas observadas nos grupos controle e intoxicado, quanto ao loco CHE2

<u>Fenótipo</u>	<u>Controles</u>		<u>Intoxicados</u>		<u>Total</u>
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	
CHE2 C5+	12	19,4	6	8,3	18
CHE2 C5-	50	80,6	66	91,7	116
<u>Total</u>	62	100,0	72	100,0	134

$$(X_1^2 = 3,48; P > 0,05)$$

Tabela 19. Frequências fenotípicas observadas nos grupos controle e intoxicado, quanto ao loco CHE2, na amostra caracterizada como de fenótipo usual.

<u>Fenótipo</u>	<u>Controles</u>		<u>Intoxicados</u>		<u>Total</u>
	<u>N</u>	<u>%</u>	<u>N</u>	<u>%</u>	
CHE2 C5+	11	19,0	3	5,7	14
CHE2 C5-	47	81,0	50	94,3	97
Total	58	100,0	53	100,0	111

$$(X_1^2 = 4,45 ; P < 0,05)$$

3.5 Riscos Relativos de Intoxicação por Compostos Agrotóxicos Inibidores das Esterases, Frações Etiológica e Preventiva

As comparações feitas no item 3.4 com relação à distribuição de fenótipos nos grupos de controles e intoxicados, mostraram diferenças estatisticamente significativas nos seguintes casos:

- a) Usual x não usual;
- b) Usual C5+ x Usual C5-;
- c) Usual C5+ x demais fenótipos.

Através do método de Woolf (1955) foi possível estimar o risco relativo de intoxicação por agrotóxicos organofosforados e carbamatos, quando os lavradores apresentaram fenótipos não usuais em contraposição aos usuais e entre os usuais quando mostraram fenótipo CHE2 C5- em contraposição aos CHE2 C5+.

No primeiro caso, entre os indivíduos com fenótipo não usual foi estimado um risco relativo de 8,75 ($X_1^2 = 4,06$; $P < 0,05$) e no segundo caso, entre os indivíduos com fenótipo usual CHE2 C5-, esse risco foi de 3,90 ($X_1^2 = 3,97$; $P < 0,05$).

A fração etiológica, que corresponde à frequência de casos de intoxicação devida à presença de um determinado fenótipo na população, quando calculada para o fenótipo não usual foi de 11,62%, e para o fenótipo usual CHE2 C5- foi de 70,15%.

Considerando-se a ocorrência simultânea dos dois locos, pudemos estimar a fração preventiva, que indica a magnitude da redução do número de casos na população devida ao efeito do fenótipo cujo risco relativo é menor que 1. No presente trabalho corresponde ao fenótipo CHE1 U CHE2 C5+, cuja fração preventiva é 14,4% (risco relativo = 0,23)

3.6 Atividade da Colinesterase do Soro

3.6.1 Comparação entre as Atividades Enzimáticas Observadas em Controles e Intoxicados

A atividade da colinesterase do soro foi medida pelo método de Dietz e cols. (1973). Os controles apresentaram atividade média de $6,4 \text{ UI} \pm 2,4 \text{ D.P.}$, significativamente maior que a dos intoxicados ($5,4 \text{ UI} \pm 1,2 \text{ D.P.}$, de acordo com $t = 2,28$; $P < 0,01$). A tabela 20 mostra as médias de atividade encontradas na amostra, classificadas quanto aos fenótipos dos locos CHE1 e CHE2. A atividade observada no grupo controle é 18,5 % maior que a dos intoxicados.

Nos indivíduos controle de fenótipo usual, a atividade observada no grupo caracterizado como de fenótipo CHE2 C5+ é 9,7% maior que a determinada no grupo de fenótipo CHE2 C5-. Nos intoxicados, esta atividade é 7,1% maior em fenótipos CHE2 C5+, quando comparados com CHE2 C5-.

3.6.2 Correlação entre os Métodos de Dietz e cols.(1973) e de Morrow e Motulsky (1968)

O método de Morrow e Motulsky (1968), originalmente desenvolvido para determinar alguns fenótipos do loco CHE1, não é indicado para a determinação da atividade enzimática, como o método de Dietz e cols. (1973). No entanto, fornece um indicativo da atividade em termos de absorbância, que pode ser correlacionado com os dados fornecidos, igualmente em termos de absorbância, pelo método de Dietz e cols. (1973).

Para os controles foi encontrada uma "atividade" média expressa em absorbância x 1.000 de $522,0 \pm 200,2 \text{ (D.P.)}$ pelo método de Dietz e cols. (1973) e de $539,8 \pm 112,4 \text{ (D.P.)}$ pelo método de Morrow e Motulsky (1968). No que se refere aos into-

Tabela 20. Atividades médias da colinesterase do soro em unidades internacionais (\pm D.P.) encontradas em controles e intoxicados, classificados quanto aos locos CHE1 e CHE2

Fenótipo	Controles		Intoxicados	
	N	$\bar{x} \pm$ D.P.	N	$\bar{x} \pm$ D.P.
usual C5+	11	6,8 \pm 2,2	3	6,0 \pm 2,6
usual C5-	47	6,2 \pm 2,6	50	5,6 \pm 1,8
Não usual C5+	0	-	2	4,8 \pm 1,8
Não usual C5-	1	5,2	6	5,2 \pm 1,6
Total	59	6,4 \pm 2,4	61	5,4 \pm 1,8

xicados, as "atividades" médias (\pm D.P.) foram, respectivamente, de 448,6 \pm 148,0 e 303,9 \pm 93,9. A correlação entre os resultados desses métodos, foi de 0,70 nos controles e de 0,65 nos intoxicados, sendo de 0,69 quando se consideram os 120 indivíduos examinados.

4. DISCUSSÃO

4.1 Intoxicações Observadas nos Municípios Visitados

As datas para a realização dos exames, fixadas de acordo com solicitação da Acarpa, não coincidiram com a época de aplicação intensiva de agrotóxicos nas localidades visitadas. Desse modo, nas épocas de maior aplicação dos compostos tóxicos, espera-se que a frequência média de intoxicação seja mais elevada do que a observada no presente trabalho ($21,8\% \pm 0,4\%$, tabela 14).

