CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS A RESPEITO DA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO ANIMAL

VERA LÚCIA S.S. DE CASTRO*

O uso de agroquímicos pode gerar problemas dentro da área de toxicologia. Estas substâncias em contato com fêmeas gestantes podem causar atraso no desenvolvimento físico ou mesmo mental dos filhotes. Contudo, nem sempre há informações precisas a respeito de tais danos. A prevenção de efeitos mutagênicos ou embriofetotóxicos depende muitas vezes de testes laboratoriais que podem evidenciar através da pesquisa o que nem sempre torna-se claro no exame clínico. Assim, o estudo destas substâncias através de metodologia cada vez mais sensível torna-se importante para avaliação correta dos danos às populações expostas.

1 INTRODUÇÃO

A questão ambiental requer nova percepção através da conscientização do interrelacionamento e da interdependência de fenômenos físicos, biológicos e

* PhD, Veterinária, Pesquisadora III do Laboratório de Toxicologia, EMBRAPA/CNPMA, Jaguariúna-SP

sociais, que formam níveis de complexidade integrados. Considerando-se que muitas vezes ocorre a presença de baixos níveis de um ou mais agroquímicos no ambiente, mas que permitem a exposição do indivíduo constantemente; as classificações de formulações baseadas apenas em testes agudos (faixas coloridas no rótulo dos produtos de acordo com sua classe toxicológica), tornam-se desfocadas neste contexto. De forma análoga, a idéia da falta de riscos apreciáveis à saúde embutida nos índices toxicológicos atualmente utilizados poderá ser revista a luz de novas técnicas.

Os agroquímicos, quando aplicados, distribuem-se no ambiente em sua forma original ou na forma de metabólitos e podem penetrar no organismo animal por diversas vias de exposição. Quando os pesticidas são dispersos no ambiente, as populações das áreas próximas serão possivelmente expostas por inalação de gases ou partículas (via respiratória), ingestão de água ou comida contaminada (via oral) ou absorção pela pele (via cutânea).

A exposição prolongada a pequenos níveis de agroquímicos em adultos pode induzir alterações no sistema nervoso; porém muitas vezes as alterações do humor são confundidas com síndromes neuróticas e/ou neurológicas e principalmente com alcoolismo. Assim, alterações brandas de comportamento podem indicar sinais precoces de intoxicação, ou seja, de ruptura psicofisiológica seguinte a exposição. Há relatos de ocorrência de seqüelas neurais persistentes

em seres humanos expostos a algumas destas substâncias como os organoclorados.

2 TESTES NEUROCOMPORTAMENTAIS

Em saúde ocupacional os testes neurocomportamentais podem ser utilizados para avaliar a extensão do dano provocado por determinada exposição. Estes testes devem ser sensíveis o suficiente para detectar alterações funcionais precoces ou sutis.

Algumas baterias de testes para estudo de efeitos neurotóxicos vêm sendo propostas em animais de laboratório e também para seres humanos. Em cada uma das baterias propostas para animais, os testes sugeridos podem variar desde a observação do animal na gaiola até testes manipulativos complexos. É importante estabelecer a redundância, a especificidade, a sensibilidade e a factibilidade de tais testes. Muitas das baterias mostram-se úteis na avaliação de diversos agentes neurotóxicos, principalmente quando a exposição é aguda. Porém, sua adequação deve ser sempre reassegurada com a introdução de novas técnicas e informações (MOSER, 1989).

