

VALIDAÇÃO DE ESTUDOS NEUROCOMPORTAMENTAIS APÓS EXPOSIÇÃO À AGROQUÍMICOS NO PERÍODO PERINATAL DE ROEDORES

V. L. S. S. de Castro¹ y P. A. Lopes da Silva²

¹ Embrapa Meio Ambiente, Laboratório de Ecotoxicologia, Rodovia SP 340, km 127.5, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil; e-mail: castro@cnpma.embrapa.br

² Instituto Militar de Engenharia, Praça General Tiburcio, 80 – Urca, 22290-270 - Rio de Janeiro - RJ – Brazil; e-mail: pauloafonsolopes@uol.com.br.

RESUMO. A exposição materna de roedores a agroquímicos durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento deles. Consequentemente, a avaliação dos possíveis efeitos da exposição aos agroquímicos é importante de ser realizada em diferentes períodos de desenvolvimento, especialmente naqueles considerados críticos devido a possível influência no sistema nervoso. Para tanto, deve-se identificar bioindicadores que busquem estabelecer uma relação entre a exposição ocorrida e os efeitos na saúde, bem como observar a possível influência de fatores intercorrentes à avaliação experimental que possam ocasionar vieses nos resultados obtidos. A avaliação crítica dos indicadores e dos resultados decorrentes de seu uso exercem papel preponderante no aprimoramento da avaliação perinatal e na implementação de políticas que minimizem os possíveis riscos a que os organismos jovens estão expostos.

o que proporciona otimizar a detecção de possíveis efeitos relacionados à exposição aos agroquímicos (Reuter et al., 2003).

2.- Material e métodos

2.1 Baterias de testes de neurotoxicidade

Não obstante existam inúmeros estudos sobre os efeitos neurocomportamentais obtidos por meio de testes experimentais, são relativamente poucas as análises que enfatizam a perspectiva da incorporação e do impacto desta informação nos processos pertinentes às decisões políticas sobre programas e ações de saúde.

A realização de protocolos experimentais em animais de laboratório, como por exemplo a FOB (*Functional Observational Battery*) (Moser et al., 2004) tem-se mostrado útil na avaliação da neurotoxicidade (Luft e Bode, 2002). Os estudos com animais podem, assim, auxiliar no entendimento dos efeitos neurocomportamentais decorrentes da exposição aos agroquímicos. Os estudos neurotoxicológicos dessas baterias experimentais em animais incluem avaliações preliminares (*screening*), que se constituem por bateria de observação funcional, quando são avaliados reflexos e algumas reações como salvação, piloereção etc., bem como a medida automatizada da atividade motora. Além dos testes descritos podem ser conduzidas avaliações do desenvolvimento cognitivo (aprendizado e memória) (Sarter, 2004). Assim, para o estudo da neurotoxicidade podem ser utilizados biomarcadores de efeito. Esta determinação deve estabelecer a relação entre a exposição e o efeito tóxico refletida em alterações pré-clínicas e agravos à saúde. A importância do uso destes biomarcadores como parâmetros biológicos de exposição às substâncias químicas deve-se ao fato de eles estarem diretamente relacionados aos efeitos na saúde e que, ao exporem os problemas e suas causas, tornam-se úteis para alcançar os objetivos das políticas referentes à saúde.

2.2 Avaliação crítica das respostas aos indicadores biológicos obtidas experimentalmente

A contribuição de um indicador biológico à avaliação da saúde ambiental é ditada em última análise por sua

1.- Introdução

A observação da presença ou ausência dos parâmetros de desenvolvimento físico e neurocomportamental é realizada de acordo com a idade do filhote e por determinado número de dias consecutivos até o aparecimento, ou não, do parâmetro estudado em todos os filhotes avaliados. São anotados, por filhote, os dias respectivos em que ocorrerem, por exemplo, abertura do ouvido externo, aparecimento de pelo, erupção dos dentes incisivos, abertura de vagina, descolamento de orelha, abertura dos olhos ou descida dos testículos.

Alguns dos testes de desenvolvimento neurocomportamental (Castro et al., 2007; Li, 2005) que podem ser utilizados a fim de avaliar atividade, coordenação, reflexos, por exemplo, são os seguintes: reflexo de endireitamento, atividade motora em um campo aberto, geotaxia negativa e atividade em um rotarod.