Na amostra total foi observada uma frequência de analfabetismo de 11,9%, que poderia, em parte, explicar a frequência de intoxicação observada, uma vez que estes indivíduos são incapazes de manusear corretamente os compostos tóxicos, pois não sabem ao menos ler o rótulo da embalagem, além do que, segundo os agrônomos da Acarpa, a assistência técnica a estes indivíduos fica prejudicada, devido a sua dificuldade em entender as explicações relacionadas ao uso de agrotóxicos. A frequência de analfabetismo na área estudada foi de $9,6\% \pm 0,1\%$ (estimativa de acordo com os dados de Willadino, 1985) e existe uma correlação de 0,48 ($P < 0,05$) entre as frequências de intoxicação (tabela 14) e de analfabetismo (tabela 21).

No sentido de ilustrar até que ponto a falta de informação adequada pode levar à intoxicação, citamos o caso de um produtor leiteiro que comercializava seu produto em frascos vazios de agrotóxicos.

Uma frequência alta de intoxicação não significa unicamente que apenas os lavradores estão correndo risco, mas também os

Tabela 21. Frequências de analfabetismo verificadas em 25 municípios visitados, de acordo com Willadino, 1985.

Município	Analfabetismo		
	Amostra	N	% \pm E.P.
Antônio Olinto	718	48	6,7 \pm 0,9
Assis Chateaubriand	6.519	438	6,7 \pm 0,3
Cambará	2.450	238	9,7 \pm 0,6
Céu Azul	3.145	337	10,7 \pm 0,5
Chopinzinho	4.306	357	8,3 \pm 0,4
Colombo	6.607	441	6,7 \pm 0,3
Faxinal	3.037	567	18,7 \pm 0,7
Grandes Rios	4.252	1.171	27,5 \pm 0,7
Imbituva	2.611	185	7,1 \pm 0,5
Irati	5.101	186	3,6 \pm 0,3
Ivaí	1.237	87	7,0 \pm 0,7
Lapa	3.967	244	6,2 \pm 0,4
Marechal Mallet	1.088	18	1,7 \pm 0,4
Palotina	3.441	157	4,6 \pm 0,3
Pato Branco	5.887	235	4,0 \pm 0,2
Paula Freitas	499	22	4,4 \pm 0,9
Paulo Frontin	532	9	1,7 \pm 0,6
Porto Amazonas	335	32	9,6 \pm 1,6
Quitandinha	1.338	83	6,2 \pm 0,6
Santo Antônio da Platina	4.429	578	13,1 \pm 0,5
São João do Ivaí	5.277	1.136	21,5 \pm 0,6
São João do Triunfo	1.241	98	7,9 \pm 0,8
São Mateus do Sul	3.021	98	3,2 \pm 0,3
São Miguel do Iguaçu	4.275	451	10,5 \pm 0,5
Teixeira Soares	1.454	136	9,4 \pm 0,8
Total	76.767	7.352	9,6 \pm 0,1

Obs.: Na época do censo de 1980, as localidades de Cafelândia do Oeste, Lunardelli, Missal e Santa Terezinha de Itaipu, incluídas na tabela 14, não existiam como municípios.

consumidores finais de seus produtos, uma vez que a intoxicação observada poderia ser interpretada como proveniente do mau uso dos compostos tóxicos. O município de Colombo é responsável por parte significativa de hortigrangeiros comercializados em Curitiba. Nesta localidade foi constatada uma frequência de intoxicação de 43,9% \pm 4,8%, considerada alta, refletindo perigo de intoxicação ao consumidor final dos produtos oriundos deste município.

4.2 Agrotóxicos Utilizados pelos Lavradores da Amostra.

A tabela 15 mostra os 52 produtos tóxicos utilizados, que aparecem 440 vezes, perfazendo uma média de 3,3 produtos por lavrador.

A tabela 9 cita os compostos agrotóxicos que mais causaram intoxicações no Paraná nos anos de 1983 e 1984. Nestes dois anos, os compostos organofosforados foram responsáveis por praticamente a mesma frequência de intoxicações (74,2% e 76,0%, respectivamente, $X_1^2 = 0,42$; $P > 0,25$). O mesmo não ocorreu com os compostos organoclorados, que causaram mais intoxicações em 1983 (21,3% e 16,0%, respectivamente; $X_1^2 = 11,77$; $P < 0,01$), o que poderia ser atribuído à legislação em vigor na época que restringia o uso e o comércio destes compostos. Os compostos de outros grupos químicos (piretróides, biperidílicos, etc) causaram relativamente mais intoxicações em 1984 (4,5% e 8,0%, respectivamente, $X_1^2 = 14,16$; $P < 0,01$).

A tabela 22 mostra os valores esperados de compostos agrotóxicos para os dados da amostra, a partir dos dados de Skalisz (1984). Ao se compararem os dados referentes aos anos de 1983

Tabela 22. Números observados de agrotóxicos na presente amostra e respectivos esperados em comparação com os dados de Skalisz (1984), correspondentes aos anos de 1983 e 1984. Entre parêntesis são registrados os resultados do teste X^2 referentes a cada uma das classes.

<u>Compostos</u>	<u>nº observado</u>	<u>Nºs esperados (X^2), com base em dados de Skalisz, 1984</u>	
		<u>1983</u>	<u>1984</u>
Organofosforados	202	300 (32,01)	306 (35,35)
Carbamatos	52	27 (23,15)	28 (20,57)
Organoclorados	19	94 (59,84)	71 (38,08)
Outros	167	19 (1152,84)	35 (497,83)
Total	440	440	440

Observação: Todos os resultados de X^2 são significativos $P < 0,1\%$

e 1984 (tabela 9) com os dados da amostra (tabela 15) percebe-se que ocorre uma falta de compostos organofosforados e de organoclorados e um excesso de carbamatos e de outros compostos, na nossa amostra, relativamente à de Skalisz (1984).

Há de se esclarecer ainda que a amostra foi coletada no período compreendido entre os anos de 1984 e 1986 e que provavelmente os dados de Skalisz (1984) pudessem não ser mais verdadeiros para aquela época. Além disso os dados desse autor se referem aos compostos responsáveis pelas intoxicações que foram notificadas, enquanto que os presentes dados são de agrotóxicos utilizados pelos lavradores da amostra. É de se esperar que os casos de intoxicações notificadas sejam de maior gravidade que os registrados no presente trabalho. Essas razões talvez sejam as responsáveis pelas diferenças encontradas entre os dois estudos.

4.3 Frequências Fenotípicas Observadas

4.3.1 Loco CHE1

Na amostra de intoxicados (N=61) foram identificados 8 indivíduos com fenótipos não usuais (13,1% \pm 4,3%). Por outro lado, no grupo controle (N= 59) só foi detectado um único indivíduo com fenótipo CHE1 UA (1,7% \pm 1,7%). Assim pode-se afirmar, com base nestes achados, que no grupo intoxicado há um excesso de variantes não usuais em relação ao grupo controle ($X_1^2 = 4,12$; $P < 0,01$, corrigido de acordo com Yates), conforme já pode ser verificado na tabela 16.

