

Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós

Morphological and morphometric aspects of rats brain in chronic organophosphate intoxication

RIALA6/1062

Nilda M. PEREZ¹, *Edenilson E. CALORE^{1,2}, Liz VILELA-DE-ALMEIDA¹, Emerson S. NARCISO³, Flávio R. PUGA³.

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Patologia, Instituto Emílio Ribas - São Paulo, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 165 - CEP 01246-900 - São Paulo/SP, Brasil. FAX: (055)(011) 3721-2467 e-mail: ecalore@terra.com.br

² Departamento de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

³ Departamento de Toxicologia, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Recebido: 15/09/2005 – Aceito para publicação: 22/03/2006

RESUMO

Foram descritos distúrbios neurológicos sutis após intoxicação por organofosforados. Estudos experimentais relataram necrose de neurônios, particularmente nos animais que apresentaram convulsões. O objetivo do presente trabalho foi investigar se ratos (que não tenham apresentado convulsões) expostos a um agente organofosforado, apresentaram alterações morfológicas em regiões específicas do cérebro. Os animais receberam 2.5 ou 5.0 mg/kg peso de metamidofos, uma vez por semana, por dois meses e foram decapitados dois meses e sete dias após a primeira administração da droga. Foi observada atrofia da camada molecular do córtex parietal sem perda neural em regiões específicas do cérebro. Isto pode ser devido a atrofia ou à perda de ramificações neurais mas sem perda de corpos neuronais.

Palavras-Chave. cérebro, morfometria, organofosforado, inibidores de colinesterase, excitotoxicidade.

ABSTRACT

Subtle neurological disturbs are described in organophosphorus intoxication. Experimental studies have reported neuronal necrosis particularly in animals that present seizures. The objective of the present work was to investigate if rats (without seizures) exposed to an organophosphate agent, would have morphological changes of specific regions of the brain. The animals received 2,5 or 5,0 mg/kg of methamidophos, once a week, for 2 months and were decapitated after 2 months and 7 days of drug administration. We have observed atrophy of the molecular layer of the parietal cortex without neuronal loss in specific cerebral regions. This would be due to atrophy or loss of neuronal ramifications but without neuronal loss.

Key Words. brain, morphometry, organophosphate, cholinesterase inhibitors, excitotoxicity.

INTRODUÇÃO

A intoxicação aguda por organofosforados tem grande importância epidemiológica para seres humanos e animais^{1,2,3}. Os principais sintomas destas intoxicações são decorrentes da hiperestimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático resultando no que se denomina Síndrome Colinérgica Aguda por organofosforados. Entre estes sintomas se destacam um grande aumento na secreção brônquica, broncoespasmo, bradicardia, alteração nos níveis pressóricos e também, convulsão, coma e paralisia do centro respiratório. Além disso, descreve-se uma Síndrome da Neurotoxicidade Intermediária (Síndrome Intermediária) também relacionada à intoxicação por organofosforados. Os sintomas da síndrome intermediária são relacionados à fraqueza dos músculos inervados pelos nervos

craniais e são observados de 24 a 96 horas após a Síndrome Colinérgica Aguda. A Síndrome da Neurotoxicidade retardada relacionada aos organofosforados (OPIDN) é caracterizada por polineuropatia motora distal, surgindo de 1 a 3 semanas após a exposição a alguns compostos organofosforados. As manifestações clínicas são fraqueza muscular, seguida de espasticidade, hiperreflexia, clonus, reflexos anormais e sinais de liberação piramidal^{4,5}. O mecanismo de indução da OPIDN parece estar associado à inibição de uma enzima, a carboxil-esterase neuronal não específica (neurophatic target esterase - NTE). Acredita-se que a NTE desempenha um importante papel no metabolismo de lípidios neuronais^{6,7}.