Tem-se procurado melhorar os protocolos experimentais disponíveis e adicionar alvos de estudo que possam fornecer uma melhor caracterização dos efeitos da exposição a agentes químicos (Lima, 2003). A evolução dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal tem estimulado a melhora dos protocolos de avaliação de neurotoxicidade,

validade como marcador. Entre os critérios para a validação dos indicadores incluem-se a compreensão de suas relevâncias temporal e biológica, cinética, variabilidade e efeito dose-resposta no organismo exposto não-alvo, além de fatores interferentes que possam afetar os resultados obtidos e consequentemente gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Outros fatores a serem considerados na validação de um indicador são os de caráter ético, social e legal.

Com base nos conceitos apresentados, pode-se concluir que a utilização dos indicadores pressupõe determinar o que medir e seu referencial numérico, para sua comparação, enquanto medidas qualitativas e quantitativas. As medidas quantitativas são mais precisas e mais versáteis para transformações que as qualitativas. Em consequência, o tipo de variável utilizado condiciona as oportunidades de análise (Tyl et al., 2008). Outro aspecto importante é definir fatores de comparabilidade, ou seja, verificar se os perfis utilizados no estudo são os mesmos antes de iniciar a avaliação. Dessa maneira, podem ser comparados os resultados obtidos com o mesmo delineamento experimental.

Devido ao fato de que os testes para avaliação de neurotoxicidade por vezes não serem específicos e relacionados a um determinado toxicante, os mais importantes critérios selecionados para sua avaliação e controle da qualidade dos dados obtidos experimentalmente em um laboratório são a obtenção de efeito dose-resposta e a variabilidade da resposta. O planejamento dos testes e a interpretação dos dados obtidos nas avaliações comportamentais realizadas devem, obrigatoriamente, considerar aspectos relacionados ao desenho experimental e ao método utilizado, à validação dos testes, ao controle de fatores intercorrentes, à variabilidade e à análise dos dados (Slikker et al., 2005).

No caso de dados experimentais com variabilidade elevada, pode não ser detectada a diferença entre os tratamentos, quando, na verdade, estas diferenças existem em virtude da heterogeneidade do material experimental ou do método empregado. A fim de lidar com essa variabilidade considerada elevada, deve-se considerar uma forma de delineamento em que a variação entre indivíduos é minimizada de modo a evidenciar a possível significância estatística dos efeitos de interesse para o estudo (Haseman et al., 2001).

Quando os dados registrados encontram-se dentro dos limites de controle e a variabilidade dos resultados individuais permanece estável, um processo pode ser considerado confiável. Para avaliar a conformidade dos ensaios, deve-se conhecer o processo de análise; obter a fidelidade dos dados coletados representados pelos controles e estabelecer critérios para verificar se as alterações observadas são causadas por variações inerentes ao processo, se permanecerão estáveis ao longo do tempo ou se ocorrem ocasionalmente.

Para o cálculo da variabilidade dos resultados é necessária a utilização de uma estatística que indique o desvio máximo que um resultado apresenta relativamente ao seu valor médio. A média é apenas uma medida de

representatividade de todos os valores, mas sua utilização não tem significado sem o acompanhamento de uma medida da variabilidade dos dados. Desse modo, além do controle da média entre determinados limites, torna-se necessário também controlar a variabilidade dos dados em cada uma das metodologias utilizados nos processos laboratoriais. Para esses controles, sugere-se utilizar, de modo conjunto, os gráficos da média e os do desvio-padrão. O cálculo dos limites deste último, nos dias de hoje, são facilitados pelos recursos computacionais existentes, o que desaconselha o uso da amplitude como medida de variabilidade.

A manutenção dos controles da rastreabilidade do organismo teste e das condições experimentais por meio de formulários padronizados facilita a comparação retrospectiva de um mesmo ensaio em diferentes épocas, permitindo analisar a variabilidade da resposta observada nos grupos controle em experimentos semelhantes, padronizados e realizados no mesmo laboratório (Festing e Altman, 2002). A distribuição estatística que modela os resultados gerados ao longo do tempo pode ser então usada para aprimorar o estudo dos indicadores biológicos. Para tanto, é necessário definir regras de não-rejeição (aceitação) e rejeição dos dados por meio dos limites dos gráficos de controle.