Quando comparamos a frequência de variantes não usuais no grupo intoxicado com a frequência de variantes não usuais detectada por Fadel-Picheth (1991) numa amostra de 1800 indivíduos

de Curitiba ($3,4\% \pm 0,4\%$), verificamos excesso de variantes não usuais no grupo intoxicado ($X_1^2 = 12,68$; $P < 0,01$, corrigido de acordo com Yates). Entretanto, a amostra controle não difere da mesma amostra de Curitiba ($X_1^2 = 0,13$; $P > 0,25$, corrigido de acordo com Yates).

Poderíamos levantar a questão de que amostras com certo grau de intoxicação, por organofosforados e carbamatos, pudessem dar resultados diferentes de inibição, quando fenotipadas pelo método de Morrow e Motulsky (1968), levando a um excesso de fenótipos não usuais.

Abreu e cols. (1991) provocaram diferentes graus de inibição (I_{25} , I_{50} , I_{75}) da colinesterase do soro pelo organofosforado Paraoxon, em amostras de soro e as fenotiparam pelo método utilizado no presente trabalho, bem como por outros métodos. Concluíram que apenas quando a inibição é igual ou superior a 50% há a possibilidade de resultados duvidosos ou de resultados correspondentes a de outros fenótipos. Quando comparamos as atividades médias da colinesterase do soro de intoxicados ($5,40 \text{ UI} \pm 1,80 \text{ U.I.}$) e de controles ($6,40 \text{ U.I.} \pm 2,40 \text{ U.I.}$) do presente trabalho com a atividade média de uma amostra de funcionários do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná ($7,78 \text{ U.I.} \pm 2,5 \text{ U.I.}$; Lepiensi e cols., 1992, comunicação pessoal), constatamos que nossas amostras de intoxicados e de controles são, em média, respectivamente, 18% e 31% inibidas, em relação às dos funcionários do Hospital de Clínicas. Assim, concluímos que a intoxicação existente nas amostras do presente trabalho não seria suficiente para levar a erros de fenotipagem. Além disso, para que tivéssemos um excesso de variantes usuais, seria preciso que as amostras de fenótipos usuais fossem

tipadas erroneamente como de fenótipo não usual. Os dados de Abreu e cols. (1992, comunicação pessoal) mostram que mesmo com inibição de cerca de 75% as amostras de fenótipos usuais não se classificam como de fenótipos não usuais. Com inibição desta ordem, seus resultados são duvidosos, isto é, mais baixos que o padrão, mas não chegam a corresponder aos característicos de fenótipos CHE1 UF.

4.3.2 Loco CHE2

Considerando-se apenas os fenótipos usuais, verifica-se que o grupo controle apresenta maior frequência do fenótipo CHE2 C5+ (ver tabela 19).

Na amostra controle (N=62) há uma frequência maior do fenótipo CHE2 C5+ (19,4% \pm 5,0%) do que numa amostra de 2541 pessoas de Curitiba (10,23% \pm 0,60%), conforme relatado por Chautard-Freire-Maia e cols. (1991) ($\chi^2_1 = 5,38$; $P < 0,025$). Comparando-se a amostra de intoxicados (N=72) com esta amostra de Curitiba, quanto à frequência do fenótipo CHE2 C5+ (8,3% \pm 3,3%), observa-se que não há diferença significativa ($\chi^2_1 = 0,28$; $P > 0,50$) entre ambas.

4.3.3 Locos CHE1 e CHE2

Além do fato de os fenótipos não usuais, em geral, proporcionarem uma atividade menor, deve-se observar que nestes fenótipos da presente amostra, 5 possuem o alelo atípico, que tem menor afinidade por inibidores positivamente carregados, como os carbamatos (revisão em Whittaker, 1986). A enzima atípica é diferente da usual na posição 70 (Asp \rightarrow Gly), e tal diferença leva à menor afinidade por estes compostos, de modo que uma menor concentração destas substâncias se ligaria à colinesterase do soro deixando livre uma parcela relativamente maior

que poderia se ligar à acetilcolinesterase eritrocitária. Na presente amostra, estes compostos aparecem com uma frequência de 11,81% (conforme dados da tabela 15).

Por outro lado, os compostos organofosforados, que na presente amostra são a maioria (45,93%, ver tabela 15), inibem a colinesterase do soro fosforilando a serina do sítio esterásico.

Shellenger e cols. (1966) perceberam que, em codornizes tratadas com Azodrin e Bidrin (organofosforados), a colinesterase do soro foi bastante inibida, enquanto que a acetilcolinesterase cerebral permaneceu normal ou diminuída.

A média relativa da atividade da acetilcolinesterase eritrocitária nos indivíduos com fenótipos não usuais é menor que a observada no grupo usual. Isto também poderia ser considerado como mais uma evidência a favor de uma hipótese que admita que estes fenótipos não usuais estariam implicados numa maior susceptibilidade à intoxicação, justamente pelo fato de terem menor afinidade por compostos positivamente carregados, os quais poderiam então, se ligar, em maior concentração à acetilcolinesterase eritrocitária.

Como a presença do alelo CHE2*C5+ implica numa atividade enzimática em média 25% maior (Harris, 1980), pode-se pensar que o mesmo teria um papel de proteção contra a inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados e carbamatos. Isto significa que haveria mais colinesterase do soro, para proteger a acetilcolinesterase da inibição, prevenindo a consequente intoxicação. Além disso, é nossa hipótese que as variantes não usuais do loco CHE1 possam estar implicadas em susceptibilidade aumentada à intoxicação, tanto pela menor afinidade por estes compostos como também pela redução da atividade enzimática.

É necessário ressaltar que o alelo CHE2*C5+ condiciona o aparecimento de uma banda extra (C₅) quando da eletroforese que a caracteriza, a qual é composta pela colinesterase do soro e por outra molécula desconhecida, e cujo papel específico no mecanismo de proteção contra a inibição da acetilcolinesterase não pode ser avaliado, por falta de informações a respeito.