Seqüelas neurológicas da intoxicação por organofosforados também foram descritas, incluindo disfunção neuropsicológica⁸. Há evidências que os pacientes cronicamente

expostos podem desenvolver distúrbios comportamentais como depressão e déficits de atenção⁹. Parron¹⁰ et al sugeriram que há um aumento do risco de suicídio entre pessoas expostas aos inseticidas quando comparado a outras pessoas com características socioeconômicas e demográficas semelhantes. Estudos experimentais demonstraram efeitos neurocomportamentais em ratos como a diminuição da atividade locomotora e exploratória¹¹.

Como o ser humano pode ser exposto aos organofosforados por longos períodos, particularmente os trabalhadores rurais sem proteção adequada, o objetivo do presente trabalho foi investigar em um modelo experimental, se ratos (que não tenham apresentado convulsões ou sinais de hipóxia) expostos à baixas doses de um agente organofosforado, podem exibir alterações morfológicas em regiões específicas do cérebro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dezoito ratos machos albinos adultos da linhagem Wistar, pesando em média 280g. Os grupos experimentais receberam o organofosforado O, S-dimetilfosforoamidotionato (metamidofós). A DL50 oral desta substância para ratos foi previamente determinada (18 mg/kg peso). Os animais tiveram livre acesso à ração comercial e à água até 12 horas antes da administração do metamidofós (jejum noturno). Na manhã seguinte, 2 grupos de 6 animais receberam por via gástrica, respectivamente 2,5mg/kg peso (G2,5) e 5,0mg/kg peso (G5,0) de metamidofós uma vez por semana por dois meses. Um grupo controle de 6 animais recebeu o glicerofórmol por via gástrica pelo mesmo período de administração. Os sintomas de intoxicação, assim como a ocorrência de possíveis convulsões, foram observados durante 12 horas após cada administração. Os animais foram decapitados uma semana após a última administração do composto.

Os encéfalos foram dissecados e seccionados transversalmente na porção central (correspondendo ao sulco central). As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e incluídas em parafina. Foram realizados 20 cortes seriados do cérebro (8 ¼m de espessura) em direção à região occipital. Os cortes foram submetidos à coloração pela hematoxilina eosina ou cresil-violeta e visualizadas ao microscópio óptico.

Morfometria: foram realizados estudos morfométricos por microscopia óptica em áreas específicas do cérebro (camada piramidal interna, camada piramidal externa do córtex cerebral e núcleo caudado).

Contagem dos neurônios: 10 imagens de cada área acima especificada foram fotografadas com aumento de 40x, usando uma câmera digital adaptada à um microscópio óptico e à um sistema digital de análise de imagens. A contagem dos neurônios foi realizada manualmente. Os neurônios foram identificados pela visualização direta por microscopia óptica. Somente os neurônios piramidais característicos (com os nucléolos claramente visíveis) foram contados nas camadas piramidal

cortical interna e externa. Somente os grandes neurônios do núcleo caudado foram contados. As células parcialmente representadas (não claramente identificadas) foram excluídas da contagem.

Espessura da camada molecular: Foi determinada a espessura da camada molecular do córtex parietal. Para a reprodutibilidade dos dados foi considerado em cada corte seriado, à área de menor espessura à um campo microscópico (40x) lateralmente ao sulco sagital superior, nos mesmos cortes seriados acima descritos. As imagens foram obtidas com objetiva 40x, e com a ajuda de um sistema de análise de imagens, foram obtidas as medidas da espessura cortical, traçando-se uma linha perpendicular que se iniciava no limite entre a camada molecular e a camada piramidal terminando na superfície do córtex (20 cortes de cada animal de cada grupo). A área analisada é formada principalmente por ramificações neurais.

Os dados foram submetidos à análise estatística usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (consideramos o nível de significância de 0,05).

RESULTADOS

Os animais do grupo intoxicado com 5 mg/kg peso durante 2 meses apresentaram sintomas moderados como tremores e fasciculação no período seguinte à primeira administração. Dois animais deste grupo apresentaram convulsões e foram excluídos do estudo. Nas administrações seguintes os animais não apresentaram nenhum sintoma. Os animais do grupo G2,5 não apresentaram nenhum sintoma de intoxicação. Pela análise qualitativa por microscopia óptica não foi observada necrose ou perda neuronal no grupo tratado e não foi observada diferença entre grupos tratado e controle.

