

**AVALIAÇÃO AUDITIVA E CITOGÊNÉTICA DE TRABALHADORES RURAIS DO
PONTAL DO PARANAPANEMA – SP EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E
TABAGISMO, ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO**

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI

**AVALIAÇÃO AUDITIVA E CITOGÉNÉTICA DE TRABALHADORES RURAIS DO
PONTAL DO PARANAPANEMA – SP EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E
TABAGISMO, ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO**

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.

Orientador:
Profa. Dra. Ana Paula Alves Favareto

Coorientador:
Profa. Dra. Patrícia Alexandre Antunes

631.8
T657a

Tomiazzi, Jamile Silveira.

Avaliação auditiva e citogenética de trabalhadores rurais do pontal do paranapanema – sp expostos a agroquímicos e tabagismo, isolados ou em combinação / Jamile Silveira Tomiazzi. – Presidente Prudente, 2017.

117 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) -Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Ana Paula Alves Favareto.

1. Agroquímicos. 2. Genotoxicidade. 3. Micronúcleo. 4. Perda auditiva. 5. Tabagismo. I. Título.

JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI

**AVALIAÇÃO AUDITIVA E CITOGENÉTICA DE TRABALHADORES RURAIS DO
PONTAL DO PARANAPANEMA – SP EXPOSTOS A AGROQUÍMICOS E
TABAGISMO, ISOLADOS OU EM COMBINAÇÃO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade
do Oeste Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre - Área de Concentração: Meio
Ambiente e Desenvolvimento Regional

Presidente Prudente, 27 de Março de
2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Alves Favareto - Orientadora
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Alves Corazza
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Prof^a. Dr^a. Renata Calciolari Rossi e Silva
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Aos companheiros de trabalho Manoel e Regiane, e a todos os trabalhadores que participaram do estudo, que mesmo diante das dificuldades no dia a dia reservaram um tempo em suas vidas e em sua árdua jornada de trabalho para acreditarem em nosso trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido realizar mais uma etapa de minha vida, ajudando-me nos momentos difíceis, não me deixando desanimar, me mostrando que as dificuldades fazem parte do trabalho, e servem para nos dar ainda mais força e gratidão naquilo que nos propormos a realizar.

Agradeço aos meus pais, Joel e Jane e minha irmã Janaína por todo amor, confiança, dedicação e orações. Por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, me ajudando dentro daquilo que lhes era possível, e até mesmo no impossível. Amo-os infinitamente.

Ao meu esposo Gabriel Simões, por estar ao meu lado, me apoiando e dando força em todas as minhas decisões. Por não me deixar desistir, acreditando em mim e em minha capacidade. Por me fazer ser uma pessoa melhor e me mostrar o quanto é bom poder compartilhar da vida ao seu lado. Te amo de sempre, pra sempre.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Ana Paula Alves Favareto, por ter aceitado fazer parte dessa difícil e árdua jornada ao meu lado. Você me mostrou que a vontade de ensinar e aprender vai muito além da interdisciplinaridade, vai do coração. Sou eternamente grata a você, e a tudo que fez por mim durante esses anos.

A minha Coorientadora Prof.^a Dra. Patrícia Alexandra Antunes, que me permitiu dar continuidade a um estudo tão maravilhoso e importante cientificamente e na vida desses trabalhadores.

Ao Prof. Dr. Danilo Roberto Pereira, pela importante contribuição com as análises computacionais e atenção oferecida para a realização deste estudo.

A Meire Aparecida Judai Barreto, que além de mestre, se tornou uma amiga, me ajudando chegar até aqui. Obrigada por todo seu apoio, incentivo e amizade. Não teria chego aqui sem você.

A Prof.^a Dra. Cristina Alves Corazza, por seu admirável conhecimento e clareza ao ensinar, pois é visto que quando se faz com o coração tudo se torna especial.

A minha amiga e comadre Camila Cristina Aparecida Silva, por sua amizade sincera e paciente. Você é um anjo que Deus me deu para fazer parte da minha vida desde o primeiro dia. Te amo.

A minha amiga Camila Dias Pinaffi, que antes mesmo de conhecer já admirei só de ver o Lattes. Você foi uma providência de Deus durante esses anos. Uma pessoa admirável, companheira e que se tornou muito especial.

Aos companheiros Manoel e Regiane, por toda ajuda e dedicação para que esse trabalho pudesse ser realizado, me ajudando a levar informações a tantas pessoas.

A todos os participantes do estudo, que se disponibilizaram para a realização dos exames e colaboraram com mais essa etapa.

Ao CEREST/PP por abrir as portas de sua instituição colaborando com o fornecimento do ambulatório de audiologia e toda infraestrutura.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o período de estudos no programa.

Ao MMADRE por todo apoio e conhecimento adquirido. Aos professores, coordenadores, funcionários e colaboradores do programa, meu muito obrigado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”. (José de Alencar).

RESUMO

AValiação Auditiva e Citogenética de Trabalhadores Rurais do Pontal do Paranapanema – SP Expostos a Agroquímicos e Tabagismo, Isolados ou em Combinação

O crescente aumento do uso de agroquímicos por pequenos e grandes produtores rurais tem gerado impactos ambientais e à saúde da população exposta. Outro problema relevante de saúde pública, cujos efeitos adversos têm sido amplamente documentados, é o tabagismo. Estudos têm indicado que a exposição isolada a estes xenobióticos pode levar a ototoxicidade e genotoxicidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis alterações auditivas e citogenéticas de trabalhadores rurais expostos ao tabagismo e aos agroquímicos de maneira isolada ou em combinação e identificar possíveis padrões de classificação dos grupos de exposição. Foram avaliados 127 trabalhadores de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 39 anos, divididos em quatro grupos: Grupo Controle – GC; Grupo exposto ao tabagismo – GT; Grupo exposto a agroquímicos – GA e Grupo exposto à associação entre tabagismo e agroquímicos - GTA. Inicialmente foi aplicado um questionário, para coleta de dados sobre a exposição aos compostos de estudo e saúde geral e auditiva. Em seguida, foram realizados exames auditivos (meatoscopia, audiometria convencional e de alta frequência, logaudiometria e imitânciometria) e avaliação citogenética (a partir de células da mucosa bucal, coradas pelo método Giemsa). Os dados foram avaliados pelos seguintes algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY) e *Support Vector Machine* (SVM). Os resultados da avaliação audiológica demonstraram rebaixamento de limiares auditivos em alta frequência, maior incidência de curva do tipo descendente, timpanometria tipo A e ausência de reflexo do músculo estapédico nos três grupos expostos (GT, GA e GTA). Além disso, nestes grupos foi observado aumento do número total de alterações nucleares e no número de micronúcleos, células binucleadas, cariólise, cariorréxis, células picnóticas e broto nuclear. A análise computacional não reconheceu o grupo GTA como um valor real, como ocorreu com GT e GA em relação ao GC, onde os dados foram distribuídos com padrão e classificadas corretamente. Diante disso, concluiu-se que a exposição a agroquímicos e cigarro, de maneira isolada ou em combinação, demonstrou ser potencialmente ototóxica e genotóxica. No entanto, o uso concomitante dos xenobióticos não levou a efeito aditivo ou de potencialização.

Palavras-chave: Agroquímicos. Aprendizado de Máquinas. Genotoxicidade. Micronúcleo. Perda auditiva. Tabagismo.

ABSTRACT

HEARING AND CITOGENETIC EVALUATION OF RURAL WORKERS FROM PARANAPANEMA PONTAL - SP EXPOSED TO AGROCHEMICALS AND TOBAGISM, ISOLATED OR COMBINED

The growing increase in the use of agrochemicals by small and large rural producers has generated environmental impacts and in the health of the exposed population. Another relevant public health problem, whose adverse effects have been widely documented, is smoking. Studies have indicated that isolate exposure to these xenobiotics can lead to ototoxicity and genotoxicity. Thus, the objective of this study was to evaluate the possible auditory and cytogenetic alterations in rural workers exposed to smoking and agrochemicals in isolation or in combination and to identify possible classification patterns of exposure groups. Were evaluated 127 workers of both sexes, with ages ranging from 18 to 39 years, divided into four groups: Control Group - CG; Group exposed to smoking - GT; Group exposed to agrochemicals - GA and Group exposed to the association between smoking and agrochemicals - GTA. Initially, a questionnaire was used to measure the exposure to the study compounds and general and auditory health. Auditory examinations (meatoscopy, conventional and high-frequency audiometry, logaudiometry and imitanciometry) and cytogenetic evaluation (from cells of the bucal mucosa, stained by Giemsa method) were performed. The data were evaluated by the following pattern recognition algorithms *Artificial Neural Network (ANN)*, *Bayes Classifier (BAY)* and *Support Vector Machine (SVM)*. The results of the audiological evaluation demonstrated a lowering of high frequency thresholds, a higher incidence of descending type, type A tympanometry and absence of reflex of the stapedic muscle in the three exposed groups (GT, GA and GTA). In addition, these groups showed an increase in the total number of nuclear alterations and in the number of micronuclei, binucleate cells, karyotype, karynx, pycnotic cells and nuclear bud. The computational analysis did not recognize the GTA group as a real value, as with GT and GA in relation to GC, in which the data were distributed with standard and correctly classified. Therefore, it was concluded that exposure to agrochemicals and cigarettes, in isolation or in combination, has been shown to be potentially ototoxic and genotoxic. However, the concomitant use of xenobiotics did not lead to additive or potentiating effect.

Keywords: Agrochemicals. Machine Learning. Genotoxicity. Micronucleus. Hearing loss. Smoking.

LISTA DE SIGLAS

ANN	– <i>Artificial Neural Network</i>
ANVISA	–Agência Nacional de vigilância Sanitária
BAY	– <i>Bayes Classifier</i>
CAPES	–Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCE	–Células Ciliadas Externas
CCI	–Células Ciliadas Internas
CFF ^a	–Conselho Federal de Fonoaudiologia
dB	– Decibell
dBNA	– Decibell Nível de Audição
DNA	–Ácido Desoxirribonucleico
DL50	– Dose Letal Mediana 50%
EOA	–Emissões Otoacústicas
EPI	–Equipamento de Proteção Individual
Hz	– <i>Hertz</i>
IBAMA	–Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPRF	–Índice Percentual de Reconhecimento de Fala
kg	–Quilograma
KHz	–Kilo Hertz
Km ²	–Quilômetros quadrado
LDF	–Limiar de Detecção de Fala
LRF	–Limiar de Recepção de Fala
mg	–Miligrama
mm	–Milímetro
MN	–Micronúcleos
MT	–Membrana Timpânica
OD	–Orelha Direita
OE	–Orelha Esquerda
OMS	–Organização Mundial da Saúde
PAIR	–Perda Auditiva Induzida por Ruído
PARA	–Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PEATE	–Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico
SNC	–Sistema Nervoso Central
SINDAG	–Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINITOX	–Sistema Nacional de Informação Toxicológica
SVM	– <i>Support Vector Machine</i>
UCL	–Limiar de Desconforto de Fala
UNIPONTAL	–União dos Municípios do Pontal do Paranapanema

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Classificação dos agroquímicos quanto ao grau de toxicidade..	22
QUADRO 2 - Classificação de perda auditiva.....	28
QUADRO 3 - Classificação de perda auditiva de acordo com a configuração audiométrica.....	29
QUADRO 4 - Classificação de logaudiometria.....	30
QUADRO 5 - Medidas de imitância acústica.....	30
QUADRO 6 - Classificação de reflexo estapediano.....	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Municípios e assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema	18
FIGURA 2 -	Consumo de agroquímicos (2000-2014).....	20
FIGURA 3 -	Consumo de cigarros per capita e a prevalência de consumo.....	23
FIGURA 4 -	Estruturas do sistema auditivo humano.....	25
FIGURA 5 -	Fotomicrografia eletrônica de CCI e CCE.....	26
FIGURA 6 -	Mecanismo de formação do MN.....	37
FIGURA 7 -	Vias para produção de estruturas contendo DNA extra nuclear...	38
FIGURA 8 -	Alterações citogenéticas.....	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Meio ambiente e desenvolvimento regional – Pontal do Paranapanema.....	16
2.2	Agroquímicos e toxicidade.....	19
2.3	Tabagismo e toxicidade.....	22
2.4	Sistema auditivo.....	24
2.5	Exames audiológicos.....	27
2.5.1	Configuração audiométrica.....	28
2.5.2	Logaudiometria.....	29
2.5.3	Medidas de Imitância acústica.....	30
2.6	Ototoxicidade.....	31
2.6.1	Ototoxicidade e agroquímicos.....	32
2.6.2	Ototoxicidade e tabagismo.....	33
2.7	Biomarcadores de genotoxicidade.....	34
2.8	Algoritmos de classificação.....	40
3	CAPÍTULOS.....	41
4	ARTIGO I.....	42
	Introdução.....	44
	Materiais e métodos.....	46
	Resultados.....	50
	Discussão.....	53
	Conclusão.....	56
	Agradecimentos.....	57
	Declaração de conflito de interesse.....	57
	Referências bibliográficas.....	57
	Tabelas.....	64
	Legendas das figuras.....	71
	Figuras.....	72
5	ARTIGO II.....	74
	Introdução.....	76
	Materiais e métodos.....	77

	Resultados.....	81
	Discussão.....	83
	Conclusão.....	86
	Agradecimentos.....	86
	Declaração de conflito de interesse.....	86
	Referências bibliográficas.....	86
	Tabelas.....	92
	Legendas das tabelas.....	99
	Figuras.....	100
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
	REFERÊNCIAS.....	104
	ANEXOS.....	112
	ANEXO A – PARECER FINAL.....	112
	ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	113
	ANEXO C – QUESTIONÁRIO.....	116
	ANEXO D - GUIA PARA AUTORES.....	117

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta grande parte de sua dependência econômica na agricultura, ocupando lugar de destaque no cenário mundial. Nos últimos 40 anos, o país aumentou o seu consumo agrícola em cerca de 700%. Isto o levou a estar entre os países com maior consumo de agroquímicos do mundo, com estimativa de 2,5 a 3 milhões de toneladas por ano (MOREIRA et al., 2010).