Cada metodologia proposta ao ser avaliada entre diversos laboratórios indicará a similaridade dos dados obtidos quanto a detecção da dose que produz determinado efeito e dados dos grupos controles. Um método será mais sensível quanto maior for sua capacidade de detectar possíveis efeitos em uma magnitude de resposta constatada

facilmente em relação ao controle e dentro do delineamento experimental utilizado (KIMEL e BUELKE-SAM, 1985). De maneira análoga, os testes de uma bateria de estudo neurocomportamental para ser aplicada em nível de campo deve ser sensível o suficiente para revelar prejuízos funcionais em fases precoces da injúria, devido a exposição ao tóxico. Entretanto, os testes neuropsicológicos clássicos muitas vezes só detectam lesões grosseiras. Além disso, há dificuldades na constatação de perdas no desempenho neurocomportamental em decorrência da exposição em níveis subclínicos, devido ao grande número de interferentes como alcoolismo, nível educacional, idade, etc. Porém, desde que nem todas as baterias de testes atualmente disponíveis para este fim são passíveis de serem utilizadas qualquer que seja a situação da exposição, é improvável que uma única bateria seja capaz de cobrir toda a gama de possíveis danos funcionais. É importante, entretanto, que forneça dados para investigações mais detalhadas (WILLIAMSON, 1990).

Como o etanol, também outras drogas de abuso, os anti-convulsivantes, alguns fármacos e alguns agroquímicos foram investigados quanto a sua teratologia comportamental. Esta pesquisa revela dados que sugerem princípios para identificação da ação teratogênica ou não de uma droga. A detecção de tais efeitos em seres humanos é limitada. Desta forma os modelos com animais, desde que apropriados à extrapolação de dados, tornam-se importantes para determinar o risco potencial em populações humanas. A falta

de informação nesse sentido pode levar a enganos na avaliação dos prejuízos decorrentes do uso de diversas substâncias.

O estudo de determinada substância química e seu potencial de causar danos a organismos vivos envolve a avaliação e a integração dos dados de diversas categorias de observações. Assim são utilizados diferentes testes com microorganismos, células eucarióticas e mamíferos, por exemplo, na tentativa de obter-se dados imparciais dos efeitos das substâncias em estudo, uma vez que vários fatores interagem nos mamíferos provocando diferentes danos, que podem estar presentes quando da exposição a várias dosagens de agroquímicos.

A metodologia empregada deve ser sensível para revelar os efeitos tóxicos da substância testada. A magnitude dos índices utilizados, normalmente como a ingestão diária aceitável (IDA) ou "no observed effect level" (NOEL), etc, depende de espécie, tipo de patologia, tamanho da amostra, rota de exposição e sua duração, idade e tempo de observação. Assim, o emprego de métodos cada vez mais sensíveis podem detectar outros prejuízos não observados anteriormente e alterar a magnitude destes índices.

Alterações funcionais, mesmo que não evidenciadas de maneira contundente, devem ser consideradas como relevantes a fim de se evitar o comprometimento dos organismos expostos. O comportamento e o desenvolvimento físico do animal são interdependentes. As funções mais complexas são, em geral, mais facilmente prejudicadas que as mais simples

e portanto básicas para a sobrevivência do animal (JOY, 1982). Estes testes podem medir a reversibilidade do insulto tóxico e revelar prejuízos tardios e/ou progressivos.

Alguns teratógenos contribuem para a incidência geral de desordens comportamentais em humanos. A descoberta destes efeitos depende muitas vezes diretamente dos testes destas substâncias feitos com animais. Quando descoberta uma substância como agente etiológico, deve-se estabelecer programas de vigilância sanitária através de estudos epidemiológicos.

Pode-se conceituar maturidade como o produto funcional final de uma série progressiva de processos de desenvolvimento. Como tal, a manifestação do comportamento expressando a capacidade dinâmica e integrativa do organismo parece ser bom indicador do desenvolvimento animal (BUELKE-SAM e KIMMEL, 1979). A resposta do sistema nervoso central (SNC) deve ser encarada como ruptura da integridade psicofisiológica decorrente da exposição, que as estruturas centrais registram e manifestam como prejuízo de funções cognitivas ou alterações emocionais (ELSNER, 1983).

Numerosos estudos utilizando roedores demonstram que a experiência prévia influencia o desenvolvimento comportamental de neonatos e animais jovens. A individualidade da mãe e a sua interação com a ninhada, contribuem para os padrões comportamentais da prole. Esse processo de transmissão de características de geração é

denominado de transmissão cultural. A mãe pode assim influenciar a velocidade de maturação dos filhotes por intermédio da organização seqüencial da manipulação da ninhada, mais que pela quantidade desta manipulação (FRANKOVÁ, 1985).