Análise morfométrica.

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal na camada piramidal interna no grupo controle foram 24.067 ± 3.826 , no grupo G2,5 foram 26.000 ± 4.472 e no grupo G5,0 foram 23.567 ± 4.018 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$).

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal na camada piramidal externa no grupo controle foram 24.317 ± 5.199 , no grupo G2,5 foram 26.500 ± 4.020 e no grupo G5,0 foram 22.767 ± 4.485 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$).

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal no núcleo caudado no grupo controle foram 25.850 ± 5.725 , no grupo G2,5 foram 23.400 ± 4.005 e no grupo G5,0 foram 26.050 ± 5.143 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$) (tabela 1).

As médias e o desvio padrão da espessura da camada molecular foram $127.214 \pm 19.187 \mu\text{m}$ no grupo controle, 123.495 ± 12.497 no grupo G2,5 e 114.473 ± 14.429 no grupo G5,0. Embora tenhamos observado uma tendência à diminuição da espessura da camada molecular no grupo que recebeu 2.5

mg/kg de metamidofós, não foi observada diferença estatística significativa entre este grupo e o grupo controle ($p > 0,05$). Entretanto, pela análise estatística, a camada molecular do grupo G5,0 era mais delgada comparada ao grupo controle ($p < 0,001$) e ao grupo G2,5 ($p < 0,05$) (KW=28888) (tabela 2).

DISCUSSÃO

Alguns estudos experimentais relatam necrose neuronal no hipocampo, no córtex entorinal e frontal, no complexo amigdaloide, no núcleo caudado e no tálamo frontal pela intoxicação aguda por organofosforados^{12,13,14,15,16}. Como foram observadas convulsões ou insuficiência respiratória em praticamente todos os animais destes estudos, é provável que outros fatores como a anoxia sejam responsáveis por estas mudanças morfológicas.

Estudos em animais que sofreram intoxicação aguda por organofosforados e que não tenham apresentado convulsões são escassos, tendo sido observadas apenas lesões morfológicas mínimas, por exemplo, degeneração da mielina nas raízes dorsal e ventral do nervo espinal, após administração de triclorfonio¹⁷.

Nossos estudos, no entanto, indicam que a administração repetitiva (crônica) do agente anticolinesterásico metamidofós em doses subletais (menos de 1/3 de DL50), produziu afilamento da camada molecular do córtex parietal, o que foi demonstrado por estudos morfométricos. Entretanto, esta alteração não é acompanhada por perda neuronal das camadas piramidal interna e externa, e do núcleo caudado. Devido ao fato da camada molecular ser constituída basicamente por ramificações dendríticas e axonais dos neurônios, nós podemos concluir que em doses baixas e repetitivas, este organofosforado (metamidofós) possivelmente induza à perda ou afilamento de ramificações neuronais. Uma hipótese para explicar essas lesões cerebrais após a administração de compostos organofosforados seria a liberação excessiva de neurotransmissores, similar ao que acontece na excitotoxicidade por glutamato no estado de mal epilético. Esta hipótese é sustentada por Lallement¹⁸ et al que descreveram o efeito protetor de Gk-11, composto antiglutamatérgico, na intoxicação experimental pelo organofosforado soman.

Mesmo a exposição à doses subletais de organofosforados pode induzir efeitos neurotóxicos nos animais¹⁹. Ahlbom²⁰ et al observaram a diminuição da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos nos cérebros dos ratos expostos ao composto disopropilfluorofosfato (DFP). Entretanto, algumas evidências sugerem que os efeitos neurológicos observados após a administração de organofosforados seriam não somente devido à hiperatividade ou às convulsões “colinérgicas”. A disponibilidade de outros neurotransmissores podem estar alteradas, em consequência do excesso de atividade colinérgica. Esta liberação seria responsável, pelo menos em parte, pelas seqüelas neurológicas.