Os agroquímicos têm sido amplamente utilizados no meio rural por décadas. O uso indiscriminado e sem medidas de biossegurança vem provocando grandes impactos ambientais e para o organismo humano, já que tem representado o aumento da incidência de intoxicações ocupacionais (SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

Trabalhadores e usuários de substâncias potencialmente tóxicas, como os agroquímicos e o cigarro, estão expostos a grandes malefícios à saúde geral e também auditiva. A audição exerce papel fundamental na comunicação humana. Desta forma, a perda ou a redução da capacidade de ouvir pode acarretar em diversas alterações psicossociais no indivíduo, já que a perda da audição é irreversível (CRUZ et al., 2009).

Os agroquímicos induzem alterações do sistema auditivo e vestibular, evidenciando o seu potencial neurotóxico. A utilização dessas substâncias pode levar ao comprometimento da audição, potencializando assim, a instalação da perda auditiva (KÖRBES et al., 2010).

Segundo Paschoal e Azevedo (2009), a utilização do cigarro também pode levar ao comprometimento da audição. O cigarro pode aumentar a viscosidade e pressão sanguínea na cóclea, levando à diminuição da oxigenação. Com isso, ocorre interferência da funcionalidade do órgão, devido à morte das células de sustentação (células ciliadas) responsáveis pelo reconhecimento e decodificação do som (ROGHA et al., 2015).

Os efeitos genotóxicos relacionados à exposição a substâncias químicas, que apresentam riscos para o desenvolvimento de patologias como o câncer, têm sido investigados em vários estudos (MELLO; SILVA, 2013; SILVA et al., 2015; GREIM, et al., 2015). Uma das metodologias utilizadas para esta avaliação é o Teste de Micronúcleo (MN), no qual se identifica

estruturas indicadoras de possíveis danos cromossômicos (BLOCHING et al., 2008). Além da análise de MN, alterações indicativas de apoptose, instabilidade cromossômica e morte celular aumentam a sensibilidade do teste, sendo uma forma importante de diagnóstico precoce e prevenção do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; HOLLAND et al., 2008).

Outra forma de análise de dados que permite a classificação e transformação das informações coletadas em valores numéricos, a fim de estabelecer padrões nos resultados é a análise computacional. A aplicação desta técnica vem sendo muito utilizada em toda a área médica, devido sua possível contribuição em diagnósticos e tratamentos de diferentes doenças (CRISTIANINI E SHAW-TAYLOR, 2001; ALTMAN, 2017).

Assim, a ampla utilização de agroquímicos, na região do Pontal do Paranapanema e a escassez de estudos sobre os efeitos auditivos e genotóxicos da exposição combinada a estes compostos, além da utilização de análises computacionais foram as principais motivações que levaram à realização deste estudo.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos auditivos e citogenéticos da exposição a estes dois xenobióticos (agroquímicos e cigarro), de maneira isolada ou em combinação e identificar possíveis padrões de classificação dos grupos de exposição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – Pontal do Paranapanema

A preocupação com o meio ambiente é um dos principais temas discutidos atualmente. A escassez dos recursos naturais, destruição de paisagens ambientais, poluição, desmatamento, entre tantos outros problemas, tem levado a um grande desequilíbrio ambiental (ZULAUF, 2000).

Com o passar dos anos, a modificação dos ecossistemas naturais tem sido influenciada diretamente pelo crescimento econômico e populacional. Os países desenvolvidos têm experimentado um crescimento econômico, baseado na utilização de cerca de 100 vezes mais recursos naturais do que era necessário a 200 anos . Esses dois fatores associados (economia e recursos naturais) tem levado a um aumento da poluição e a produção de resíduos (EPIPHÂNIO; ARAÚJO, 2008).

Segundo Odum e Barret (2008), o ecossistema apresenta características específicas, sendo formado por fatores bióticos e abióticos. Esses fatores permitem que haja uma interação entre os organismos vivos e o ambiente físico, formando um fluxo de energia entre as partes vivas e não vivas. Com isso, os recursos naturais existentes se inter-relacionam, sendo fortemente prejudicados em decorrência do mau uso e da poluição. Baird (2006) destaca que a utilização de forma ilimitada dos recursos naturais, ao longo dos anos, ocasionou um desequilíbrio, com redução de espécies de organismos e efeitos adversos aos compartimentos naturais.

Um dos fatores que tem levado a grande preocupação é o alto índice de uso de agroquímicos. Segundo Gomes e Barizon (2014), a avaliação do risco ambiental deve ser utilizada como forma de investigação dos efeitos tóxicos e danosos à saúde, ocasionados pelo uso desmedido de agroquímicos e outras substâncias, utilizadas para o aumento da produção e consumo do país. Desta forma, a contaminação dos recursos presentes no meio ambiente faz com que a preocupação com os possíveis danos à saúde e ao meio ambiente seja fatores de alerta a toda população (GOMES; BARIZON, 2014).

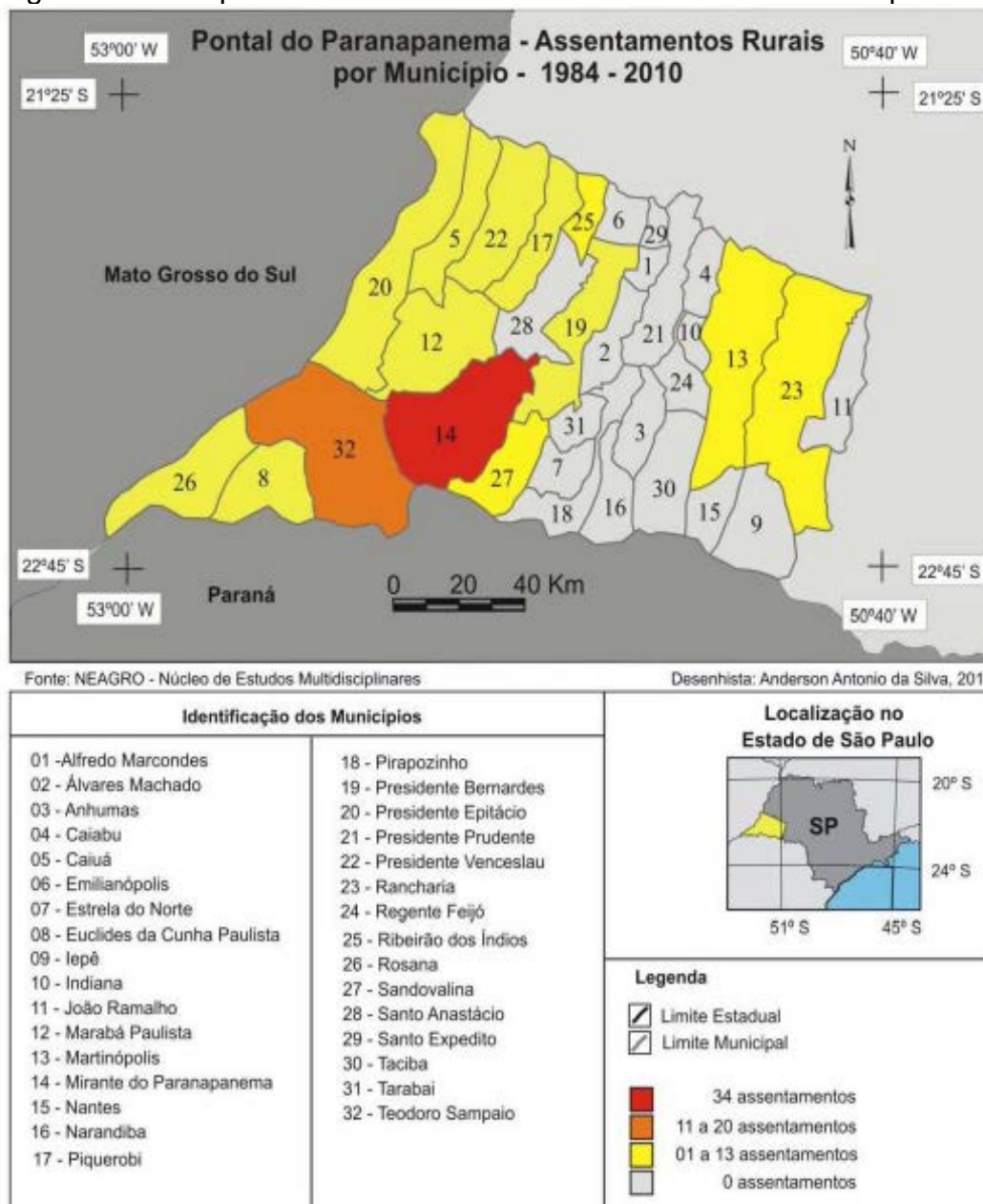
A região do Pontal do Paranapanema, localizada no extremo Oeste do estado de São Paulo, ao norte do estado do Paraná e ao sul do rio Paranapanema, abrange uma área de 18.441,60 Km² e é composta por 32 municípios: Alfredo Marcondes, Álvares Machado, Anhumas, Caiuá, Emilianópolis, Euclides da Cunha Paulista, Iepê, João Ramalho, Marabá Paulista, Martinópolis, Mirante do Paranapanema, Nantes, Narandiba, Piquerobi, Pirapozinho, Presidente Bernardes, Presidente Epitácio, Presidente Prudente, Presidente Venceslau, Rancharia, Regente Feijó, Ribeirão dos Índios, Rosana, Sandovalina, Santo Anastácio, Santo Expedito, Taciba, Teodoro Sampaio, Caiabú, Indiana, Tarabai e Estrela do Norte. A população total deste território é de 583.766 habitantes, dos quais 59.911 mil vivem na área rural, o que corresponde a 10,26% do total de indivíduos (BARONE; MELAZZO; SILVA, 2011).

Essa região apresenta a maior concentração de assentamentos rurais do Brasil, sendo palco de inúmeros conflitos fundiários. Possui atualmente 113 assentamentos espalhados em 14 dos 32 municípios que fazem parte da União dos Municípios do Pontal do Paranapanema (UNIPONTAL). Estes assentamentos possuem cerca de 12.500 agricultores familiares e pouco mais de 6 mil famílias assentadas (VERGES, 2013).

A região é coberta pela paisagem originária de Mata Atlântica de interior ou estacional semi-decídua de Planalto, sendo considerada uma área de transição para os domínios do cerrado (BEDUSCHI-FILHO, 2002).

A figura 1 apresenta o mapa dos municípios que fazem parte do território do Pontal do Paranapanema e os assentamentos rurais no período de 1984 a 2010, de acordo com Barone, Melazzo e Silva (2011).

Figura 1: Municípios e assentamentos rurais do Pontal do Paranapanema.



Fonte: BARONE; MELAZZO; SILVA, 2011.

As experiências inovadoras na gestão econômica e social de todo território expressam tensões que são reveladoras das contradições e possibilidades da agricultura familiar, frente ao poder do grande capital agropecuário e agroindustrial, no âmbito do desenvolvimento social no campo paulista (BARONE; MELAZZO; SILVA, 2011).

Por se tratar de uma região com grandes atividades agrônômicas, a região do Pontal do Paranapanema está associada à ampla utilização de agroquímicos. Segundo Barreto (2013), a utilização de agroquímicos em

grande escala tem ocorrido nas cidades do Pontal do Paranapanema nas quais há a predominância de atividades agrícolas, sendo elas: Euclides da Cunha Paulista; Marabá Paulista; Mirante do Paranapanema, Rosana, Sandovalina e Teodoro Sampaio. Este fato também foi demonstrado em estudo de Judai e Antunes (2015), que identificou nestes municípios os maiores relatos de utilização e contato direto de trabalhadores rurais com agroquímicos.

2.2 Agroquímicos e toxicidade

Os agroquímicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção agrícola, agropecuária, industrial, uso doméstico, entre outros (KIM, KABIR; JAHAN, 2016).

É possível encontrar no mercado inúmeros compostos químicos que podem ser utilizados para o combate de diferentes pragas. Muitos destes compostos não apresentam liberação pelos órgãos fiscalizadores, sendo de origem ilegal e desconhecida, podendo elevar o risco de contaminação ambiental e intoxicações humanas (FRAGA et al., 2016).

A legislação brasileira por intermédio da Lei nº 7.802 de 1989 e o decreto nº 4.074 de 2002 (BRASIL, 2002), regulamenta a utilização, armazenagem, transporte e comercialização envolvendo uma série de etapas de avaliações de risco ambiental e para a saúde, sobre os produtos com características toxicológicas. Os agroquímicos contêm princípios ativos, ingredientes inertes e aditivos, usados em sua fabricação, e podem ser produzidos, exportados, importados e comercializados mediante registro no órgão federal seguindo as diretrizes e exigências necessárias.