Determinadas interações com o meio são cruciais para o funcionamento normal posterior do indivíduo. Às vezes, a exposição à substâncias e experiências que ocorrem nesse período levam a alterações só observáveis tardiamente. De forma análoga, alguns dados clínicos e epidemiológicos mostram danos à crianças através da exposição, por exemplo, a metais pesados, agroquímicos, etc, uma vez que o organismo é mais vulnerável a certos fatores adversos durante o período de desenvolvimento.

As considerações metodológicas em qualquer investigação experimental de disfunção pós-natal devem incluir entre outras variáveis associadas, a exposição pré-natal ao agente, os fatores ambientais, as características do agente tóxico, os aspectos farmacocinéticos e o estágio de desenvolvimento do organismo na ocasião da exposição.

Os aspectos cognitivos do comportamento (informação sensorial e seu ajuste às contingências ambientais) têm sido mais abordados do que os aspectos emocionais propriamente ditos, apesar da grande quantidade de descrições na literatura de estados emocionais como depressão, fadiga, irritabilidade, etc, causados por diversos tóxicos. Estes não são de fácil mensuração, mas são importantes pelo significado como sinais precoces de

intoxicação. Apesar das limitações, pode-se utilizar alguns procedimentos que lidam com estados emocionais como estímulos aversivos, situações conflitantes, etc.

Dependendo de seu estágio de desenvolvimento o animal pode não perceber determinado estímulo ou então percebê-lo, mas não ser capaz de reagir porque seu sistema motor não está suficientemente desenvolvido (ALDER, 1983). Conseqüentemente os testes utilizados para avaliação devem estar de acordo com a idade do animal.

O poder discriminatório de uma análise aumenta em função da extensão e série de itens examinados. Para o estabelecimento de avaliação ampla, deve-se definir que tipo de informação deseja-se da bateria de testes. De forma geral, a bateria deve visar três elementos principais: a análise da capacidade integrativa do organismo, a avaliação dos limites de exposição aos agentes e a identificação da teratogenia.

Na avaliação pós-natal freqüentemente é observada de acordo com a idade do filhote, a presença ou ausência dos parâmetros relacionados a seguir:

• Características morfológicas e físicas

A partir desta categoria de avaliação pode-se estabelecer os períodos (dias de vida do rato), nos quais são observados detalhes dos parâmetros de desenvolvimento do animal como, aparecimento de pelo, abertura dos ouvidos e olhos, erupção do dente incisivo, etc. Assim, pode-se

identificar alterações (atraso ou adiantamento) no padrão de desenvolvimento animal.

• Crescimento

É observado geralmente o ganho de peso, como índice geral de saúde.

• Reflexos específicos, respostas e capacidade sensorio-motora

São observados diversos reflexos como os de endireitamento, corneal, orientação, agarrar, pinçamento pela cauda, as respostas de sobressalto, subir, etc. A resposta a este tipo de teste pode ser usada não somente para testar como as drogas modulam o reflexo per se, mas também para verificar como elas afetam o desenvolvimento e/ou a expressão dos tipos de plasticidade inata ou aprendida (DAVIS, 1980). A seguir descreve-se sucintamente como alguns destes testes são efetuados:

* **reflexo de endireitamento:** o animal é colocado sobre a mesa, em decúbito dorsal. Mede-se o tempo gasto para que volte à posição anterior, ou seja, apoiado sobre as quatro patas;

* **repota de sobressalto:** o animal é exposto a um som estridente e súbito, próximo a sua orelha, visando-se

observar se o animal responde com sobressalto a este estímulo;

* **resposta de agarrar:** o animal é colocado somente com as patas dianteiras em um cilindro de superfície lisa, de 5 (cinco) centímetros de diâmetro e de altura superior à do seu corpo para verificar se o mesmo agarra-se ao cilindro ou cai na mesa;

* **resposta de subir:** o animal é colocado em uma plataforma cuja superfície é feita com malha fina de arame e que tem inclinação de 45°. Mede-se o tempo e a distância que o animal sobe durante no máximo 3 (três) minutos.