Os indicadores devem ajudar a estabelecer a relação entre o aumento da resposta e o aumento da dose de exposição, admitindo-se a distribuição de Gauss (conhecida como distribuição normal) como modelo da frequência da sensibilidade dos animais em uma população, ou seja, em pequenas doses a sensibilidade é pequena, aumentando essas doses alcança-se um máximo e, continuando-se o aumento, a curva começa a declinar. O grupo de animais com maior heterogeneidade (ausência de resposta e sensibilidade com mudança na dose) apresentam uma curva platicúrtica.

2.3 Análise dos fatores intercorrentes

Vários fatores podem afetar o resultado experimental (Aldridge et al., 2003) e, dentre eles, destacam-se os procedimentos de manipulação e lote dos animais (número e data) que permitem assim a identificação e rastreabilidade dos animais além dos controles ambiental e dos insumos utilizados nos testes (qualidade de ração, maravalha e material descartável), o peso, a idade, o consumo de água e alimento, a bioquímica clínica, entre outros. A influência desses fatores na resposta da variável inicialmente estabelecida para observação durante o experimento com animais deve ser registrada no planejamento experimental para aumentar a precisão dos dados obtidos (Das, 2002). Em relação aos testes com animais deve-se, desse modo, atentar especialmente aos parâmetros referentes ao número de animais a ser utilizado devido à variabilidade da população quanto à resposta observada e ao significado biológico das alterações observadas, as doses a serem testadas geralmente estabelecidas entre aquelas que não ocasionam efeitos e aquelas que produzem o efeito tóxico estudado (dose-resposta), além da idade e em consequência

do estágio do desenvolvimento do animal-teste, o que interferirá na probabilidade de ocorrer um efeito tóxico.

Embora aparentemente de menor importância, é fundamental para a análise estatística posterior o correto e preciso preenchimento de formulários padronizados de controle dessas variáveis.

3.- Resultados

3.1 Critérios quanto à variabilidade dos resultados

A sensibilidade de um teste refere-se à habilidade desse teste em detectar alterações na resposta que está sendo avaliada, de preferência em doses abaixo daquela que produza sinais evidentes de toxicidade do agente em estudo.

Por outro lado, as respostas biológicas comportamentais podem apresentar grande variabilidade de resposta.

A avaliação de um teste comportamental, quanto a sua capacidade em detectar um dano tóxico que exceda os limites da flutuação dos valores normalmente encontrada no desempenho dos organismos testes, pode ser realizada por meio do coeficiente de variação (CV) definido como, $CV \text{ (em \%)} = (\text{Desvio Padrão}/\text{média}) \times 100\%$. Um CV de valor moderado (18-40%) pode ser um indicador de que a resposta à medida do teste comportamental é relativamente sensível ao efeito tóxico. O CV também permite comparações quanto à sensibilidade de testes que avaliem respostas ou funções similares entre si (Buelke-Sam et al., 1985).

De modo geral, a fim de verificar a precisão analítica intra ou interlaboratorial por meio do coeficiente de variação, um método ecotoxicológico é considerado adequado quando a variação dos resultados expressa pelo CV é igual ou menor que 30% (Environment Canadá, 1990).

No entanto, o CV mostra-se adequado apenas para comparação da variabilidade das amostras, independentemente do tempo das observações. Como o cálculo do CV é estático, e muitas vezes os efeitos dos toxicantes são estudados durante vários dias, ele não mostra as modificações reais. Assim, médias e desvios-padrão (DP) de resultados diferentes podem ter o mesmo CV, o que não reflete a verdade. Por esta razão, é proposta uma nova abordagem para a interpretação dos resultados do experimento comportamental, utilizando-se uma metodologia com uma regra de decisão para o que pode ser considerado aceitável para o comportamento apresentado pelos ratos e, em consequência, se uma experiência necessita ou não ser refeita.

Os passos são os seguintes:

-Passo 1. Observar o roedor de acordo com as características desejadas, e registrar os resultados.