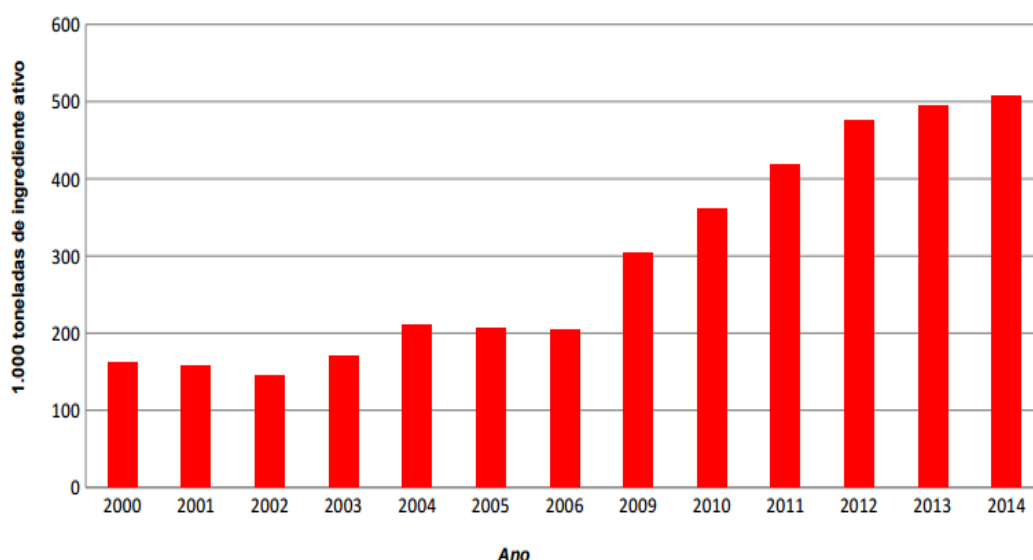
No mercado existem mais de 200 grupos químicos diferentes que dão origem a cerca de 1.500 produtos a serem utilizados, entre eles inseticidas, fungicidas e herbicidas (LONDRES, 2011). Jallow et al. (2016) destaca que o uso excessivo dos agroquímicos no ambiente rural têm levado a uma grande preocupação sobre os efeitos negativos na saúde e no meio ambiente. Além disso, destaca que existe a necessidade de se compreender a realidade vivida pelos trabalhadores, expondo os riscos de seu uso excessivo e inadequado.

A cada ano existe um aumento significativo na utilização dos agroquímicos no Brasil, influenciando de forma direta na qualidade do ar, água, solo, prejudicando assim, o meio ambiente (BOMBARDI, 2011).

O Brasil lidera a venda e utilização de agroquímicos desde 2008, o que influencia todo o contexto produtivo (BOMBARDI, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as intoxicações por agroquímicos atingem cerca de 3 milhões de pessoas anualmente, sendo 2,1 milhões de casos em países desenvolvidos, 20 mil mortes em todo o mundo e 14 mil em países subdesenvolvidos (KÓS et al., 2013).

Segundo dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2016), os 10 ingredientes ativos mais vendidos no ano de 2014 foram: glifosato, 2,4-D, acefato, clorpirifós, atrazina, mancozebe, metomil e diuron. Nos anos de 2001 a 2008, o Sindicato Nacional das Empresas de Aviação Agrícolas - SINDAG (2016), demonstraram que a venda de agroquímicos passou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões, chegando a cerca de 990 mil toneladas de agroquímicos aplicados. O aumento gradual deste consumo pode ser observado na Figura 2.

Figura 2: Consumo de agroquímicos (2000-2014)



Fonte: IBAMA, 2016

Muitos são os efeitos nocivos à saúde humana, associados à utilização dos agroquímicos. Estudos mostram que algumas destas substâncias podem ser encontradas no sangue, urina e leite materno, evidenciando a importância da exposição e sua possível relação com o aumento de casos de câncer, doenças mentais, disfunções na reprodução, problemas de audição, entre outros (MELLO; SILVA, 2013).

Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX, 2011), no período de 2007 a 2011 foram registrados 26.385 casos de intoxicações por agroquímicos, sendo o terceiro no grupo responsáveis por intoxicações humanas (11,8%), antecedido pelos medicamentos (28,3%) e acidentes com animais peçonhentos (23,7%).

As intoxicações podem ser subdivididas em três tipos: aguda, subaguda e crônica. A intoxicação aguda apresenta sintomas horas após a exposição; enquanto que a subaguda se manifesta de forma moderada ou baixa a produtos com uma classificação altamente tóxica. Já a intoxicação crônica caracteriza-se pelo surgimento tardio de sintomas e patologias, que pode ser de meses ou anos após a exposição (LONDRES, 2011).

A exposição direta ou indireta a agroquímicos pode atingir a população geral, por meio de resíduos encontrados em alimentos e água em níveis acima do permitido pela legislação (KIM; KABIR; JAHAN, 2016).

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA, 2012), iniciado em 2001 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), avalia os níveis de resíduos de agroquímicos nos alimentos que chegam até o consumidor. O órgão avalia a utilização dos mesmos nos plantios, se existem irregularidades no uso pelos agricultores e como esses alimentos podem prejudicar o consumidor caso manuseados de maneira inadequada (ANVISA, 2015).

O trabalhador agrícola está diariamente e diretamente exposto aos agroquímicos com potenciais efeitos nocivos à saúde. No entanto, não somente eles, mas toda a família (expectador familiar e exposição para-ocupacional), que convive em regiões próximas às plantações está exposta aos possíveis malefícios à saúde a curto, médio e longo prazo (KUNST, 2013).

No ambiente rural, o contato com os agroquímicos também pode ocorrer devido a resíduos nas roupas, solo, água e alimentos, sendo que a maior parte dos agroquímicos pode sofrer deriva no momento de sua aplicação. Além disso, sua utilização no controle e combate a ervas daninhas, controle de vetores de doenças, aplicação diretamente em águas, efluentes industriais, acaba atingindo diretamente esses recursos (AUGUSTO et al., 2012).

Por muitas vezes, o trabalhador faz o uso de diferentes agroquímicos sem o real conhecimento de sua toxicidade e possíveis malefícios a saúde e sem o uso adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (DUTTA; BAHADUR, 2016; VEIGA; MELO, 2016).

Segundo a Lei nº 7.802, a classificação toxicológica dos produtos deve ser analisada em seus rótulos, onde devem constar informações referentes à composição, classificação tóxica, efeitos à saúde humana, símbolos de perigo, instruções de uso e primeiros-socorros, precauções, dados do fabricante entre outras informações.

Os agroquímicos são classificados segundo o grau de toxicidade relacionada à Dose Letal mediana (DL50) (Quadro 1). Este parâmetro toxicológico constitui o valor estimado estatisticamente em miligrama (mg) do composto químico por quilograma (kg) de peso, que é suficiente para ocorrer a morte de 50% da população de animais da mesma espécie.

Quadro 1: Classificação dos agroquímicos quanto ao grau de toxicidade.

Classes	Grupos	DL50 (mg/kg)	Cor da Faixa
I	Extremamente tóxico	≥5	Vermelha
II	Altamente Tóxico	5 – 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	50 – 500	Azul
IV	Pouco tóxico	50 - 5000	Verde

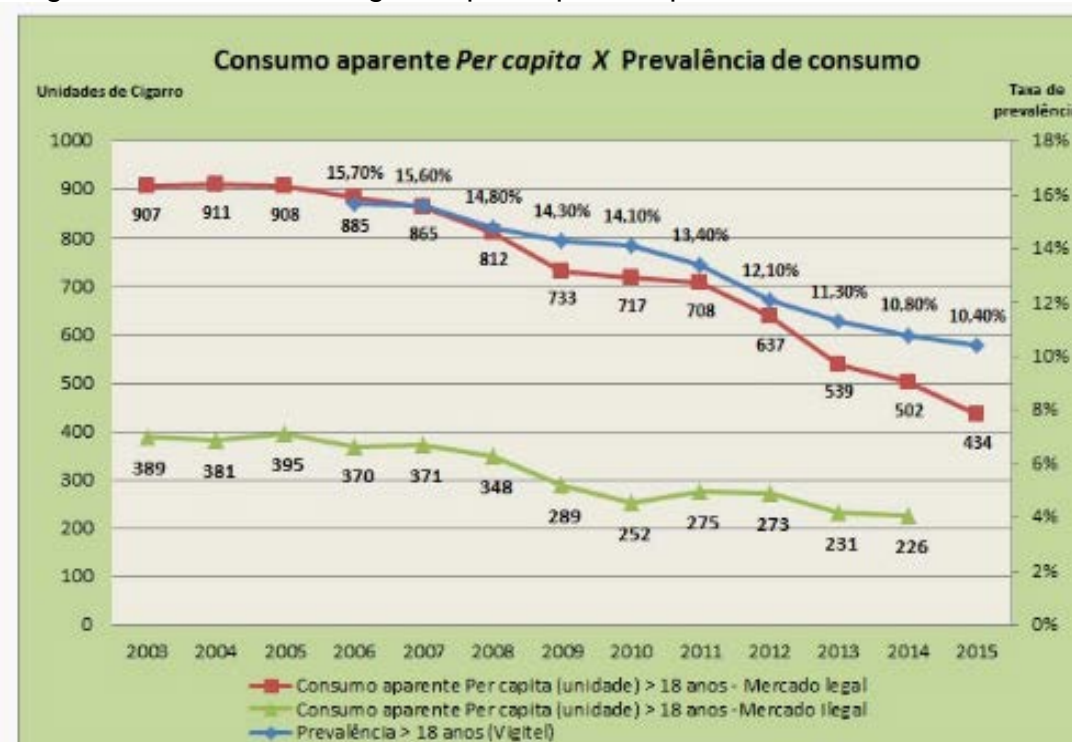
Fonte: SAVOY, 2011

2.3 Tabagismo e toxicidade

Além da exposição aos agroquímicos, outro grande problema de saúde pública importante e que merece destaque é o tabagismo. Estima-se que cerca de 967 milhões de indivíduos no mundo sejam fumantes (INCA, 2016). Apesar do elevado número, observou-se um declínio de 65% no número de

cigarros per capita entre os anos de 1980 e 2010. Nos anos de 2003 à 2015, o Brasil registrou uma queda no número de cigarros per capita e no número de fumantes ativos (Figura 3).

Figura 3: Consumo de cigarros per capita e a prevalência de consumo



Fonte: INCA, 2016

A exposição ao cigarro pode ocorrer de forma direta ou indireta, afetando diversas pessoas não fumantes (fumante passivo) pelo simples fato de conviverem em ambientes, onde há fumantes, sendo que, esse contato pode ocorrer em ambientes de trabalho, doméstico, lazer. Esse contato indireto pode fazer com que esses indivíduos expostos apresentem problemas de saúde iguais aos que têm o vício (HEFFERMAN, 2016).

O cigarro contém mais de quatro mil substâncias químicas, contudo, a maioria dos estudos demonstram que a nicotina é o principal agente responsável pela dependência química, física e psíquica do cigarro, seguindo os mesmos processos da heroína e cocaína (SILVA et al., 2012).

Por ser um estimulante psicomotor, o cigarro faz com que haja uma sensação de redução no estresse e ansiedade, diminuição de apetite e melhora na atenção e memória. Estes fatores são reduzidos após exposição contínua o que leva ao aumento do número de cigarros consumidos, para que

se volte a ter a sensação inicial, tornando-se assim um círculo vicioso (MELTZER et al., 2016).

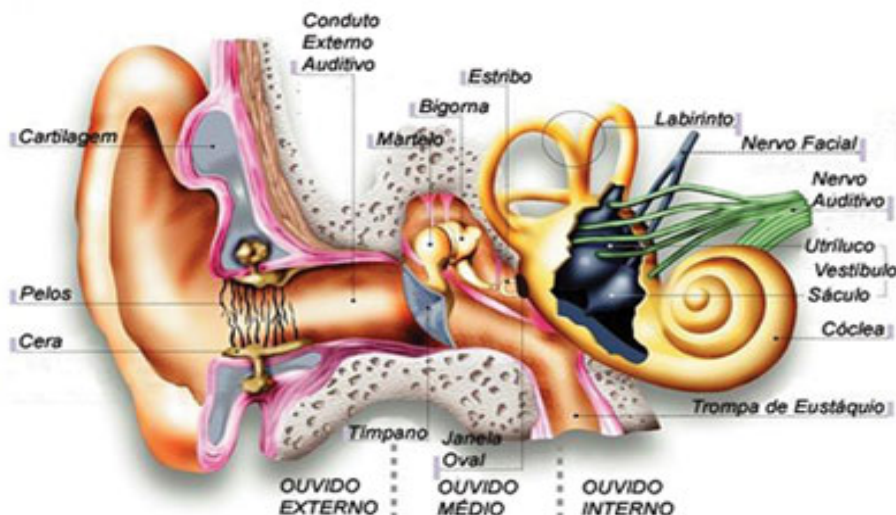
A relação entre o tabagismo e o aparecimento de doenças está sendo cada vez mais investigado (ALAVANJA; ROSS; BONNER, 2013; KIM; KABIR; JAHAN, 2016; MELTZER et al, 2016). Como no estudo de Oliveira (2011), onde o autor destaca que o tabagismo, em especial a nicotina, pode ser um dos agentes etiológicos do câncer, por sua capacidade de interferir diretamente na estrutura do Ácido Desoxirribonucleico (DNA).