4.4 Atividade da Colinesterase do Soro

Os valores da atividade da colinesterase do soro encontrados em controles, intoxicados e na amostra total se encontram na tabela 20. Esses valores são menores que o encontrado por Lipiński e cols. (1992, comunicação pessoal), numa amostra de 222 funcionários do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná ($\bar{x} \pm D.P. = 7,78 \pm 2,51$). Os controles apresentaram atividade média de $6,40 \pm 2,40$ ($t = 3,89$; $P < 0,001$) e os intoxicados, de $5,40 \pm 1,80$ ($t = 8,34$; $P < 0,001$). Comparando-se as variâncias das três distribuições nota-se que a distribuição da atividade da colinesterase do soro de intoxicados difere tanto da de seus controles ($F = 1,78$; $P < 0,05$) como da de funcionários ($F = 1,94$; $P < 0,05$). Por outro lado, não há diferença entre as variâncias das distribuições encontradas em nossos controles e aquela de funcionários do Hospital de Clínicas ($F = 1,09$).

A atividade média encontrada nos controles é 18,5% superior à observada no grupo intoxicado. A dos controles com fenótipo CHE2 C5+ é 9,6% maior que a dos com fenótipo CHE2 C5-. Nos intoxicados esta diferença é de 7,1%. Estes dados, acrescidos aos observados quanto aos valores baixos de atividade, sugerem que há inibição da colinesterase do soro por parte dos compos-

tos organofosforados e carbamatos a ela ligados. Note-se ser esperado que o fenótipo CHE2 C5+ condicione uma atividade média cerca de 25% superior àquela encontrada no fenótipo CHE2 C5- (Harris, 1980). Isto significa que mesmo nossos controles apresentam certo grau de inibição da colinesterase do soro. Este dado vem em reforço da hipótese de que esta enzima é inibida antes da acetilcolinesterase eritrocitária, pois nossos controles apresentam de 87,5 a 100,0% da atividade desta última enzima.

4.5 Susceptibilidade e Proteção à Inibição da Colinesterase do Soro por Agrotóxicos Organofosforados e Carbamatos

Admitimos que o loco CHE1 tem um papel importante no mecanismo de susceptibilidade à inibição da colinesterase do soro, uma vez que o mesmo apresenta o alelo atípico, o qual tem afinidade menor por compostos positivamente carregados, como os carbamatos. Assim, esta enzima atípica se liga em menor concentração a estes compostos, deixando livre o inibidor que deverá se ligar a outras esterases (acetilcolinesterase eritrocitária e cerebral e a do Sistema Nervoso Autônomo) levando ao surgimento dos sintomas característicos da intoxicação.

O risco relativo de intoxicação, levando-se em conta os fenótipos do loco CHE1, foi estimado através do método proposto por Woolf (1955). O resultado mostra que os fenótipos não usuais aumentam o risco de intoxicação em 8,75 vezes em relação aos portadores de fenótipos usuais. Em outras palavras, os indivíduos com fenótipos não usuais seriam 8,75 vezes mais propensos a se intoxicarem que os que possuem fenótipo usual.

Por outro lado, o alelo CHE2*C5+ poderia estar implicado

na resistência à intoxicação por compostos organofosforados e carbamatos. Nossa hipótese é que esse alelo por condicionar maior concentração enzimática permitiria maior potencial de ligação com estes compostos, levando à proteção maior da acetilcolinesterase.

Neste loco existe também o alelo CHE2*C5- que em homozigose se expressa no fenótipo CHE2 C5-, que aumenta o risco de intoxicação em 3,9 vezes quando comparado com o fenótipo CHE2 C5+, em fenótipos usuais. É válido dizer que os indivíduos com fenótipo CHE2 C5- são 3,9 vezes mais suscetíveis à intoxicação que os que possuem o outro fenótipo. A fração etiológica estimada neste caso foi de 70,15%, isto porque a sua frequência na população é muito alta.

Deve-se ressaltar que o loco CHE1 parece estar implicado neste mecanismo de modo mais direto, pois pôde-se perceber que o alelo CHE2*C5+ parece exercer o seu papel de proteção apenas quando na presença do fenótipo usual. É interessante ressaltar que a fração preventiva do fenótipo CHE1 U CHE2 C5+ é de cerca de 14,4%. Do ponto de vista prático, seria interessante que os agricultores portadores de variantes não usuais da colinesterase do soro fossem alertados, de modo a virem a seguir rigorosamente as instruções de uso adequado de agrotóxicos.

Há de se ressaltar que outros fatores estão implicados no processo de susceptibilidade e resistência e que não foram determinados no presente trabalho. Entre outros fatores genéticos poderíamos citar o polimorfismo da paraoxonase. Admite-se que indivíduos portadores do alelo PX*H, condicionador de maior ati

vidade desta enzima (Mueller e cols., 1923), devem ser mais resistentes à ação do Paraoxon, por exemplo. Por outro lado, há fatores que diminuem a atividade da colinesterase do soro e que podem afetar o mecanismo de susceptibilidade, tais como o sexo feminino (mulheres que se utilizam de anticoncepcionais ainda têm uma atividade menor, como demonstrado por Sidell e Kaminskis, 1975), idade mais avançada, distúrbios hepáticos (revisão em Whittaker, 1980) e estado nutricional (Harper, 1977).

A fração etiológica atribuída aos fenótipos não usuais do loco CHE1, foi de 11,6% e aquela referente ao fenótipo CHE2 C5- corresponde a 70,1%. Note-se que poderiam também ser fatores associados a estes fenótipos, os responsáveis por essas proporções de intoxicação, considerada como de pouca gravidade. É muito provável que a frequência de variantes não usuais esteja bem mais aumentada numa amostra de intoxicados graves. Os presentes dados se aplicam apenas à intoxicação leve.

5. CONCLUSÕES

1. Nos 29 municípios paranaenses visitados foi encontrada uma frequência de intoxicação de 22%, revelada pela inibição da acetilcolinesterase eritrocitária. Entre os compostos agrotóxicos, utilizados pelos lavradores da amostra coletada, cerca de 50% são capazes de inibir as colinesterases.

2. Os indivíduos considerados como intoxicados, pela avaliação da atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária, mostraram frequência significativamente mais alta de fenótipos não usuais da colinesterase do soro ($13,1\% \pm 4,3\%$), do que seus controles ($1,7\% \pm 1,7\%$). Esses resultados sugerem maior susceptibilidade à intoxicação em indivíduos de fenótipos não usuais, que apresentam um risco relativo de intoxicação cerca de 9 vezes maior do que o apresentado pelos indivíduos de fenótipos usuais. A fração etiológica correspondente à frequência de casos de intoxicação devida aos fenótipos não usuais ou a fatores a eles associados foi calculada em cerca de 12%.