-Passo 2 Calcular, para cada característica, os limites de controle tanto para as observações individuais quanto para as da ninhada.

-Passo 3. Determinar a quantidade de roedores, individualmente e por ninhada, que estão fora dos limites do controle (significando que não foram afetados por

fatores intercorrentes), e calcular as respectivas percentagens em relação ao total de roedores.

-Passo 4. Repetir o experimento se o percentual encontrado for superior a 5% em ambas as situações. Caso contrário, ir ao Passo 5.

-Passo 5. Fazer uma análise de variância (ANOVA) para verificar a igualdade das médias obtidas no experimento se a percentagem for inferior a 5 (cinco)% em uma ou em ambas as situações. Se a hipótese de nulidade for aceita, parar. Caso contrário, ir ao Passo 6.

-Passo 6. Fazer o teste de Tukey para identificar os comportamentos não homogêneos.

-Passo 7. Com base nos conjuntos não homogêneos, identificar a causa da diferença de comportamento das ninhadas.

4.- Discussão

A utilização de um protocolo experimental contendo índices relacionados à reprodução e ao desenvolvimento animal auxilia na identificação precoce das conseqüências causadas pela exposição a poluentes ambientais. Nesse sentido, o aprimoramento do estudo de efeitos sutis por meio de novas baterias de testes experimentais com o estudo de indicadores mais específicos mostrou ser mais objetiva que a abordagem tradicional da avaliação da exposição a agroquímicos. O compartilhamento dessas informações é importante para o aprimoramento da avaliação perinatal, com reflexos para viabilizar a implementação de políticas que minimizem os possíveis riscos a que os organismos jovens estão expostos, bem como àquelas que visem a sustentabilidade ambiental.

A fim de reduzir a incerteza das estimativas realizadas quanto à exposição a esses produtos e com isso proteger adequadamente as crianças, devem ser verificadas as diferenças cinéticas de um agroquímico em jovens e em adultos para identificar a sua influência quanto à exposição desses produtos em crianças, realizada investigação apropriada para sustentar o uso seguro dos compostos em relação aos hábitos da população infantil (Pennycook et al., 2004); aprimorada a avaliação de parâmetros de desenvolvimento pré e pós-natal; promovido o estudo de biomarcadores mais específicos e de avanços na ecogenética através do estudo da interação gene-ambiente-saúde (Hubal et al., 2000) além de estudada a utilização de biomarcadores em estudos de exposição simultânea a dois ou mais agroquímicos e em estudos da influência de fatores bióticos e abióticos. Os critérios científicos que envolvem a contínua criação e descoberta de novos procedimentos laboratoriais e delineamentos experimentais, bem como a análise estatística dos resultados, são fundamentais para melhores tomadas de decisão por parte não somente dos implementadores de políticas, mas também pelos pesquisadores da área.

validade como marcador. Entre os critérios para a validação dos indicadores incluem-se a compreensão de suas relevâncias temporal e biológica, cinética, variabilidade e efeito dose-resposta no organismo exposto não-alvo, além de fatores interferentes que possam afetar os resultados obtidos e conseqüentemente gerar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Outros fatores a serem considerados na validação de um indicador são os de caráter ético, social e legal.

Com base nos conceitos apresentados, pode-se concluir que a utilização dos indicadores pressupõe determinar o que medir e seu referencial numérico, para sua comparação, enquanto medidas qualitativas e quantitativas. As medidas quantitativas são mais precisas e mais versáteis para transformações que as qualitativas. Em conseqüência, o tipo de variável utilizado condiciona as oportunidades de análise (Tyl et al., 2008). Outro aspecto importante é definir fatores de comparabilidade, ou seja, verificar se os perfis utilizados no estudo são os mesmos antes de iniciar a avaliação. Dessa maneira, podem ser comparados os resultados obtidos com o mesmo delineamento experimental.

Devido ao fato de que os testes para avaliação de neurotoxicidade por vezes não serem específicos e relacionados a um determinado toxicante, os mais importantes critérios selecionados para sua avaliação e controle da qualidade dos dados obtidos experimentalmente em um laboratório são a obtenção de efeito dose-resposta e a variabilidade da resposta. O planejamento dos testes e a interpretação dos dados obtidos nas avaliações comportamentais realizadas devem, obrigatoriamente, considerar aspectos relacionados ao desenho experimental e ao método utilizado, à validação dos testes, ao controle de fatores intercorrentes, à variabilidade e à análise dos dados (Slikker et al., 2005).