Ramos et al. (2011) relata que a fumaça do cigarro ou a poluição tabágica é capaz de apresentar diversas manifestações imediatas como: irritação nos olhos, manifestações nasais tais como: rinite e sinusite, tosse, cefaleia, problemas alérgicos e cardíacos. Segundo Xavier et al. (2013), o cigarro pode aumentar os problemas respiratórios devido a depuração mucociliar, aumentando assim a frequência de queixas e gravidade das infecções. Além dos problemas respiratórios, outras manifestações como impotência sexual, malformação congênita, bronquite crônica, trombose, diversos tipos de câncer (especialmente, de pulmão, boca, laringe e estômago) e perdas auditivas têm sido amplamente relacionadas ao tabagismo (SILVA et al., 2014).

2.4 Sistema Auditivo

O sistema auditivo (Figura 4) é um dos principais sistemas sensoriais do organismo. Ele comporta dois sistemas essenciais ao desenvolvimento do indivíduo: o aparelho auditivo e o vestibular. Lesões em qualquer parte desses sistemas podem levar a inúmeros prejuízos tanto de caráter físico como emocionais (MENEZES; NETO; MOTTA, 2005).

Figura 4: Estruturas do sistema auditivo humano.



Fonte: JUDAI e ANTUNES, 2015

A orelha externa é constituída pelo pavilhão auricular e meato acústico externo, por onde as ondas sonoras são captadas e encaminhadas à membrana timpânica (MT) iniciando a Orelha Média (MOMENSOHN-SANTOS; RUSSO, 2009).

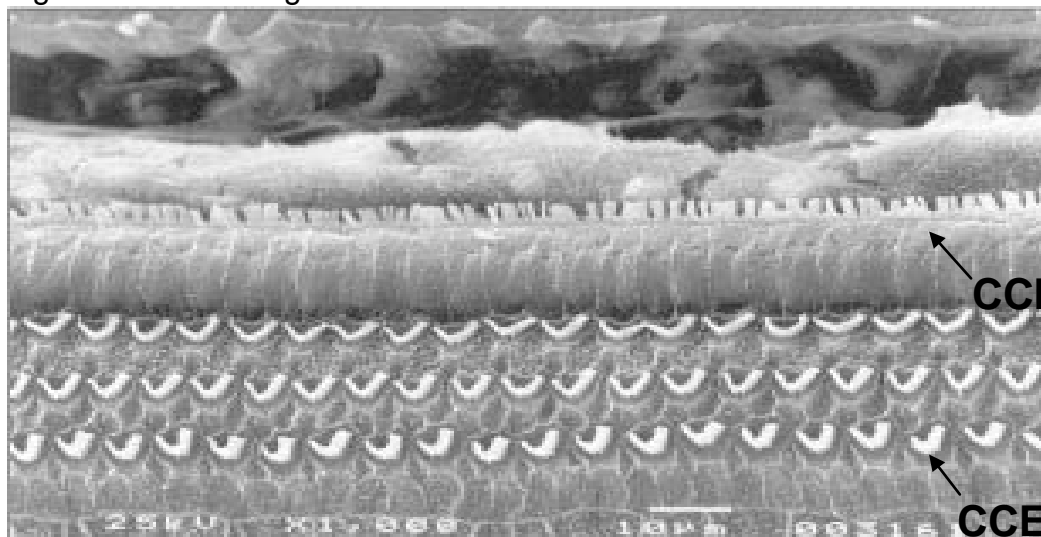
A orelha média é composta por um espaço aéreo que tem forma semelhante a um cilindro, limitado lateralmente pela membrana timpânica e parede lateral da orelha interna. Também é composta pelos três menores ossos do corpo humano (martelo, bigorna e estribo), que se articulam formando uma ligação mecânica entre a membrana timpânica e janela oval e assim fazendo com que o som captado pela orelha externa seja amplificado e compreendido (NASCIMENTO; SANTOS, 2010).

A orelha interna é composta pelos sistemas vestibular e coclear. A cóclea é semelhante ao formato de um caracol, medindo 9mm de largura, 5mm de altura e aproximadamente 35mm de comprimento quando estendida. Nos seres humanos, apresentam três voltas, e em outras espécies como ratos e camundongos, esse número pode variar de 2 a 3 voltas, circundando um núcleo central ósseo denominado modíolo (MOMENSOHN-SANTOS; RUSSO, 2009).

A cóclea é um órgão que possui células de sustentação e ciliadas (sensoriais) dispostas em uma fileira mais central (células ciliadas internas – CCI, Figura 5) e três fileiras mais periféricas (células ciliadas externas – CCE, Figura 5), que se prendem a uma estrutura gelatinosa, a membrana tectória.

A CCE possui uma importante função no processo qualitativo da discriminação do som, apresentando o papel mecânico de amplificação sonora e filtragem da frequência. Enquanto que as CCI tem um papel sensorial direto nesse processo (MENEZES; NETO; MOTTA, 2005).

Figura 5: Fotomicrografia eletrônica de CCI e CCE



Fonte: KÖRBES, 2009

A audição está diretamente associada ao desenvolvimento da linguagem e comunicação, uma vez que o indivíduo que apresenta danos a esses sistemas acabam apresentando diversas manifestações de comportamento como isolamento social, desvantagens educacionais e redução na capacidade em se comunicar (DIMATOS et al., 2011). A deficiência auditiva é a incapacidade que um indivíduo apresenta em interpretar os sons, esta deficiência pode ser total ou parcial (NASCIMENTO; SANTOS, 2010).

As causas da deficiência auditiva podem estar relacionadas a fatores congênitos, traumas locais, otites, exposição a ruídos e drogas ototóxicas, processo natural de envelhecimento, entre outras (CRUZ et al., 2009).

Os agentes tóxicos podem levar a sérios problemas de saúde, e com a audição não é diferente. Os componentes periféricos e centrais da audição podem ser lesionados, por isso, há a necessidade em se realizar estudos para melhor conhecimento dos efeitos associados a esses fatores (KÖRBES, 2009). A perda auditiva é o déficit sensorial mais comum, acometendo pessoas de diferentes faixas etárias e gêneros, resultando na restrição das

habilidades em se comunicar normalmente através da linguagem oral (DIMATOS et al., 2009).

Uma das manifestações precoces de possíveis problemas auditivos é o aparecimento do zumbido. O zumbido é um sintoma que produz extremo desconforto, de difícil tratamento e capaz de interferir diretamente na qualidade de vida do indivíduo. Ele é percebido quando o indivíduo encontra-se em locais silenciosos, pois assim, o mesmo apresenta-se em evidência devido aos sons externos que os tornam menos perceptíveis (DIAS et al., 2006).

Segundo Pinto, Sanchez e Tomita (2010), a relação entre zumbido e perda auditiva é incerta. No entanto, Searchfield et al. (2007), evidenciaram que as perdas auditivas em frequências convencionais se correlacionam com um maior incomodo com o zumbido, ou seja, indivíduos que apresentam maior dificuldade nos limiares de fala apresentam maiores níveis de zumbido.

2.5 Exames audiológicos

Para que o diagnóstico de perda auditiva seja feito, primeiramente é necessária a realização de uma anamnese, onde informações sobre o paciente, problemas de saúde e queixas auditivas são abordados. Assim, posteriormente pode ser realizada uma inspeção no meato acústico externo e em seguida a avaliação audiológica básica, composta pela pesquisa de limiares auditivos, logaudiometria e imitânciometria (MAIA, 2011). Além desses exames, existem outros que são complementares e auxiliam em um diagnóstico mais complexo como as emissões otoacústicas (EOA), Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) (OGANDO; LUBIANCA NETO, 2012).

Com base na Associação Americana para Fala, Linguagem e Audição (ASHA) e no Manual de Procedimentos em Audiometria Tonal, Logaudiometria e Medidas de Imitância Acústica, descritos pelo Conselho Federal de Fonoaudiologia (2013), no resultado da audiometria tonal, devem ser considerados os seguintes aspectos: tipo e grau de perda auditiva, configuração audiométrica e lateralidade da perda. O tipo de perda está relacionado à localização e quais estruturas encontram-se afetadas no aparelho auditivo. O grau de perda refere-se à intensidade com que essa

perda ocorreu e a configuração, refere-se a característica visual da perda, ou seja, o desenho que essa perda apresenta no audiograma (Conselho Federal de Fonoaudiologia, 2013).

Diversos autores descrevem os tipos de perdas auditivas (NORTHERN; DOWNS, 1984; BIAP, 1997; SILMAN; SILVERMAN, 1997). No entanto, existem variações em suas considerações, sendo de escolha do profissional de fonoaudiologia, seguir o padrão que mais se identifica para a elaboração dos laudos. Segundo a descrição de Silman e Silverman (1997) os tipos de perda são classificados de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2: Classificação de perda auditiva

Tipo de perda	Características
Condutiva	Limiaries de via óssea menores ou iguais a 15 dBNA e limiaries de via aérea maiores do que 25dBNA, com gap aéreo-ósseo maior ou igual a 15dBNA
Neurosensorial	Limiaries de via óssea maiores do que 15dBNA e limiaries de via aérea maiores do que 25dBNA, com gap aéreo-ósseo de até 10dB.
Mista	Limiaries de via óssea maiores do que 15dBNA e limiaries de via aérea maiores do que 25dBNA, com gap aéreo-ósseo maior ou igual a 15dB.

Fonte: CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2013.

2.5.1 Configuração de curva audiométrica

A classificação da configuração audiométrica descrita por Silman e Silverman, 1997 (Quadro 3) leva em consideração o desenho que os limiaries obtidos através da pesquisa de via aérea para cada orelha. Sua classificação também pode variar conforme os autores, e a descrição nos achados audiológicos podem variar conforme a realização do profissional.

Quadro 3: Classificação de perda auditiva de acordo com a configuração audiométrica

Tipo de Configuração	Características
Ascendente	Melhora igual ou maior do que 5 dB por oitava em direção as frequências altas
Horizontal	Limiaries alternando melhora ou piora de 5 dB por oitava em todas as frequências
Descendente leve	Piora entre 5 a 10 dB por oitava em direção as frequências altas
Descendente acentuada	Piora entre 15 a 20 dB por oitava em direção as frequências altas
Descendente em rampa	Curva horizontal ou descendente leve com piora \geq 25dB por oitava em direção as frequências altas
Em U	Limiaries das frequências extremas melhores do que as frequências médias com diferença \geq 20 dB
Em U invertido	Limiaries das frequências extremas piores do que as frequências médias com diferença \geq 20 dB
Entalhe	Curva horizontal com descendência acentuada em uma frequência isolada, com recuperação na frequência imediatamente subsequente.

Fonte: CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2013 ; Silman e Silverman, 1997 – adaptada de Carhart, 1945 ; Lloyd e Kaplan, 1978.

2.5.2 Logaudiometria

A logaudiometria é a medida da habilidade do indivíduo para detectar e reconhecer a fala, realizado por intermédio de uma lista de palavras emitidas ao paciente. Por meio desse teste é possível avaliar o Limiar de Detecção de Fala (LDF), o Limiar de Recepção de Fala (LFR/SRT), o Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF) e o Limiar de Desconforto de Fala (UCL) (Conselho Federal de Fonoaudiologia, 2013). A classificação segundo Jerger, Speaks e Trammel (1968) pode ser observada no Quadro 4, onde os valores expressos em porcentagem demonstram o índice de acertos do paciente em relação a lista de palavras monossilábicas ou dissilábicas emitidas no teste.

Quadro 4: Classificação de logoaudiometria

Resultado do IPRF	Dificuldade de compreensão de fala
100% a 92%	Nenhuma dificuldade para compreender a fala.
88% a 80%	Ligeira/discreta dificuldade para compreender a fala.
76% a 60%	Moderada dificuldade para compreender a fala.
56% a 52%	Acentuada dificuldade para acompanhar uma conversa.
Abaixo de 50%	Provavelmente incapaz de acompanhar uma conversa.

Fonte: CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2013.

2.5.3 Medidas de Imitância Acústica

As medidas de Imitância acústica são realizadas por intermédio da colocação de uma sonda na entrada do canal auditivo interligado a um fone colocado na orelha oposta, sendo necessária a integridade da membrana timpânica para a realização do mesmo. Esse teste verifica as condições de orelha média e interna através do reflexo do músculo estapediano (Jerger; Jerger, 1989).

A timpanometria é utilizada para avaliar o funcionamento e integridade da orelha média, a fim de verificar a mobilidade do sistema tímpano-ossicular decorrente da variação de pressão do ar no meato acústico externo.

Os tipos de curvas, segundo a classificação de Jerger e Jerger (1989), são mostradas no Quadro 5.

Quadro 5: Medidas de imitância acústica.