3. No grupo de indivíduos intoxicados com fenótipos usuais, notou-se frequência significativamente inferior do fenótipo CHE2 C5+ ($5,7\% \pm 3,2\%$) do que em seus controles de fenótipos usuais ($19,0\% \pm 5,1\%$). Esses resultados indicam que o fenótipo CHE1 U CHE2 C5- apresenta risco relativo de intoxicação cerca de 4 vezes maior do que o fenótipo CHE1 U CHE2 C5+. Como o fenótipo CHE2 C5- é muito freqüente na população, cerca de 70% dos casos de intoxicação dos fenótipos usuais seriam devidos à sua presença ou a fatores a ele associados.

4. Na população total, o fenótipo CHE1U CHE2 C5+ apresenta o menor risco relativo de intoxicação (0,23), concorrendo para a prevenção de 14,4% dos casos (fração preventiva).

5. Nos intoxicados a média da atividade relativa da acetilcolinesterase eritrocitária foi significativamente inferior no

grupo que apresenta colinesterase do soro não usual (60,9% \pm 6,5%) do que naquele com esta enzima de fenótipo usual (70,1% \pm 8,7%).

6. Com referência à atividade da colinesterase do soro observou-se atividade média significativamente inferior no grupo dos intoxicados (5,4 \pm 1,8 U.I.) do que no grupo controle (6,4 \pm 2,4 U.I.). Esses valores são significativamente menores que os encontrados em uma amostra da população de Curitiba (7,8 \pm 2,5 U.I.), sugerindo que tanto controles como intoxicados devem apresentar certo grau de inibição da colinesterase do soro.

7. Em resumo, os dados permitem levantar a hipótese de que a colinesterase do soro seja inibida antes da acetilcolinesterase eritrocitária, constituindo-se, por isto, num fator de proteção à intoxicação pela inibição desta última enzima. As variantes da colinesterase do soro com menor afinidade por organofosforados e carbamatos e/ou com menor atividade desta enzima predisporiam à intoxicação por permitirem maior grau de inibição da acetilcolinesterase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.K.C.; PICHETH, C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. e VIEIRA, H.M. Effects of paraoxon on methods of serum cholinesterase phenotyping. Proceedings of the 8th International Congress of Human Genetics, Washington, p. 117, 1991.
- AGARWAL, D.P.; SRIVASTAVA, L.M. e GOEDDE, H.W. A note on suxamethonium sensitivity and serum cholinesterase variants. Hum.Genet., 32: 85-88, 1976.
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, C. e VIEIRA, H.M. A method for serum cholinesterase phenotyping. Rev.Brasil.Genet., 14: 841-846, 1991.
- ALDRIDGE, W.N. The differentiation of true and pseudocholinesterase by organophosphorus compounds. Biochem.J., 53: 62-67, 1953a.
- ALDRIDGE, W.N. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem.J., 53: 117-124, 1953b.
- ALDRIDGE, W.N. The inhibition of erythrocyte cholinesterase by tri-esters of phosphoric acid. 3. The nature of the inhibitory process. Biochem.J., 54: 442-448, 1953c.
- ALLES, C.A. e HAWES, R.C. Cholinesterase in the blood of man. J.Biol.Chem., 133: 375-390, 1940.
- ANDREA, M.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R.H. e RÜEGG, E.F. Degradation of parathion by soil kept moist with and without repeated applications. Environ.Pollut.Ser.A., 27: 167-177, 1982.
- ANTROPOL, W.; TUCHMAN, T. e SCHIFFIN, P. Choline-esterase activity of human sera, with special reference to hyperthyroidism. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 36: 46, 1973.
- ASKEW, B.H. Oximes and hydroxamic acid as antidotes in anticholinesterase poisoning. Brit.J.Pharmacol., 11: 417, 1956.
- ATAK, J.R.; PERRY, E.K.; BOHMAN, J.R.; CANDY, J.K. e PERRY, R.H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. J.Neurochem., 47: 263-277, 1986.

- AUGUSTINSSON, K.E. Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma. Ann.N.Y.Acad.Sci., 94: 844-860, 1961.
- AUGUSTINSSON, K.E. Arylesterases. J.Histochem.Cytochem., 12: 744-747, 1964.
- BAJGAR, J. Inhibition of acetylcholinesterase in different parts of the brain of mice by isopropil methylphosphonofluoridate in vitro and in vivo. Arch.Toxicol., 27: 233-241, 1971.
- BALL, W.L.; SINCLAIR, J.W.; CHEVIER, M. e KAY, K. Modification of parathion's toxicity for rats by pretreatment with chlorinated hydrocarbon insecticides. Can.J.Biochem.Physiol., 32: 440-445, 1954.
- BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; ADKINS, S.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, D. e LA DU, B.N. Identification of two different mutations associated with human butyrylcholinesterase fluoride resistance in serum. Third International Meeting on Cholinesterase, França, 1990, p. 103. Resumo
- BECKER, C.E. Sernylan inhibition of human serum cholinesterase. Hum.Hered., 22: 55-57, 1972.
- BURLINA, A.; MICHELIN, E. e CALZIGNA, L. Characteristics and behaviour of arylesterases in human serum and liver. Eur.J.Clin.Invest., 7: 17-20, 1977.
- CÁCERES, O.; TUNDISI, J.G. e CASTELLAN, D.A.M. Residues of organochloric pesticides in reservation in São Paulo State. Cienc.Cult., 39: 259-264, 1987.
- CENTENO, A.J.; CHEN, L.; PÉLICO, J.V.C. e NASCIMENTO, L.B. Txicidade e potencialidade mutagênica de inseticidas. Cienc.Cult., 40(Supl.):757, 1988. Resumo.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICMETH, G.; LOURENCO, M.A.C. e VIEIRA, M.M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. Hum.Hered., 41:330-339, 1991.
- CHRISTEN, P.J.; SCHOT, P.K. e COHEN, E.M. Interaction of some cholinesterase inhibitors with aliesterase from rat plasma. Acta Physiol.Pharmacol.Neerl., 15: 397-398, 1969.
- CLITHEROW, J.W.; HITCHARD, M. e HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature, 199: 1000-1001, 1963.

COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 2ªed., Produção e Coordenação de E. Andrei, Organização Andrei Editora, Ltda, São Paulo, 492p., 1987.

DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M. e LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid) procedure. Clin.Chem., 19: 1309-1313, 1973.

DuBOIS, K.P. e CEILING, M.K. Textbook of Toxicology, Oxford University Press, New York, p. 218-223, 1959.