• Níveis de atividade

Os níveis de atividade são avaliados através de medidas de hipo ou hiperatividade em diversas idades, e em situações experimentais como roda de atividade, caixa de atividade, campo aberto, "hole-board", etc. Estas representam uma situação nova para os animais, que apresentam então comportamento exploratório. Este comportamento envolve a assimilação de informações quanto à forma dos objetos e quanto à sua disposição espacial. É necessária interação entre os dados sensoriais e o repertório de movimentos para identificar a seqüência de lugares à medida que o animal desloca-se em seu ambiente.

• Habilidade neuromuscular

A habilidade neuromuscular é avaliada através de testes de coordenação, força, velocidade, agilidade, modo de andar (marcha), nadar, etc. A realização destas tarefas requer coordenação cerebral e integração de reflexos.

• Capacidade de aprendizagem

Os testes compreendem aprendizagem, memória e retenção, através de condicionamento clássico e comportamento operante. Muitas formas primitivas de aprendizado aparecem muito cedo na ontogênese do rato. Por exemplo, a esquiva passiva em sua expressão primitiva, como movimentos para evitar evento aversivo, é estabelecida nas primeiras horas pós-natais (KÖLLNER et al, 1988). O aumento da aquisição no processo de aprendizagem se dá entre a 3ª e a 5ª semana de vida, e reflete o enriquecimento do repertório comportamental, o qual depende da maturação da atividade do SNC.

• Parâmetros sexuais

Estabelece o desenvolvimento sexual, a eficiência reprodutiva, o comportamento maternal, a taxa de fertilidade, etc. Alterações nestes parâmetros estão

relacionadas a interferências com sistemas neurohumorais ou efeitos tóxicos, por exemplo intra-uterino (morte e reabsorção do embrião com conseqüente diminuição da taxa de fertilidade).

No Brasil, alguns desses testes vêm sendo realizados por diferentes grupos de trabalho a título de pesquisa, além daqueles arrolados na portaria normativa nº 242 de 22 de dezembro de 1994, necessários à avaliação toxicológica para registro e comercialização de agentes químicos.

Os testes propostos para avaliação da capacidade mutagênica, teratogênica e de produção de alterações fisiológicas no desenvolvimento animal são, de acordo com esta portaria:

- Avaliação do potencial mutagênico em microrganismo;
- Avaliação do potencial mutagênico em células eucarióticas;
- Avaliação do potencial mutagênico em ratos (teste do letal dominante);
- Avaliação da toxicidade embrio-fetal (testes de desenvolvimento físico e neuromotor e índices sexuais).

A avaliação do potencial embriofetotóxico do agente, no que se refere ao desenvolvimento animal, é geralmente feita registrando-se os dias em que se observam pela primeira vez alguns parâmetros físicos e também os dias em que são observados os reflexos característicos da espécie

em estudo. Os dados consistem na observação do 1º dia que os animais por exemplo abriram o olho. Entretanto algumas técnicas estatísticas provêem maior número e maior precisão de informações que as técnicas normalmente empregadas. Estas técnicas, chamadas inicialmente de análise de sobrevivência são comuns em disciplinas como epidemiologia e são implementadas por programas estatísticos como SAS, BMDP, SYSTAT, S-plus. Questões que envolvem a análise do impacto do ambiente, às diferentes espécies testadas ou diferenças individuais (tamanho, sexo, etc) em toxicologia, podem ser respondidas estatisticamente pela construção de um modelo que expresse como o tempo é influenciado por vários fatores para o aparecimento do parâmetro observado. Estes programas permitem a descrição dos parâmetros em todos os períodos do experimento e não somente em um dia (DIXON e NEWMAN, 1991). Assim é que os protocolos de avaliação de embriofetotoxicidade adotados devem conter uma bateria detalhada de testes quanto ao desenvolvimento físico, neuromotor, sensorial e comportamental, além de testes estatísticos mais aprimorados, no sentido de tornar cada vez mais sensíveis a avaliação dos agroquímicos quanto ao surgimento de possíveis efeitos perinatais danosos. Tais baterias são reprodutíveis e consistentes conforme sugere o trabalho efetuado pelo Middle Atlantic Reproduction And Teratology Association (MARTA), no qual diversos laboratórios realizaram avaliações laboratoriais dentro do programa de boas práticas laboratoriais. A comparação realizada mostrou alto índice de similaridade de