Tipo de curva	Características
Tipo A	Mobilidade normal do sistema tímpano-ossicular
Tipo Ad	Hipermobilidade do sistema tímpano-ossicular
Tipo Ar	Baixa mobilidade do sistema tímpano-ossicular
Tipo B	Ausência de mobilidade do sistema tímpano-ossicular
Tipo C	Pressão de ar da orelha média desviada para pressão negativa

Fonte: CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2013.

Além disso, para o resultado da avaliação do reflexo acústico do músculo estapediano avaliado pelo mesmo exame, utiliza-se a classificação de Gelfand (1984) e Jerger e Jerger (1989), conforme Quadro 6.

Quadro 6: Classificação do reflexo estapediano

Presente	Em níveis normais	Reflexo desencadeado entre 70 e 100 dB acima do limiar da via aérea
	Presente e diminuído	Diferença menor ou igual a 65 dB entre o limiar de via aérea e o reflexo estapediano contralateral
	Presente e aumentado	Diferença maior do que 100 dB entre o limiar de via aérea e o reflexo estapediano contralateral
Ausente	Reflexo não desencadeado até a saída máxima do equipamento	

Fonte: CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA, 2013.

2.6 Ototoxicidade

A ototoxicidade é definida como o resultado de ações tóxicas de determinadas substâncias químicas, que apresentam características capazes de lesionarem o labirinto anterior e/ou posterior, resultando em perda auditiva com manifestações como zumbido, vertigem, dificuldade de marcha dentre outros sintomas (HOSHINO et al., 2008).

Entendem-se como produtos ototóxicos todos os elementos físicos e químicos capazes de provocar prejuízos ao sistema auditivo. Alguns produtos como agroquímicos, produtos químicos de limpeza e medicamentos apresentam implicações sobre a saúde e a qualidade de vida em indivíduos que utilizam de maneira excessiva e sem equipamentos de proteção (HOSHINO et al., 2008).

A perda auditiva por ototoxicidade pode ser de instalação rápida ou insidiosa, dependendo da gravidade e quantidade exposta a substância, tempo de exposição e manuseio do mesmo (HOSHINO et al., 2008). Segundo Körbes et al. (2010), as manifestações dos agentes ototóxicos no sistema vestibulococlear atingem as CCE e VII par craniano, levando a alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) e vestibular, além do equilíbrio corporal. Existem vários estudos que evidenciam a presença de perda auditiva em indivíduos expostos cronicamente a produtos químicos como agroquímicos,

medicamentos e componentes do cigarro (AGRAWAL; PLATZ; NIPARKO, 2008; COGO et al., 2016). A exposição crônica a esses agentes potencializam seus possíveis efeitos, podendo levar a danos irreversíveis à audição (WILD; BREWATER; BANERJEE, 2005).

2.6.1 Ototoxicidade e Agroquímicos

Os agroquímicos podem apresentar características altamente tóxicas para a saúde humana, sendo causadores de patologias pelo seu uso inadequado e em abundância. A não utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) como luvas, botas, máscaras, mangas longas, entre outros, agrava o seu contato direto com o corpo humano, levando a sua deposição em tecidos. Algumas substâncias presentes nas diferentes composições dos agroquímicos influenciam negativamente no sistema vestibular, causando a perda da função ou danos nas CCE e CCI presentes na orelha interna. Tais substâncias denominadas ototóxicas podem provocar tonturas, além de danos auditivos (COGO et al., 2016).

Estudo realizado em uma comunidade rural, próxima a uma região de plantações que utilizavam agroquímicos, observou que 54% dos indivíduos entrevistados apresentaram sintomas como tontura e mal-estar (COGO et al., 2016). Judai e Antunes (2015) observaram perda dos limiões em alta frequência em trabalhadores expostos a diferentes agroquímicos de forma dependente do tempo de exposição. Os autores também destacaram o rebaixamento dos limiões a partir da frequência de 3.000KHz, do grupo exposto, quando comparado ao grupo controle, de acordo com o tempo de exposição e a idade dos participantes.

A intoxicação ocupacional e ambiental por agroquímicos se manifesta de maneira silenciosa e lenta, não sendo correlacionada ao aparecimento de algumas patologias. As dificuldades auditivas é uma delas, pois os trabalhadores muitas vezes não correlacionam o uso prolongado dos agroquímicos com a ototoxicidade. As dificuldades auditivas se manifestam inicialmente com a perda da qualidade sonora e a boa compreensão de fala, o que se pode refletir na dificuldade escolar e de comunicação (AGRAWAL; PLATZ; NIPARKO, 2008).

Em um estudo realizado por Manjabosco, Morata e Marques (2004), 60% dos trabalhadores rurais expostos a agroquímicos apresentou limiares auditivos alterados. Já em outro estudo, realizado por Choi et al. (2005), após audiometria tonal e vocal em 150 trabalhadores, evidenciou-se riscos à saúde auditiva e casos de intoxicação aguda por herbicidas organofosforados e inseticidas.

Oliveira, Vargas e Sena (2013), realizaram audiometria tonal e aplicação de um questionário de índice de qualidade de vida. O estudo demonstrou que os agricultores, que apresentavam contato com algum tipo de agroquímico, tiveram piores resultados de qualidade de vida quando comparados àqueles que não utilizavam. Além disso, identificaram relação entre a classe toxicológica, o tempo de exposição e grau de perda auditiva dos trabalhadores.

2.6.2 Ototoxicidade e Tabagismo

Além dos conhecidos malefícios que os cigarros causam na saúde humana, outro fator importante e que não se tem muitas informações, são as perdas de limiares auditivos ocasionados pelo uso do cigarro (OLIVEIRA; LIMA, 2009).

Estudos realizados com animais de laboratórios demonstraram lesões na estrutura da cóclea após a exposição ao cigarro (MIZOUE; MIYAMOTO; SHIMIZU, 2003). Paschoal e Azevedo (2009), demonstraram que indivíduos fumantes ou ex-fumantes são mais suscetíveis a perdas auditivas nas frequências altas, sugerindo que o efeito provocado pelo cigarro na audição é acumulativo e permanente. Também relataram que a toxicidade é diretamente proporcional ao número de cigarros consumidos diariamente e inversamente proporcionais à idade em que a pessoa inicia o vício. Neste mesmo estudo, foram identificados receptores de nicotina nas células ciliadas, sugerindo que o cigarro pode ter um efeito ototóxico direto na funcionalidade das mesmas, reduzindo a potencialidade e ação do órgão neurotransmissor da audição.

Existem relatos da existência de uma pré-disposição em indivíduos fumantes em apresentarem rebaixamento dos limiares nas frequências altas (WILD, BREWSTER; BANERJEE, 2005). Desta forma, esses limiares servem

como indicativo precoce de uma possível futura perda auditiva (NOORHASSIM; RAMPAL, 1998; NAKANISHI, et al., 2000).

Nos fumantes, o zumbido pode se manifestar como sinalizador de um possível problema auditivo. Assim, mesmo que no início, o mesmo deve ser investigado, pois uma possível perda auditiva pode ser prevenida com a suspensão do agente causador do problema (CHUNG et al., 2009). A aparição do zumbido pode ser característica de uma alteração no sistema periférico ou central. O tabagismo é responsável pela falta de oxigenação no sangue, obstruções vasculares e alterações na viscosidade sanguínea, podendo assim, ter um efeito ototóxico na audição, levando a danos no sistema auditivo e órgãos responsáveis (CHUNG et al., 2009).

2.7 Biomarcadores de genotoxicidade

A monitorização da exposição de indivíduos a agentes químicos por meio de análises de material biológico, como sangue, urina e saliva, é importante para a detecção precoce de alterações biológicas e prevenção de doenças de manifestação silenciosa. Estes parâmetros avaliados são denominados de indicadores biológicos ou biomarcadores (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores podem ser utilizados com diferentes propósitos dependendo da finalidade e objetivo da pesquisa. Tais estudos podem contribuir para avaliar a exposição ou quantidade absorvida de substâncias químicas, suscetibilidade individual e possíveis efeitos ao ser humano e ao meio ambiente (UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2016). A utilização de biomarcadores pode trazer uma correlação entre causa-efeito e dose-efeito nas avaliações de monitoramento biológico, já que existe a necessidade de identificar e validar parâmetros que sejam característicos e indicativos de patologias ocasionadas por agentes de exposição (UMBUZEIRO; HERINGA; ZEIGER, 2016).

Os agentes genotóxicos são aqueles que interagem com o DNA e produzem alterações em sua estrutura ou funções. Alguns testes são utilizados como forma de biomonitoramento individual e verificam a genotoxicidade de forma eficaz. Estes testes podem ser usados na prevenção e diagnóstico de diversas patologias e/ou agravos à saúde (KUNST, 2013).

Estabelecer relações de causa e efeito é extremamente necessário, especialmente quando se considera que o aumento de doenças degenerativas e a alta incidência de câncer têm levado a um grande número de mortes (CHEN et al., 2015). Holland et al. (2008) consideram que essas doenças podem ser originárias de danos genômicos, que podem ocorrer devido à exposição ambiental, estilo de vida, hábitos e fatores genéticos.

Uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas no organismo é o teste do micronúcleo (MN). Este teste tem sido utilizado em biomonitoramento ambiental (BÜCKER; WANDERSON; ALVES-GOMES, 2006), devido a sua capacidade em detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) e agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (FENECH, 2000). Esta é uma técnica rápida, eficiente, econômica, indolor e muito utilizada como indicador de genotoxicidade (COELHO et al., 2007).

O teste do MN pode ser usado para acompanhamento de trabalhadores expostos a agentes xenobióticos, com potencial genotóxico. Por fornecer informações sobre possíveis danos ao DNA, seus resultados podem subsidiar tomada de decisões relacionadas a medidas de segurança de trabalhadores expostos ocupacionalmente, bem como o tratamento mais adequado para determinadas doenças adquiridas (BOLOGNESI et al., 2011).

A análise de MN pode ser considerada uma valiosa ferramenta na prevenção da carcinogênese oral devido ao elevado número de aparecimento de MNs serem indicativos de maior probabilidade de desenvolvimento da doença (SARAN et al., 2008).

O teste MN é um método minimamente invasivo que pode ser realizado através da análise das células esfoliadas da mucosa bucal. Por meio desta análise é possível identificar fatores como instabilidade cromossômica, morte celular e potencial regenerativo do tecido da mucosa bucal, servindo como forma de biomonitoramento em populações humanas expostas a agentes mutagênicos (THOMAS; FENECH, 2011). O teste foi inicialmente proposto em 1983 e vem ganhando destaque, sendo um teste de biomarcador de dano citogenético com diversas aplicações (STICH; ROSIN, 1983).

Existem duas principais técnicas desenvolvidas para realizar o teste de MN, uma realizada em linfócitos sanguíneos e outra em células epiteliais da

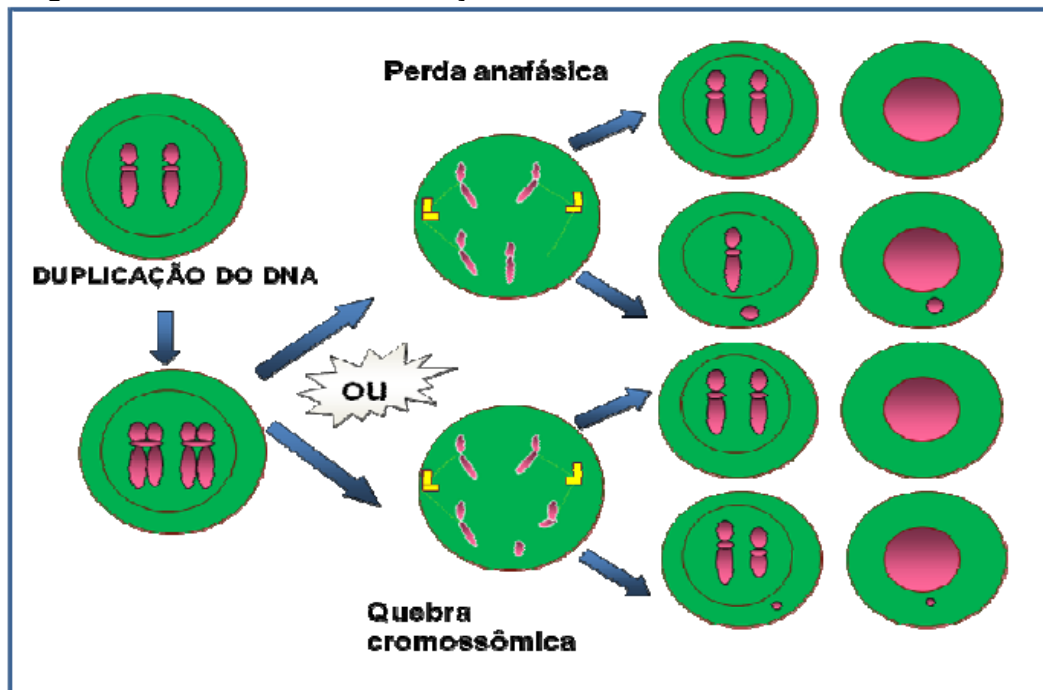
mucosa bucal esfoliadas. Os tecidos epiteliais presentes na mucosa bucal apresentam constante processo de divisão celular, onde ocorre a rápida renovação do tecido pela descamação das células superficiais. As células epiteliais esfoliadas não se dividem mais, assim refletem anormalidades citogenéticas que ocorreram na população de células na camada basal (THOMAS; FENECH, 2011).