No caso de dados experimentais com variabilidade elevada, pode não ser detectada a diferença entre os tratamentos, quando, na verdade, estas diferenças existem em virtude da heterogeneidade do material experimental ou do método empregado. A fim de lidar com essa variabilidade considerada elevada, deve-se considerar uma forma de delineamento em que a variação entre indivíduos é minimizada de modo a evidenciar a possível significância estatística dos efeitos de interesse para o estudo (Haseman et al., 2001).

Quando os dados registrados encontram-se dentro dos limites de controle e a variabilidade dos resultados individuais permanece estável, um processo pode ser considerado confiável. Para avaliar a conformidade dos ensaios, deve-se conhecer o processo de análise; obter a fidelidade dos dados coletados representados pelos controles e estabelecer critérios para verificar se as alterações observadas são causadas por variações inerentes ao processo, se permanecerão estáveis ao longo do tempo ou se ocorrem ocasionalmente.

Para o cálculo da variabilidade dos resultados é necessária a utilização de uma estatística que indique o desvio máximo que um resultado apresenta relativamente ao seu valor médio. A média é apenas uma medida de

representatividade de todos os valores, mas sua utilização não tem significado sem o acompanhamento de uma medida da variabilidade dos dados. Desse modo, além do controle da média entre determinados limites, torna-se necessário também controlar a variabilidade dos dados em cada uma das metodologias utilizados nos processos laboratoriais. Para esses controles, sugere-se utilizar, de modo conjunto, os gráficos da média e os do desvio-padrão. O cálculo dos limites deste último, nos dias de hoje, são facilitados pelos recursos computacionais existentes, o que desaconselha o uso da amplitude como medida de variabilidade.

A manutenção dos controles da rastreabilidade do organismo teste e das condições experimentais por meio de formulários padronizados facilita a comparação retrospectiva de um mesmo ensaio em diferentes épocas, permitindo analisar a variabilidade da resposta observada nos grupos controle em experimentos semelhantes, padronizados e realizados no mesmo laboratório (Festing e Altman, 2002). A distribuição estatística que modela os resultados gerados ao longo do tempo pode ser então usada para aprimorar o estudo dos indicadores biológicos. Para tanto, é necessário definir regras de não-rejeição (aceitação) e rejeição dos dados por meio dos limites dos gráficos de controle.

Os indicadores devem ajudar a estabelecer a relação entre o aumento da resposta e o aumento da dose de exposição, admitindo-se a distribuição de Gauss (conhecida como distribuição normal) como modelo da frequência da sensibilidade dos animais em uma população, ou seja, em pequenas doses a sensibilidade é pequena, aumentando essas doses alcança-se um máximo e, continuando-se o aumento, a curva começa a declinar. O grupo de animais com maior heterogeneidade (ausência de resposta e sensibilidade com mudança na dose) apresentam uma curva platicúrtica.

2.3 Análise dos fatores intercorrentes

Vários fatores podem afetar o resultado experimental (Aldridge et al., 2003) e, dentre eles, destacam-se os procedimentos de manipulação e lote dos animais (número e data) que permitem assim a identificação e rastreabilidade dos animais além dos controles ambiental e dos insumos utilizados nos testes (qualidade de ração, maravalha e material descartável), o peso, a idade, o consumo de água e alimento, a bioquímica clínica, entre outros. A influência desses fatores na resposta da variável inicialmente estabelecida para observação durante o experimento com animais deve ser registrada no planejamento experimental para aumentar a precisão dos dados obtidos (Das, 2002). Em relação aos testes com animais deve-se, desse modo, atentar especialmente aos parâmetros referentes ao número de animais a ser utilizado devido à variabilidade da população quanto à resposta observada e ao significado biológico das alterações observadas, as doses a serem testadas geralmente estabelecidas entre aquelas que não ocasionam efeitos e aquelas que produzem o efeito tóxico estudado (dose-resposta), além da idade e em conseqüência