todologia entre os laboratórios, incluindo testes não só reflexos ou de desenvolvimento físico mas também de rendimento e memória (LOCHRY et al, 1994).

CONCLUSÃO

Estes testes além de serem sensíveis e reprodutíveis, permitem o uso de menor número de animais para o estabelecimento de valores de referência ligados a alterações funcionais que, em geral, precedem lesões estruturais. Especificamente, a simplicidade deste tipo de metodologia faz com que tais testes sejam ferramentas valiosas e sugestivas para avaliação toxicológica moderna de diversas substâncias como os agroquímicos. Resta portanto, a incumbência de aprimorar cada vez mais os testes realizados para detecção de eventuais efeitos nocivos ao desenvolvimento animal.

Abstract

The use of agrochemicals may produce some problems in the toxicological field. These chemicals, when in contact with pregnant females, can result in a delayed physical and mental litter development. However, there are no clear information about these effects. The prevention of agenic and embryo or fetus toxic damage depends on laboratory tests that can show alterations not observed in a clinic examination. In this way, the study of these substances by a sensitive methodology becomes important to make a correct evaluation of the possible injuries to the exposed populations.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q., RACAGNI, G., CUOMO, V., MEISS, B. Application of behavioral pharmacology in toxicology. New York : Raven Press, 1983. p. 57-66
- 2 BUELKE-SAM, J., KIMMEZ, C. Development and standardization of screening methods for behavioral teratology. Teratology, v. 20, p. 17-30, 1979.
- 3 DAVIS, M. Neurochemical modulation sensory-motor reactivity: acoustic and tactile startle reflexes. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, v. 4, p. 241-263, 1980.
- 4 DIXON, P.M., NEWMAN, M.C. Analyzing toxicity data using statistical models for time-to-death: an introduction. In: NEWMAN, M.C., MCINTOSH, A. Metal ecotoxicology: concepts & applications. Chelsea : Lewis, 1991, p. 207-242
- 5 ELSNER, J. Systematic information acquisition in behavioral toxicology. In: ZBINDEN, G. et al. Application of behavioral pharmacology in toxicology, New York : Raven Press, 1983.
- 6 FRANKOVÁ, S. Maternal behavior in females of the laboratory rat selected for high and low activity and defecation rates. Activ. Nerv. Sup., v. 27, p. 186-198, 1985.
- 7 JOY, R.M. Mode of action of lindane, dieldrin and related insecticides in the central nervous system. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, v. 4, p. 813-823, 1982.
- 8 KIMMEL, C., BUELKE-SAM, J. Collaborative behavioral teratology study: background and overview. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, v. 7, p. 541-545, 1985.
- 9 KÖLLNER, O., KÖLLNER, U., GÖB, R., KLINGBERG, F. Ontogenetic development of avoidance learning in rats after eye opening. Biomed. Biochem. Acta, v. 47, p. 985-996, 1988.
- 10 LOCHRY, E., JOHNSON, C., WIER, P. Behavioral evaluations in developmental toxicity testing: MARTA survey results. Neurotoxicology and Teratology, v. 16, n. 1, p. 55-63, 1994.

- 11 MOSER, V. Screening approaches to neurotoxicity: a functional observational battery. Journal of the American College of Toxicology, v. 8, n. 1, p. 85-93, 1989.
- 12 WILLIAMSON, A. The development of a neurobehavioral test battery for use in hazard evaluations in occupational settings. Neurotoxicology and Teratology, v. 12, p. 509-514, 1990.