Segundo Bloching et al. (2008), a presença de MN na mucosa bucal pode ser um indicador de risco para patologias como o câncer, além de servir como forma de detecção precoce de patologias, também como indicativo de alterações genéticas que possam estar ocorrendo no organismo humano. Estudos mostram que a utilização das análises de células micronucleadas contribuem para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos de substâncias como tabaco, agentes quimiopreventivos, exposição ocupacional e ambiental a agentes tóxicos, radioterapias, hábitos e estilo de vida, câncer e outras doenças (KOPJAR et al., 2002; MINICUCCI et al., 2008; THOMAS; FENECH, 2011).

As células orais micronucleadas caracterizam-se visualmente pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores que apresentam formato arredondado ou oval, com diâmetro podendo variar entre 1/3 a 1/16 do núcleo principal. Os núcleos nas células micronucleadas podem apresentar uma morfologia de células normais ou células em processo de morte celular (FENECH et al., 2000; DARZYNKIEWICZ et al., 2011).

Os MNs devem estar presentes dentro do citoplasma das células originais. A presença dos MNs são um indicativo de perda ou fragmentação cromossômica durante o processo de divisão celular (FENECH, et al., 2003 em consequência de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros, que não se ligam às fibras do fuso e assim não se incluem nos núcleos das células filhas (Figura 6) (SCHMID, 1975).

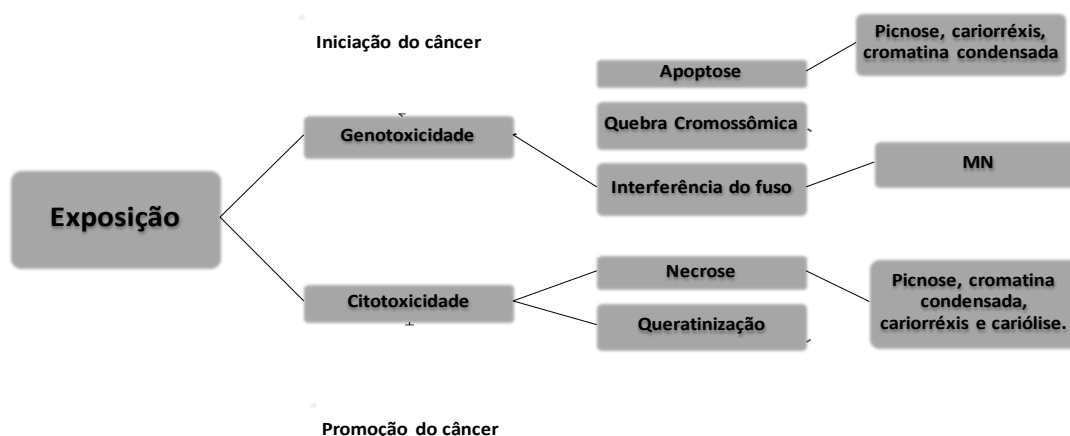
Figura 6: Mecanismo de formação do MN



Fonte: ROCHA, 2011.

A análise de MNs em células esfoliadas da mucosa bucal apresentam vantagens como: a coleta do material apresentar baixo custo e de fácil manuseio, podendo ser aplicada em um grande número de indivíduos de estudo; a identificação das estruturas é relativamente simples; as análises evidenciam a ocorrência de danos genotóxicos no tecido exposto. Além dos MNs, outras alterações nucleares podem ser observadas mediante o mesmo procedimento. Essas alterações são degenerativas e indicadoras de apoptose e/ou necrose, onde demonstram respectivamente os efeitos genotóxicos e citotóxicos (ROCHA, 2011) (Figura 7).

Figura 7: Vias para produção de estruturas contendo DNA extranuclear.



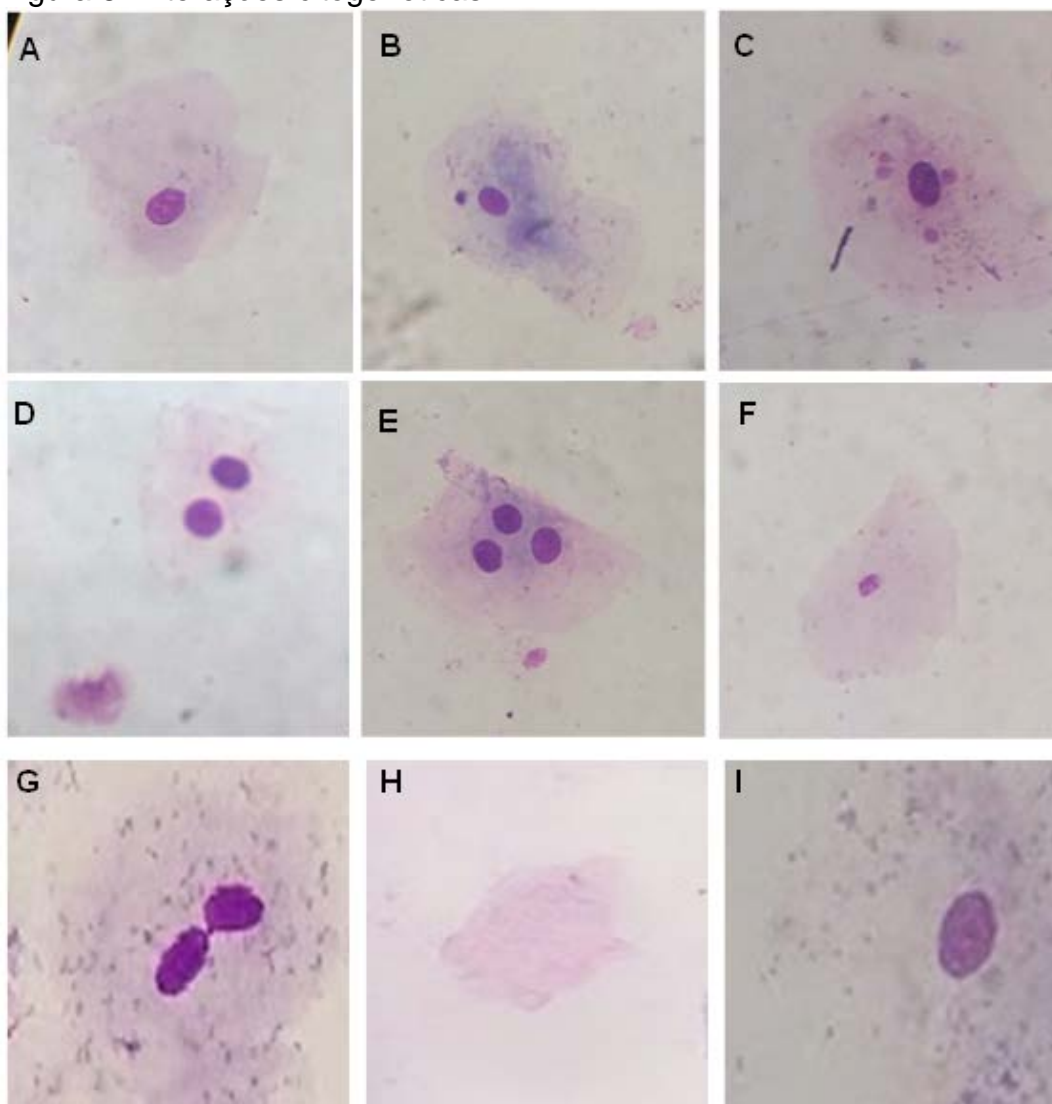
Fonte: Adaptado de TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992.

Por estar em constante renovação, o epitélio bucal apresenta a formação de novas células que são produzidas por mitose na camada basal e que migram para a superfície a fim de substituir aquelas já perdidas. O aparecimento de células alteradas como células picnóticas (núcleos contraídos e com coloração intensa), cariorréxis (núcleo fragmentado com aparência pontilhada), células com cromatina condensada (núcleo com padrão estriado) e cariólise (perda total de material nuclear) são indicativos de morte celular por necrose. A necrose é indicativa de citotoxicidade, podendo estar relacionadas a promoção de câncer, via estimulação da proliferação celular (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

Além dessas alterações, o aparecimento de células binucleadas ou com mais de dois núcleos são indicativas de falha no processo de mitose. Já a formação de brotos nucleares são indicativos de instabilidade genômica, podendo ocorrer devido a uma falha no sistema de reparo do DNA (TOLBERT; SHY; ALLEN, 1992).

A formação de broto nuclear e do MN é semelhante. Isso ocorre devido à presença de DNA no citoplasma durante o processo de divisão celular, onde parte do material é encapsulada por uma película durante a reconstituição da membrana nuclear e síntese de DNA, formando o brotamento que ao se desconectar do núcleo leva a formação de um MN (Figura 8) (LINDEBERG et al., 2007).

Figura 8: Alterações citogenéticas.



Fonte: Próprio autor. A) Célula normal. B) Célula com um micronúcleo. C) Célula com quatro micronúcleos. D) Célula binucleada. E) Célula trinucleada. F) Célula Picnótica. G) Broto nuclear. H) Célula Cariolítica. I) Célula Cariorréxis. Aumento de 1000x. Coloração: Giemsa.

Como alguns agroquímicos, o tabagismo também pode apresentar potencial genotóxico e carcinogênico (FRONZA et al., 2011), a avaliação destes biomarcadores citogenéticos apresenta de extrema importância para identificação de possíveis danos à saúde de indivíduos expostos a estas substâncias.

2.8 Algoritmos de classificação

Aprendizagem de Máquina (AM) é uma subárea da Inteligência Artificial (IA) que utiliza métodos capazes de “aprender” automaticamente extraindo padrões a partir de um conjunto de amostras de exemplo (Coppin, 2010). Estes métodos fazem uso de um vasto ferramental matemático e estatístico e possuem uma ampla gama de aplicações, principalmente em áreas nas quais se deseja extrair conhecimento de um conjunto de dados; como, por exemplo: diagnóstico médico, classificação de imagens de satélite, identificação de furto de energia, fraudes em cartões de crédito, dentre outras (KOERICH, 2012).

Os métodos de aprendizado de máquina utilizam um conjunto de amostras pré-classificadas (comumente referenciado como conjunto de treinamento) para extrair padrões destes exemplos e posteriormente classificar amostras de testes (Martino, 2009). Cada uma das amostras dos conjuntos de treino e teste é composta por um conjunto de características de entrada e um rótulo que representa sua classe (quando este estiver disponível) (Reynol, 2010). Deste modo, estes métodos exigem a classificação (ou rotulação) das amostras a priori por um “especialista” ou conhecimento prévio da natureza das amostras (PEREIRA, 2005).

No caso de métodos de AM que utilizam aprendizado supervisionado, uma vez executado o seu treinamento é necessário estimar sua medida de acurácia (Coppin, 2010). Para este fim, é comumente utilizado um conjunto de teste ou validação, cujas amostras estão rotuladas (Coppin, 2010). Cada amostra deste conjunto é classificada pelo método em questão e o rótulo predito é comparado com o rótulo desejado (Beuren, 2010). Caso o rótulo obtido seja igual ao rótulo verdadeiro da amostra, obteve um acerto; caso contrário, ocorreu um erro de classificação. Utilizando este critério, é possível calcular o percentual de acertos do método de AM empregado, o qual será utilizado como uma métrica de acurácia (Beuren, 2010). Desta forma, esta métrica é sensível ao desequilíbrio de amostras entre classes (Coppin, 2010).

3. CAPÍTULOS

O seguinte estudo deu origem a dois artigos que serão apresentados a seguir.

3.1 Artigo I

O primeiro artigo intitulado “Exposição combinada a agroquímicos e cigarro: impactos sobre o sistema auditivo por aplicação de técnica de aprendizado de máquina” será submetido para publicação no periódico *Environmental Health Perspectives*, Qualis A1 (Ciências Ambientais) - CAPES.

3.2. Artigo II

O segundo artigo foi intitulado “Avaliação citogenética de indivíduos expostos a agroquímicos e cigarro: um estudo de algoritmos de aprendizado de máquina” será submetido para publicação no periódico *Chemico-Biological Interactions*, Qualis A1 (Ciências Ambientais) - CAPES.

Exposição combinada a agroquímicos e cigarro: impactos sobre o sistema auditivo por aplicação de técnica de aprendizado de máquina

Jamile Silveira Tomiazzi¹; Meire Aparecida Judai²; Danillo Roberto Pereira¹.

Patrícia Alexandre Antunes¹; Ana Paula Alves Favareto^{1*}

¹Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. ²Faculdade de Ciências da Saúde - Fonoaudiologia, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

*Autor de Correspondência:

Dra. Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

CEP. 19.067-175. Tel: +55 (18) 3229- 1098

E-mail: anafavareto@unoeste.br (A.P.A. Favareto).