EL Etri²¹ et al, observaram uma diminuição dos níveis de norepinefrina nos ratos que apresentaram convulsões após uma única administração do composto organofosforado soman. Embora os níveis de dopamina e de serotonina não tenham se modificado nestes animais, os níveis de ácido 5-hidroxiindolacético (um metabolito da serotonina), e ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico (metabolito da dopamina) foram alterados, indicando um aumento de “turnovers” de dopamina e de serotonina. De acordo com estes autores, estes resultados sugerem que a mudança dos níveis de norepinefrina podem ter um papel importante na indução das convulsões após intoxicação por organofosforados. É importante indicar que o estado de mal epilético de qualquer etiologia pode induzir a perda neuronal no sistema nervoso central,

Tabela 1. Contagem neuronal em áreas cerebrais específicas.

Áreas Cerebrais	Contagem de Neurônios	Análise de variação
Camada piramidal interna	Controle	24.067 ± 3.826
	2,5 mg/kg	26.000 ± 4.472 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	23.567 ± 4.018 NS ($p > 0,05$)
Camada piramidal externa	Controle	24.317 ± 5.199
	2,5 mg/kg	26.500 ± 4.020 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	22.767 ± 4.485 NS ($p > 0,05$)
Núcleo basal	Controle	25.850 ± 5.725
	2,5 mg/kg	23.400 ± 4.005 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	26.050 ± 5.143 NS ($p > 0,05$)

S = significante; NS = não significante.

Foram obtidas 10 imagens de cada área específica (camada piramidal interna, camada piramidal externa do córtex cerebral e o núcleo caudado) em cada seção seriada. Os neurônios foram identificados em visualização direta por microscopia óptica. Somente os neurônios piramidais característicos (com nucléolo claramente visível) foram contados nas camadas piramidal cortical interna e externa. Somente os grandes neurônios do núcleo caudado foram contados. Não houve diferença significativa da contagem neuronal na camada piramidal interna, na camada piramidal externa e no núcleo caudado ($p > 0,05$).

Tabela 2. Espessura da camada molecular do cortex parietal.

Grupos	Espessura da camada molecular	Comparação estatística com controle
Controle	127.214 ± 19.187	
2,5 mg/kg	123.495 ± 12.497	NS ($p > 0,05$)
5,0 mg/kg	114.473 ± 14.429	S ($p < 0,001$)

S = significante; NS = não significante.

A camada molecular do grupo que recebeu 5.0 mg/kg (G5,0) de metamidofós era mais delgada comparada ao grupo de controle ($p < 0,001$) e ao grupo que recebeu 2.5 mg/kg ($p < 0,05$) (KW=28888).

particularmente no hipocampo. Estas lesões são relacionadas à liberação excessiva de neurotransmissores estimuladores como o glutamato^{22,23}.

Outras alterações metabólicas devido a intoxicação por organofosforados descritas previamente como a diminuição dos níveis cerebrais de glicose e o aumento da atividade da fosforilase do glicogenio, descrita por Sarin & Gill²⁴ não explicam as mudanças nos padrões neurocomportamentais dos animais nem as alterações morfológicas descritas. Seria difícil relacionar as alterações morfológicas que nós descrevemos no presente trabalho com sintomas clínicos específicos descritos após intoxicação por organofosforados. Entretanto, acreditamos que estas mudanças morfológicas sejam ainda mais disseminadas, afetando outras regiões cerebrais.