ECKERSON, H.W.; ROMSON, J.; WYTE, C.M. e LA DU, B.N. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. Am.J.Hum.Genet., 35: 214-227, 1983a.

ECKERSON, H.W.; WYTE, C.M. e LA DU, B.N. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Am.J.Hum.Genet., 35: 1126-1138, 1983b.

ECOBICON, D.J. e COMEAU, A.M. Pseudocholinesterases of mammalian plasma: physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. Toxicol.Appl.Pharmacol., 24: 92-100, 1973.

EDSON, E.F. Emergencies in general practice: agricultural pesticides. Brit.Med.J., i: 841-844, 1955.

EDSON, E.F. e FENWICK, K.L. Measurement of cholinesterase activity of whole blood. Brit.Med.J., 1: 1218, 1955.

ESPIR, K.L.E.; HALL, J.W.; SHIRREFFS, J.G. e STEVENS, D.L. Impotence in farm workers using toxic chemicals. Brit.Med.J., 1: 423-425, 1970.

EVANS, R.T.; IQBAL, J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. e RUBINSTEIN, H.M. A family segregating for E^J₁ at cholinesterase locus 1. J.Hum.Genet., 17: 464-467, 1980.

EVANS, R.T. e WARDELL, J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a Caucasian population. J.Hum.Genet., 21: 99-102, 1984.

FADEL-PICHETH, C.M.T. Variabilidade do loco E₁CHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991, 107p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

GAGE, J.C. A cholinesterase inhibitor derived from OO-diethyl-O-p-nitrophenyl thiophosphate in vivo. Biochem.J., 54: 426-430, 1953.

- GARRY, P.J. Serum cholinesterase variants: examination of several differential inhibitors, salts and buffers used to measure enzyme activity. Clin.Chem., 17: 183-191, 1971a.
- GARRY, P.J. A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants - differentiation by means of tris and phosphate buffers. Clin.Chem., 17: 192-199, 1971b.
- GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUDRANC, T.; TOED, P.C.; JAMES, M. e RUBINSTEIN, H.H. New allele at cholinesterase locus 1. J.Med.Genet., 13: 30-42, 1976.
- GARRY, P.J.; OWEN, C.M. e LUDIN, A.H. Identification of serum cholinesterase fluoride variants by differential inhibition in tris and phosphate buffers. Clin.Chem., 18: 105-109, 1972.
- GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, H. Polymorphism of human serum paraoxonase. Hum.Genet.(Suppl.): 65-68, 1978.
- GELDMACHER-v. MALLINCKRODT, H.; HOMMEL, G. e DUMBACH, J. On the genetics of the human serum paraoxonase (E.C. 3.1.1.2). Hum.Genet., 50: 313-326, 1979.
- GEREBTZOFF, H.A.; PHILIPPOT, E. e DALLEMAGNE, M.J. Recherches histochimiques sur les acétylcholine et choline estérases. 2. Activité enzymatique dans les muscles lents et rapides des mammifères et des oiseaux. Acta Anat., 20: 234-257, 1954.
- GOEDDE, H.W.; GEMRING, D. e MOFFATT, R.A. On the problem of a "silent gene" in pseudocholinesterase polymorphism. Biochem.Biophys.Acta, 107: 391-393, 1965.
- HANEL, H.K. e NOCENSEN, J.V. Urea inhibition of human pseudocholinesterase - A new method of detecting atypical pseudocholinesterase in homozygotes. Erit.J.Anaesth., 43: 51-53, 1971.
- HARPER, H.A. Manual de Química Fisiológica, 4ª ed., Trad. J.R. Magalhães, Atheneu Editora São Paulo, S.A., São Paulo, p. 176, 1977.
- HARRIS, H. The Principles of Human Biochemical Genetics, 3rd ed., -- Elsevier/Noth-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands, p. 153-173, 1980.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. e ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal human serum. Nature, 196: 1296-1298, 1962.

- HARRIS, H. e ROBSON, E. Screening tests for the "atypical" and "intermediate" serum cholinesterase types. Lancet, 2: 218-221, 1963.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M. e THORNTON, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. Nature, 200: 1185-1187, 1963.
- HARRIS, H. e WHITTAKER, H. Differential response of human serum cholinesterase types to an inhibitor in potato. Nature, 188: 1602-1609, 1959.
- HARRIS, H. e WHITTAKER, H. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. Nature, 191: 493-498, 1961.
- HOLMSTEDT, B. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. Pharmacol.Rev., 11: 567-588, 1959.
- HUGGINS, C. e LAPIDES, J. Chromogenic substrates. IV. Acyl esterases of p-nitrophenol as substrate for colorimetric determination of esterase. J.Biol.Chem., 170: 467-482, 1947.
- HUMISTON, C.G. e WRIGHT, G.J. An automated method for the determination of cholinesterase activity. Toxicol.Appl. Pharmacol., 10: 457-480, 1967.
- JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F. e LA DU, B.H. A DNA mutation associated with the H variant of human butyrylcholinesterase. Third International Meeting on Cholinesterase, França, 1990, p. 101. Resumo.
- KALOW, W. e GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. Can.J.Biochem.Physiol., 35: 339-346, 1957.
- KEWITZ, H. e NACHMANSOHN, D. A specific antidote against lethal phosphate intoxication. V. Effects in brain. Arch.Biochem.Biophys., 66: 271-283, 1957.
- KITCHEN, B.J.; MASTERS, C.J. e WINZOR, D.J. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine arylesterase. Biochem.J., 135: 93-99, 1973.
- KODAYASHI, K.; SAKAGUCHI, T. e MATSUOKA, A. Stimulating effects of calcium and magnesium on serum pseudocholinesterase activity. Clin.Chem., 34: 173-174, 1988.