RESUMO

O uso de agroquímicos tem aumentado cada vez mais na agricultura, levando a um problema de saúde pública. Estudos demonstram que alguns agroquímicos e o cigarro isoladamente podem comprometer o sistema auditivo e vestibular, provocando alterações irreversíveis nas vias auditivas periféricas e centrais. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações auditivas de indivíduos expostos a agroquímicos e cigarro de forma isolada ou em conjunto e identificar possíveis padrões de classificação dos grupos de exposição. Cento e vinte e sete participantes foram divididos em quatro grupos: Controle (GC), Tabagista (GT), Agroquímicos (GA) e associação Tabagista e Agroquímicos (GTA). Foram realizados os seguintes exames auditivos: meatoscopia, audiometria tonal liminar, logaudiometria, pesquisa de limiões em alta frequência e imitânciometria. Os dados foram avaliados pelos algoritmos de reconhecimento de padrões *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY) e *Support Vector Machine* (SVM). A avaliação audiológica demonstrou simetria entre as orelhas direita e esquerda, rebaixamento de limiões auditivos em alta frequência, maior incidência de configuração de curva do tipo descendente e alteração de reflexo do músculo estapédico nos três grupos expostos. Houve presença de padrão com a subdivisão de três classes (GC, GT e GA), com melhor classificação observada com o teste SVM. O grupo GC apresentou melhor classificação, com até 95% de acerto nos testes para todas as frequências auditivas. Assim, conclui-se que ambas as substâncias xenobióticas apresentam potencial ototóxico, porém, a utilização combinada não apresenta efeitos aditivos ou de potencialização.

Palavras-chave: Agroquímicos. Aprendizado de máquina. Cigarro. Perda auditiva. Ototoxicidade.

INTRODUÇÃO

Os agroquímicos são amplamente utilizados para o controle de pragas na agricultura, pecuária e em ambiente doméstico (Kim et al., 2016). Entretanto, apesar de ser uma eficiente estratégia, que possibilita o aumento da produtividade e rendimento das culturas (Damalas et al., 2011; Furlan et al., 2015), pode apresentar alto índice de risco à saúde humana (Finkler et al., 2012) e ao meio ambiente (Nasralla Neto et al., 2014).

Desde 2008, o Brasil tornou-se o maior consumidor de agroquímicos do mundo (Anvisa, 2013). Assim, a ampla exposição a estes compostos pode ser considerada um problema de saúde pública. As fontes de exposição aos agroquímicos estão normalmente associadas à contaminação de alimentos (Donkor et al., 2016) e dos recursos não renováveis (águas, solo e ar) (Sharma et al., 2010). Desta forma, a exposição pode ocorrer por ingestão, aspiração e/ou contato dérmico (Donkor et al., 2016).

Apesar destes compostos atingirem a população em geral, as exposições ocupacional e para-ocupacional são as mais preocupantes (Konradsen et al., 2003; Aktar et al., 2009; Deziel et al., 2016). Isto ocorre, pois muitos trabalhadores rurais, especialmente pequenos produtores, desconhecem os reais riscos aos quais estão expostos e a importância do uso preventivo de equipamentos de proteção individual (EPI) adequados (Damalas et al., 2015; Dutta et al., 2016).

Outro problema relevante de saúde pública, cujos efeitos adversos têm sido amplamente documentados, é o tabagismo (Alavanja et al., 2013; Meltzer et al., 2016). As substâncias presentes no cigarro podem ser cumulativas no organismo e capazes de trazer malefícios à saúde durante anos (Kim et al., 2016).

A nicotina presente em sua composição apresenta características altamente viciantes, causando dependência psíquica e física (Dunbar et al., 2014). Além disso, substâncias, como os metais pesados, presentes em sua composição, apresentam toxicidade e podem levar à grande prejuízo à saúde (Meltzer et al., 2016).

A audição apresenta papel fundamental para a comunicação humana (Agrawal; Platz; Niparko, 2008). As estruturas presentes na orelha externa, média e interna são responsáveis por todo o processo de captação,

transporte e decodificação do som (Cogo et al., 2016). Assim, lesões traumáticas, medicamentosas e causadas pelo envelhecimento ou por exposição a substâncias químicas podem levar à perda auditiva (Li-Korotky, 2012).

A ototoxicidade é o resultado de ações tóxicas de diferentes substâncias químicas, que apresentam características capazes de lesionar o labirinto anterior e/ou posterior, resultando em perda auditiva com diferentes manifestações (Bilski, 2003). Vários estudos, em animais e humanos, têm demonstrado que a exposição isolada a agroquímicos ou cigarro pode causar ototoxicidade (Mizoue et al., 2003; Wild et al., 2005; Agrawal et al., 2008; Cogo et al., 2016), com implicações sobre os sistemas auditivo e vestibular (Crawford et al., 2008).

O cigarro apresenta características que podem aumentar a viscosidade e pressão sanguínea na cóclea, levando a uma falta de oxigenação no sangue e obstruções vasculares (Rogha et al., 2015). Já os agroquímicos podem levar a lesões agudas nas células ciliadas externas e danos a terceira espira coclear, progredindo até a espira basal (Körbes et al., 2010). Ambas as substâncias interferem diretamente na funcionalidade da cóclea, levando assim a uma perda auditiva irreversível (Chung et al., 2009).

A aplicação de algoritmos de aprendizado de máquina tem sido realizada de forma bem sucedida em pesquisa na área médica e biológica. Com o objetivo de extrair conhecimento e aplicá-los em novas tarefas e tomada de decisões (Cristianini; Shawe-Taylor, 2001). Alguns estudos têm relatado boas perspectivas para a previsão e monitoramento de ototoxicidade induzida por drogas (Zhou et al., 2014) e ruído (Konrad-Martin et al., 2012), a partir da utilização de modelos de avaliação de risco construídos usando aprendizado de máquina.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos ototóxicos da exposição associada a agroquímicos e cigarro em trabalhadores rurais, por meio da avaliação audiológica básica e pesquisa de limiares auditivos em alta frequência. Além disso, pretendeu-se identificar padrões de classificação dos grupos de exposição com o uso de algoritmos de aprendizado de máquina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra populacional

Foi realizado um estudo observacional, prospectivo e transversal, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Oeste Paulista, sob protocolo CAAE nº 48083715.4.0000.5515.

A mobilização dos participantes foi realizada em parceria com Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST/PP) de Presidente Prudente - SP.

A amostra populacional foi composta por 127 indivíduos, de acordo com os seguintes critérios de inclusão: idade entre 18 a 39 anos, ser de ambos os sexos. Os critérios de exclusão foram: apresentar perdas auditivas genéticas, pré e perinatais, ter realizado tratamento quimioterápico e exposição ocupacional ao ruído. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os participantes foram alocados em quatro grupos de estudo de acordo com suas características. Grupo Controle (GC) – indivíduos que não fumavam e não tinham contato com agroquímicos; Grupo Tabagista (GT) – indivíduos que fumassem o mínimo de cinco cigarros/dia a pelo menos um ano; Grupo Agroquímicos (GA) – indivíduos com exposição ocupacional a agroquímicos a pelo menos um ano e Grupo exposto ao Tabagismo e Agroquímicos (GTA) – com as características dos dois grupos anteriores.

Todos os participantes preencheram um questionário, com dados pessoais, ocupacionais e sobre a saúde geral e auditiva. Foram abordadas questões referentes à exposição aos agroquímicos (tempo de exposição, tipos de agroquímicos utilizados, modo de aplicação, utilização de EPI, quadros de intoxicação e sintomas apresentados), ao hábito de fumar (tempo e quantidade de cigarros consumidos diariamente), aspectos auditivos (dificuldades para ouvir e presença de zumbido) e ao uso de fones de ouvido para dispositivos eletrônicos.

Exames audiológicos

Os procedimentos audiológicos realizados seguiram os padrões estabelecidos pela Associação Americana para Fala, Linguagem e Audição (ASHA) e pelo Manual de Procedimentos em Audiometria Tonal, Logaudiometria e Medidas de Imitância Acústica descritos no Conselho Federal de Fonoaudiologia (2013),

Inicialmente foi realizada meatoscopia, a fim de verificar qualquer possível impedimento para a realização dos demais exames, como presença de corpo estranho e acúmulo de cera obstrutiva. Foi encontrado em três participantes do GA e em dois do GC um acúmulo de cera obstrutiva, impedindo assim a realização dos exames. Esses indivíduos foram encaminhados ao serviço de otorrinolaringologia, para avaliação clínica e conduta do caso, retornando para a realização dos exames auditivos, assim que liberados pelo médico responsável.

Posteriormente, foi realizada audiometria tonal liminar nas frequências de 250 a 8.000KHz, com o intuito de verificar o mínimo de tom puro identificado pelo participante, seguido da audiometria vocal (logaudiometria), que permite identificar o menor Limiar de Recepção de Fala (LRF) e o Índice Percentual de Reconhecimento de Fala (IPRF). A pesquisa dos limiares em alta frequência de 9.000 a 16.000KHz, permite identificar os sons mais agudos percebidos pelo participante, sendo que as frequências analisadas (9.000 a 16.000KHz) são as máximas permitidas pelo equipamento utilizado (AC40 interacoustics).

Os exames foram realizados com o paciente dentro de uma cabinatratada acusticamente para total isolamento do som. Os fones utilizados foram TDH39 Audiometric Headset e R-80 KOSS headset, de acordo com os padrões EN60645-4/ANSI S3.6. A imitânciometria foi realizada por meio do equipamento AT235 XP– Interacoustics devidamente calibrado, com o objetivo de verificar a mobilidade da cadeia tímpano-ossicular e ação do reflexo do músculo estapediano em ipsi e contralateral.

Os resultados das avaliações audiológicas foram interpretados e analisados por intermédio de audiogramas, sendo considerados os limiares tonais apresentados por frequência medida em Hertz (Hz), subdivididas em graves (250 e 500KHz), médias (1.000 e 2.000KHz), agudas (3.000, 4.000,

6.000 e 8.000KHz), altas grupo I (9.000, 10.000 e 11.200KHz) e altas grupo II (12.500, 14.000 e 16.000KHz). As intensidades sonoras foram medidas em decibel (dB). O grau de perda auditiva foi classificado de acordo com Lloyd e Kaplan (1978) e o tipo de perda auditiva, segundo Silman e Silverman (1997). A configuração de curva audiométrica foi avaliada de acordo com estudo de Silman e Silverman (1997), com adaptação de Carhart (1945) e Lloyd e Kaplan (1978). A logoaudiometria, a timpanometria e o reflexo estapediano foram analisados segundo procedimentos descritos por Jerger, Speaks e Trammel (1968), Jerger (1970) e Gelfand (1984) e Jerger e Jerger (1989), respectivamente. Todas as avaliações foram realizadas em 30 indivíduos por grupo de estudo, com exceção do grupo controle que apresentou 37 participantes. No teste de imitânciometria, houve uma variação no número de participantes, sendo: GC (n=37), GT (n=29), GA (n=28) e GTA (n=26). Isso ocorreu devido ao fato de ocorrer o mau vedamento de orelha média, impedindo assim a realização dos exames.

Algoritmos de classificação

As análises computacionais foram realizadas por intermédio de diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões, de modo a verificar a existência de padrões no diferentes dados coletados. Para a verificação da existência/reconhecimento de padrões foram utilizadas 5 diferentes faixas de frequência, são elas: grave, média, aguda, alta grupo I, e alta grupo II. De modo a realizar experimentos robustos, foram utilizados diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY) e *Support Vector Machine* (SVM). Com intuito de manter a clareza e facilitar a discussão dos resultados, foi utilizado matriz de confusão.

A matriz de confusão ou de classificação foi criada a partir de um conjunto de dados divididos em categorias, que determinaram se os resultados (valores) esperados correspondem ao valor real, sendo o total desses resultados exibidos em uma matriz.

Métricas de avaliação estatística

Para comparação das médias dos quatro grupos de estudo foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste *a posteriori* de Dunn. Para comparação dos dados de proporção foi utilizado o teste exato de Fisher. A comparação dos limiares auditivos entre as orelhas direita e esquerda foi realizada pelo teste Wilcoxon pareado.

O limite de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado para as análises foi o GraphPad InStat 3.0.

Para as análises computacionais foi utilizada a métrica de acurácia propostas por Papa et al. (2009), que leva em consideração o desequilíbrio entre classes. Sua precisão é medida considerando que as classes podem apresentar diferentes quantidades de amostras, vide Fórmula (1):

$$e_{i,1} = \frac{FP_i}{|D_2| - |D_2^i|}$$

Na fórmula (2), k representa o número de classes, D_2 o número de amostras. O taxa de atribuição das frequências auditivas foi medida pelo i e FP e FN_1 , onde representam o número de falsos positivos e negativos. O número de amostras classificadas como i em D_2 e o número de amostras da classe i que forem incorretamente classificadas são apresentadas como b .

$$e_{i,2} = \frac{FN_i}{D_2^i}, i = 1, 2, \dots, K,$$

O total de erros da classe foi então demonstrado vide formula (3):

$$E_i = e_{i,1} + e_{i,2}$$

Na última etapa, aferiu-se a acurácia das alterações analisadas, submetidas a um sistema de grade, proporcionando uma amostragem sistemática. Após isso, determinou-se um arquivo raster no qual foram alocados os dados do grupo sem a exposição (GC) e os grupos expostos (GT, GA e GTA), em cada um dos pontos de cruzamento das linhas raster. As

informações de “veracidade de campo” foram inseridas e analisadas dentro dos índices de acurácia descritos por Brites et al. (1996) podendo ser vistas através das seguintes equações: Exatidão Global ($G = [\sum_{i=1}^M n_{ii}] / N$); Kappa ($K = [P_o - P_c] / [1 - P_c]$); Tau ($T = [P_o - 1/M] / [1 - 1/M]$).