REFERÊNCIAS

1. Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Ann Emerg Med* 1987; 16: 193-202.
2. Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In Casarett And Doull's Toxicology: The basic science of Poisons (C.D. Klaassen. Ed.) 5th ed., McGraw-Hill, New York. 643-89, 1996.
3. Burn JD, Leighton FA. Further studies of brain cholinesterase: cholinergic receptor ratios in the diagnosis of acute lethal poisoning of birds by anticholinesterase pesticides. *J Wildlife Diseases* 1996; 32: 216-24.
4. Cavanagh JB. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on nervous system, an experimental study in hen. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1954; 17: 163-72.
5. Sprague GL, Bickford AA. Effect of multiple diisopropylfluorophosphate injections in hens: behavioral and histological investigation. *J Toxicol Environ Health* 1981; 8: 973-88.
6. Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy - Its NTE alive and well? *Toxicol Appl. Pharmacol* 1990; 102: 385-99.
7. Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit. Rev Toxicol* 1992; 21: 465-87.
8. Rosenstock L, Keifer M, Daniell WE, mc Monnell R, Claypoole K. The Pesticide health Effects Study Group. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Lancet* 1991; 338: 223-37.
9. Levin HS, Rodnitzky RL. Behavioral effects of organophosphate in man. *Clin Toxicol* 1976; 9(3): 391-403.
10. Parrón T, Hernández FA, Villanueva E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic Sci Int*, May 1996; 79: 53-63.
11. Socko R, Gralewicz S, Gorny R. Long-term behavioural effects of a repeated exposure to chlorphenvinphos in rats. *Int J Occupational Med Environmental Health* 1999; 12: 105-17.
12. Lemerrier G, Carpentier H, Sentenac-Roumanou Morlis P. Histological and Histochemical Changes in the Central Nervous System of the Rat Poisoned by an Irreversible Anticholinesterase Organophosphorus Compound. *Acta Neuropathol* 1983; 61: 123-9.
13. Petras JM. Brain pathology induced by organophosphate poisoning with the nerve agent soman. *Medical Defense Bioscience Review, United States Army Medical research Institute of Chemical Defense* 1884; 407-14.
14. Wall HG, Jaax NK, Hayward IJ. Brain lesions in rhesus monkeys after acute soman intoxication. *Medical Defense Bioscience Review, United States Army Medical research Institute Of Chemical Defense, Aberdeen Proving Ground, MD* 1987, 155-62.
15. Baze WB. Soman-induced morphological changes: an over view in the non-human primate. *J. Applied Toxicol* 1993; 13: 173-7.
16. Britt JO, Martin JL, Okerberg CV, Dick EJ. Histopathologic Changes in the Brain, Heart and Skeletal Muscle of Rhesus Macaques, Ten days after Exposure to Soman (na Organophosphorus Nerve Agent). *Comparative Medicine* 2000; 50:133-9.
17. Sheets, L.P., Hamilton, B.F., Sangha, G.K., Thyssen JH. Subchronic Neurotoxicity Screening Studies with Six Organophosphate Insecticides: An Assessment of Behaviour and Morphology Relative to Cholinesterase Inhibition. *Fundamental and Applied Toxicol* 1997, 35: 101-19.
18. Lallement GD, Clarencon D, Masqueliez D. Nerve agent poisoning in primates: antilethal, anti-epileptic and neuroprotective effects of GK-11. *Arch Toxicol* 1998; 72: 84-92.
19. Kassa J, Koupilová M, Herink J, Vachek J. The long term influence of low-level sarin exposure on behavioral and neurophysiological functions in rats. *Acta Medica* 2001; 44(1): 21-7.
20. Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. Exposure to na organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Research* 1995; 677: 13-9.
21. El Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau KA, Shipley MT. Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AchE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol* 1992; 118(2):153-63.
22. Olney JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatric* 1989; 26: 505-25.
23. Scorza FA, Arida RM, Priel MR, Calderazo L, Cavalheiro EA. Glucose utilization during status epilepticus in an epilepsy model induced by pilocarpine. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 198-203.
24. Sarin S, Gill KD. Dichlorvos induced alterations in glucose homeostasis: Possible implications on the state of neuronal function rats. *Mol Cell Biochemistry* 1999; 199: 87-92.