- KOELLE, G.B. **The elimination of enzymatic diffusion artefacts in the histochemical localization of cholinesterase and a survey of their molecular distribution.** J.Pharmacol. Exptl.Therap., 103: 153-171, 1951.
- KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. Clin.Biochem., 13: 239-243, 1980.
- KUTTY, K.M.; HUTTON, C.J. e KHAM, W. An ultramicrotechnique for the assay of serum cholinesterase. Results in normal children with infectious hepatitis. Clin.Biochem., 4: 259, 1971.
- LA DU, E.N. Identification of human serum cholinesterase variants using the polymerase chain reaction amplification technique. Trends in Pharmacological Sciences, 10: 309-313, 1989.
- LA DU, E.N. e LOCKRIDGE, O. Molecular biology of human serum cholinesterase. Federation Proc., 45: 2965-2969, 1986.
- LAMOTTA, R.V.; McCOMB, R.D. e METSTORF, J. Isozymes of serum cholinesterase: a new polymerization sequence. Can.J.Phys.Pharmacol., 43: 313-318, 1965.
- LARRIPA, L.; MATOS, E.; VILHESA, H.L. e SALUN, S.D. Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide. Rev.Brasil. Genet., 6: 719-727, 1983.
- LIDDELL, J.; LEHMAN, H. e SILK, E. A "silent" pseudocholinesterase gene. Nature, 193: 561-562, 1962.
- LIHPEROS, G. e RANTA, K.E. A rapid screening test for the determination of the approximate cholinesterase activity of human blood. Science, 117: 453-455, 1953.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, E.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. J.Biol.Chem., 254: 8324-8330, 1979.
- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.H.; NORTON, S.E. e JOHNSON, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. J.Biol.Chem., 262: 549-557, 1987.

- HACARIAN, E.D. e DIETZ, A.J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. J.Clin.Pharmacol., 27: 819-820, 1967.
- HAIN, A.R. e BRAID, P.E. Hydrolyses of malathion by ali-esterases in vitro and in vivo. Biochem.J., 94: 255-263, 1962.
- MATSON, A.V. e HALON, W. Interaction between aromatic esterase of human serum and bivalent metal ions. Can.J. Biochem.Physiol., 40: 319-324, 1962.
- MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. I. Parametres moléculaires apparents et ébauche de la structure quaternaire. Biochim.Biophys.Acta, 578: 493-504, 1979.
- MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. Biochim. Biophys.Acta, 988: 258-266, 1989.
- MASSON, P.; FROMENT, M.T. e AUDRAS, J.C. Molecular characterization of the human plasma cholinesterase variant (CHE2). Third International Meeting on Cholinesterases, França, 1990, p. 131. Resumo.
- MATSUURA, F. Toxicology of Insecticides, 2nd ed., Plenum Press, New York, 1985, 568p.
- MERDEL, E.; MUNDELL, D.B. e RUDNEY, H. Specific tests for true cholinesterase and pseudo-cholinesterase. Biochem.J., 37: 473-476, 1943.
- MENDOZA, C.E. e SHIELDS, J.E. Sensivity of pig liver esterases in detecting twelve carbanate pesticides on thin-layer chromatograms. J.Chromatogr., 50: 92-102, 1970.
- MENDOZA, C.E. e SHIELDS, J.E. Esterase specificity and sensivity to organophosphorus and carbanate pesticides: factors affecting determination by thin layer chromatography. J.Assoc.Off.Anal.Chem., 54: 507-512, 1971.
- MENDOZA, C.E.; SHIELDS, J.E. e AUGUSTINSSON, K.B. Arylesterases, carboxylesterases and their activity towards some pesticides. Comp.Biochem.Physiol., 55: 23-26, 1976.
- NIETTINEN, C.S. Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. Am.J.Epidemiol., 99: 325-332, 1974.

- MORROW, A.C. e MOTULSKY, A.G. Rapid screening method for the common atypical pseudocholinesterase variant. J.Lab.Clin. Med., 71: 350-356, 1968.
- MOUNTER, L.A.; DIETZ, L.T.H. e CHANUTIK, A. The distribution of dialkylfluorophosphates in the tissues of various species. J.Biol.Chem., 215: 691-697, 1955.
- MOUNTER, L.A. e WHITTAKER, V.P. The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases and other esterases. Biochem.J., 54: 551-559, 1953.
- MUELLER, R.F.; HORNUNG, S.; PURLONIC, C.E.; ANDERSON, J.; GIBLETT, E.R. e MOTULSKY, A.G. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. Am.J.Hum.Genet., 35: 393-408, 1983.
- MYERS, D.K. Mechanism of the prophylactic action of diacetylmonoxime against sarin poisoning. Biochim.Biophys. Acta, 34: 555-557, 1959.
- NACHMANSOHN, D. e ROTHERBERG, H.A. Studies on cholinesterase. 1. On the specificity of the enzyme in nerve tissue. J.Biol.Chem., 152: 653-660, 1945.
- MANDA-KUMAR, N.V. e RAMASUNDARI, M. Colorimetric determination of methyl parathion and oxygen analog. J.Assoc.Off.Anal.Chem., 63: 536-538, 1980.
- MANDA-KUMAR, N.V.; VESWESVARIAH, K. e MAJUMDER, S.K. Thin layer chromatography of parathion as paraoxon with cholinesterase inhibition detection. J.Assoc.Off.Anal.Chem., 59: 641-643, 1976.
- NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, H.C.; BARTELS, C.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human butyrylcholinesterase in serum (variant Ann Arbor). Third International Meeting on Cholinesterase, França, 1990, p. 102. Resumo
- O'BRIEN, R.D. Binding sites of cholinesterase. Alkylation by an aziridium derivative. Biochem.J., 113: 713-719, 1969.

- ORTONNE, J.P.; KHATCHADOURIAN, C.; VOULOT, C. e MENZO, Y.
Cholinesterases isozymes: a comparative study in the
skin and plasma. J.Invest.Dermatol., 73: 239-242,
1979.
- PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M.M. e SOUZA-SPINOSA, H.
Intoxicações por praguicidas: uma visão crítica. Cienc.
Cult., 39: 1017-1022, 1987.
- PRIMO-PARMO, S.L.; VIEIRA, M.M.; LOURENÇO, M.A.C.;
PICHETH, G. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Modification
of the C₅ isozyme of human serum cholinesterase by
electrophoresis. Third International Meeting on
Cholinesterase, França, 1990, p.182. Resumo.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F. e BEÇAK, W. Indução de
alteração de morfologia de espermatozóides de camundongo
por exposição ao diclorvós. Cienc.Cult., 38(Supl.): 838,
1986. Resumo.
- ROSES, O.E. Plaguicidas organofosforados y cholinesterases.
In IOVINE, E. e SELVA, A.A. El Laboratorio en la Clinica,
2ª ed., Panamericana, Buenos Aires, p. 1033-1048, 1979.
- ROUFOGALIS, B.D. e QUIST, E.D. Relative binding sites of
pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte
acetylcholinesterase. Mol.Pharmacol., 8: 41-49, 1972.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A. e LUBRANO, T. E₁^k another
quantitative variant at cholinesterase locus 1.
J.Med.Genet., 15: 27-29, 1978.
- RÜEGG, E.F.; PUGA, F.R.; SOUZA, M.C.M.; ÚNGARO, M.T.S.;
FERREIRA, M.S.; YOKOMIZO, Y e ALMEIDA, W.F. Impacto dos
Agrotóxicos Sobre o Ambiente, a Saúde e a Sociedade,
Icône Editora Ltda, São Paulo, 96p., 1986.
- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; GAETA, R.; PUGGA, F.R. e
BEÇAK, W. Toxicidade e efeitos citogenéticos do
inseticida Malathion. Cienc.Cult., 37(Supl.): 759, 1985.
Resumo.
- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FERREIRA, C.A.B. e BEÇAK,
W. Efeito citogenético do Malathion em células somáticas
de camundongos. Cienc.Cult., 38(Supl.): 837, 1986a.
Resumo.

- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FERREIRA, C.A.B. e BEÇAK, W. Ação do Malathion sobre as células meióticas de Mus musculus. Cienc.Cult., 38(Supl.): 838, 1986b. Resumo.
- SAROJA, G. e BOSE, S. Effects of methyl parathion on the growth, cell size, pigment and protein content of Chlorella protothecoides. Environ.Pollut.Ser.A., 27: 297-308, 1982.
- SCHVARTSMAN, S. Intoxicações Agudas, 2ª ed., Servier S.A. Editora de Livros Médicos, São Paulo, p. 368-374, 1979.
- SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Serum cholinesterase is a tetramer ? Nature, 236: 83-84, 1972.
- SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. Am.J.Hum.Genet., 26: 189-194, 1974.
- SCOTT, E.M. e WRIGHT, R.C. A third type of serum cholinesterase deficiency in Eskimos. Am.J.Hum.Genet., 28: 253-256, 1976.
- SHAIN, S.A.; SHAEFFER, J.C. e BOESEL, R.W. The effect of chronic ingestion of selected pesticides upon rat ventral prostate homeostasis. Toxicol.Appl.Pharmacol., 40: 115-130, 1977.
- SHELLENGER, T.E.; NEWELL, G.W. e ADAMS, R.F. Cholinesterase inhibition and toxicologic evaluation of two organophosphate pesticides in Japanese Quail. Toxicol.Appl.Pharmacol., 8: 22-28, 1966.
- SHIH, P.L.; CHANG, W. e SONG, J.L. Cholinesterase in hepatobiliary diseases. J.A.M.A., 65: 519-528, 1966.
- SIDELL, P.R. e KAMINSKIS, A. Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. Clin.Chem., 21: 1393-1395, 1975.
- SIMPSON, N.E. Polyacrylamide electrophoresis used for the detection of C5+ cholinesterase in Canadians, Indians, and Eskimos. Amer.J.Hum.Genet., 24: 317-320, 1972.

- SIMPSON, N.E. e ELLIOT, C.R. Cholinesterase Newfoundland: a new succinylcholine-sensitive variant at cholinesterase locus 1. Amer.J.Hum.Genet., 33: 366-374, 1981.
- SKALISZ, R.O. Diagnóstico dos Problemas Ecotoxicológicos Causados pelo uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná, SEAB-Defis, 30p., 1984.
- SMITH, J.C. e FOLDES, F.F. The recognition of atypical plasma cholinesterase by relative substrate hydrolysis rate. Biochim.Biophys.Acta, 289: 352-358, 1972.
- STREET, J.C. e SHARMA, R.P. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, Aroclor 1254, Carbofuran, and methyl-parathion. Toxicol.Appl.Pharmacol., 32: 587-602, 1975.
- TORTOLERO, M. e MEDINA, J.R. Los isoenzimas C₄ y C₅ de la pseudocholinesterase humana. Sangre, 23: 157-162, 1978.
- UDAYA BHASKAR, S. e NANDA KUMAR, N.V. Thin layer chromatographic determination of methyl parathion as paraoxon by cholinesterase inhibition. J.Assoc.Off.Anal.Chem., 64: 1312-1314, 1981.
- UDAYA BHASKAR, S. e NANDA KUMAR, N.V. Selection of enzyme sources for improved sensitivity in enzymatic determination of organophosphorus pesticides. J.Assoc.Off.Anal.Chem., 65: 1297-1298, 1982.
- VAN ROS, G. e VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairans and Belgians by agar gel electrophoresis with an acid buffer. Ann.Soc.Belge.Méd.Trop., 53: 633-644, 1973.
- VELÁZQUEZ, A.; XAMENA, N.; CREUS, A. e MARCOS, R. Indication for weak mutagenicity of the organophosphorus insecticide dimethoate in Drosophila melanogaster. Mut.Res., 172: 237-243, 1986.
- WAY, R.C.; HUTTON, C.J. e KUTTY, K.M. Relationship between serum cholinesterase and low density lipoprotein in children with nephrotic syndrome. Clin.Biochem., 8: 103, 1975.

- WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with n-butyl alcohol: recognition of new phenotypes. Acta Genet., 18: 335-340, 1968a.
- WHITTAKER, M. The pseudocholinesterase variants. Differentiation by means of sodium chloride. Acta Genet., 18: 556-562, 1968b.
- WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia, 35: 174-197, 1980.
- WHITTAKER, M. Monographs in Human Genetics - Cholinesterase, v.11, Karger, Basel, 132p., 1986.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. E_1^h a new allele at cholinesterase locus 1. Hum.Hered., 37: 54-58, 1987.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Recognition of two new phenotypes segregating the E_1^k allele for plasma cholinesterase. Hum.Hered., 38: 233-239, 1988.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. e WICKS, R.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. Br.J.Anaesth., 53: 511-516, 1981.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J.; YVAS, A.B. e HAYES, T.C. Family studies of the $E_1^{k,s}$ genotype for plasma cholinesterase. Hum.Hered., 38: 228-232, 1988.
- WHITTAKER, M.; WICKS, R.J. e BRITTEN, J.J. Studies on the inhibition by propranolol of some human erythrocyte membrane enzymes and plasma cholinesterase. Clin.Chim.Acta, 119: 107-114, 1982.
- WILLADINO, G. Atlas da Educação no Brasil, MEC/SEPS/FAE, Rio de Janeiro, 153p., 1985.
- WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann.Hum.Genet., 19: 251-253, 1955.
- ZELINSKI, T.; KAITA, H.; LEWIS, M.; COGHLAN, G. e CRAIG, D. The sequence of chromosome 3 loci AHSB:TF:CHE1. Hum.Hered., 37: 1-6, 1987.