Por fim, a equação $\sum_{i=1}^M n_{ii}$ = somatório dos pontos corretamente classificados dentro de cada classe onde N = número total de pontos contemplados na matriz; P_o = proporção de unidades que concordam plenamente; P_c = proporção de unidades que concordam por casualidade; e M = número de categorias na classificação. A precisão dos valores demonstrados com a acurácia (Acc) pode ser definida pela equação:

$$Acc = 1 - \frac{\sum_{i=1}^K E_i}{2K}$$

Essas fórmulas permitem avaliar de forma confiável o real desempenho dos valores de frequências auditivas e suas respectivas classes. Todo o treinamento e teste dos algoritmos de classificação foram feitos em um computador com um processador Intel i7 5500U com 8GB de RAM, usando Linux como operacional.

RESULTADOS

Caracterização da população de estudo

A idade e gênero dos participantes foram distribuídos de forma homogênea entre os grupos de estudo (Tabela 1). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no tempo de exposição a agroquímicos entre GA e GTA ou de exposição ao tabagismo entre GT e GTA. Além disso, o tempo de exposição a estes compostos e o número de cigarros consumidos diariamente foi semelhante ($p > 0,05$) entre os gêneros masculino e feminino (Tabela 1).

Os participantes dos grupos GA e GTA relataram o uso dos seguintes agroquímicos: inseticidas piretróides (deltamitrina; cipermetrina); inseticidas organofosforados (parationa metílica, clorpirifós, succinato de dietila), inseticida formamídínico e carrapaticida (amitraz) e herbicida (glifosato). Entre

os participantes destes grupos, 85% relataram exposição ocupacional concomitante a mais de um composto.

Entre os participantes avaliados, 95% (GA) e 91% (GTA) relataram ter contato direto com agroquímicos por meio de aplicação costal e manual. A forma indireta de contato, com exposição por meio de pulverização aérea, nas regiões próximas as suas residências e locais de trabalho, foi relatada por 95% (GA e GTA) dos participantes. Além disso, a utilização de EPIs foi citada por 23% dos participantes do GA e 20% do GTA. No entanto, os equipamentos citados (luvas, botas, máscaras, camisas de manga longa e chapéu) não estavam adequados e de acordo com as normas específicas de proteção individual da categoria (NR-9).

Em relação aos possíveis casos de intoxicações aguda por agroquímicos, 53% (GA) e 36% (GTA) relataram ter sofrido sintomas como náusea, vômito, cefaleia e gastralgia no momento da aplicação ou nas horas subsequentes. Com relação à percepção auditiva, os participantes relataram zumbido contínuo de pitch alto bilateral, com maior incidência ($p < 0,05$) nos grupos expostos a agroquímicos e tabagismo isolados ou em combinação, em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Avaliações Audiológicas

Como a utilização de fones de ouvido comuns para dispositivos eletrônicos pode ser um possível fator de interferência na avaliação auditiva, inicialmente os participantes do grupo controle foram subdivididos em usuários e não usuários. Os indivíduos usuários corresponderam a 38% dos participantes do grupo controle (GC) e estes relataram utilizar em média quatro vezes na semana, por um período maior que 2 horas/dia, apresentando pequenos intervalos de descanso. A comparação dos limiares auditivos em frequências convencionais e em alta frequência demonstrou não haver diferença significativa entre indivíduos usuários e não usuários ($p < 0,05$) (dados não mostrados). Desta forma, as demais avaliações não contemplaram esta subdivisão dos grupos.

A comparação dos limiares auditivos entre as orelhas direita e esquerda demonstrou haver simetria ($p > 0,05$) entre elas (dados não

mostrados). Assim, para as demais comparações entre os grupos não houve subdivisão das orelhas.

Em todas as frequências analisadas foi observada maior ($p < 0,05$) incidência de perda de limiares auditivos nos grupos expostos (GT, GA e GTA) em relação ao GC. As frequências de 250, 500, 1000, 8000KHz e as altas frequências, com exceção de 9000KHz, foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos expostos (GT, GA e GTA). No entanto, as demais frequências foram maiores ($p < 0,05$) nos grupos expostos aos agroquímicos (GA e GTA) em relação ao GT (Tabela 3).

O número de indivíduos avaliados por faixas de frequências (graves e médias) não demonstraram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos (Figura 1A e 1B). Já nas frequências agudas, somente o GT e GA foram semelhantes (Figura 1C), e em alta frequência grupo I e II, a diferença ocorreu entre os três grupos expostos em relação ao GC (Figura 1D e E).

A incidência de configuração de curva audiométrica do tipo descendente acentuada, descendente em rampa, horizontal e outras foram similares entre todos os grupos nas frequências convencionais. No entanto, a curva do tipo descendente leve mostrou-se aumentada ($p < 0,05$) nos grupos GA e GTA em relação ao GC. Além disso, houve uma redução ($p < 0,05$) da incidência de curva do tipo ascendente em GTA em relação ao GC e GT. Em alta frequência, as curvas do tipo descendente leve, descendente acentuada e descendente em rampa aumentaram ($p < 0,05$) nos grupos expostos em relação ao GC, enquanto a curva ascendente e horizontal demonstrou incidência reduzida ($p < 0,05$) nesses grupos (Tabela 5).

Em relação ao teste de reconhecimento de fala, somente um dos participantes (GTA) apresentou moderada dificuldade para reconhecer a fala.

A avaliação timpanométrica demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a diminuição da incidência de configuração de curva do tipo A nos grupos GA e GTA em relação ao GC e GT. Já a curva do tipo AD foi significativamente apenas no GTA em relação aos demais. Em relação a curva do tipo AR, todos os grupos apresentaram características semelhantes. O número de alterações do reflexo do músculo estapediano no grupo GA e GTA apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao GC e GT (Tabela 6).

Análise dos algoritmos de classificação

As análises realizadas através do método de Aprendizagem de Máquinas (AM) foram realizadas de maneira individual, segundo as faixas de frequências auditivas, sendo elas: graves, médias, agudas, altas I e II. Os testes aplicados foram: *ANN*, *BAY* e *SVM* (Figura 3). O teste *SVM* foi o que apresentou melhores valores com relação à matriz de confusão (Tabelas 7 e 8).

O grupo controle (GC) apresentou melhor classificação, considerando ambas as divisões de classes (com e sem GTA) (Tabelas 7 e 8), com valores de até 95% de acerto nos testes para todas as frequências auditivas.

Ao considerar apenas a subdivisão de três classes, compostas pelos grupos expostos isoladamente (GT e GA), os valores médios de acerto foram de 26 a 53% nas diferentes frequências auditivas (Tabela 7). Quando os quatro grupos foram comparados (Tabela 8), o número de acertos nos grupos isolados (GT e GA) manteve a variação esperada para o teste (20 a 86%). No entanto, o GTA apresentou valores reduzidos (0 a 40%), demonstrando não reconhecer os valores devido a similaridade entre os grupos (GT e GA).

Todos os testes utilizados apresentaram similaridade na avaliação da acurácia, de acordo com o tamanho da amostra usada para o treinamento. Assim, apenas os dados de *SVM*, que indicam maior acurácia quando analisados com os quatro grupos de estudo (Figura 2A) e com a exclusão do GTA (Figura 2B), foram mostrados.

DISCUSSÃO

A ampla utilização de agroquímicos no controle de pragas na agricultura, pecuária e demais ambientes, como o doméstico, tem se tornado um fator preocupante, considerando a saúde da população em geral e de trabalhadores rurais (Finkler et al., 2012; Kim et al., 2016). O manuseio destas substâncias de forma direta e sem o uso de EPI's adequados como máscaras, luvas, macacão, dentre outros (Damalas et al, 2015; Dutta et al., 2016) pode levar a impactos na saúde geral e especialmente auditiva (Agrawal et al., 2008; Cogo et al., 2016), conforme observado no presente estudo.

Os agroquímicos podem apresentar diferentes rotas de exposição, como por contato manual, aspiração ou por ingestão de alimentos e água contaminados. Desta forma, a exposição pode acarretar no aumento de intoxicações agudas, com o aparecimento de diferentes sinais e sintomas (Kim et al., 2016). No presente estudo, os principais sintomas agudos, de manifestação imediata ou em poucas horas após a aplicação, relatados pelos trabalhadores foram náusea, vômito, cefaleia e gastralgia. No estudo de Donkor et al. (2016), trabalhadores africanos apresentaram estes mesmos sintomas após a aplicação de diferentes tipos de agroquímicos.

Atualmente verifica-se um hábito muito presente, especialmente entre os jovens, que é a utilização de fones de ouvido. Como a sua utilização poderia ser caracterizada como um fator de interferência para os achados auditivos, esta foi considerada e avaliada no presente estudo. No entanto, a comparação dos limiares auditivos de indivíduos usuários e não usuários de fone de ouvido (grupo controle) demonstrou não haver diferença significativa.

Estes resultados corroboram com estudo de Silvestre et al. (2016), que realizaram a pesquisa dos limiares auditivos em alta frequência (9.000 a 16.000KHz) em 125 adolescentes, divididos segundo características de exposição (tempo, duração e intensidade). Já Sulaiman et al. (2013) avaliaram 177 usuários de fones de ouvido por intermédio de avaliação audiológica convencional (250 – 8.000KHz) e em alta frequência (9.000-16.000KHz) e observaram perda de limiares em duas faixas de frequências (11.200 e 14.000KHz). Após a exclusão da possibilidade de interferência do uso de fones de ouvido, foi realizada a investigação dos possíveis impactos auditivos causados pela exposição aos agentes xenobióticos isolados ou em combinação.

O zumbido e a dificuldade para ouvir ou compreender a fala pode ser um fator de alerta para uma perda auditiva (Searchfield et al., 2007; Ukaegbe et al., 2016). No presente estudo, os três grupos expostos apresentaram 50% ou mais de relatos sobre problemas para ouvir e/ou zumbido bilateral contínuo, o que concordou com os resultados de perda de limiares auditivos observados.

Gomez et al. (2001) realizaram a aplicação de questionário e avaliação audiométrica em agricultores e verificaram que 36% apresentaram perda

auditiva autorreferida. Além disso, 9% dos avaliados apresentaram perda nos limiares de 500, 1.000 e 2.000KHz, 28% em 1.000, 2.000, 3.000 e 4.000KHz e 47% em 3.000, 4.000, 6.000 e 8.000KHz. Tal fato evidencia a importância da realização de anamnese e pôde ser observado no presente estudo, já que grande parte dos participantes expostos relatou a autopercepção de dificuldades auditivas.

Os indivíduos dos quatro grupos apresentaram similaridade entre as orelhas em todos os limiares, não apresentando rebaixamento dos limiares (≤ 25 dB) em frequências convencionais. Porém, as altas frequências dos três grupos expostos demonstraram-se prejudicadas.

Hoshino et al. (2008) realizaram um estudo com 18 trabalhadores rurais expostos a compostos a base de organofosforados, com idades entre 16 e 59 anos. Os achados demonstraram que 16 trabalhadores apresentaram alteração de equilíbrio corporal e sete apresentaram perda auditiva neurossensorial. Teixeira et al. (2002) também identificaram perda auditiva central em indivíduos expostos a organofosforados e piretróides, compostos também relatados pelos trabalhadores do presente estudo. Tais informações sugerem que o uso dessas substâncias pode resultar em alterações vestibulares por meio de sua exposição crônica.

Além dos agroquímicos, o cigarro também apresenta características capazes de afetar a audição, conforme observado no estudo e segundo relatos obtidos por intermédio de anamnese. Sharabi et al. (2002) realizaram a avaliação audiológica básica em indivíduos do sexo masculino com hábito tabagista, com faixa etária de 20 a 68 anos. A prevalência de perda auditiva nos indivíduos com menos de 35 anos foi de 4,5% em comparação a 10,5% entre aqueles com mais de 35 anos. Em ambas as idades, 11,8% do grupo de fumantes apresentou comprometimento neurossensorial em relação a 8,1% dos não fumantes.

Nakanishi et al. (2000) verificaram perda dos limiares em alta frequência em homens com idade entre 30 e 59 anos fumantes. Corroborando com o estudo, já que o GT apresentou perda de limiares auditivos somente em alta frequência.

A configuração de curva audiométrica apresentou-se de forma variada, sendo a maior incidência de curvas do tipo horizontal em frequências

convencionais e descendentes em alta frequência nos grupos expostos. Isto indica uma queda dos limiares nessas faixas de frequência (alta grupo I e II), demonstrando que elas são mais sensíveis à exposição aos xenobióticos.

O reconhecimento de padrões é uma das funcionalidades mais importantes da inteligência artificial (Papa et al., 2012). Alguns estudos tem demonstrado a eficiência do procedimento de classificação por máquinas na área médica e biológica (Van Heerden et al., 2008; Patel et al., 2009; Al-Shayia, 2011; Yilmaz, et al., 2016; Altman, 2017). No entanto, este foi o primeiro estudo que utilizou esta ferramenta para correlacionar as alterações de limiares auditivos em frequências convencionais e em alta frequência em indivíduos expostos de maneira isolada e combinada a agentes xenobióticos (cigarro e agroquímicos).

A análise de aprendizado de máquina identificou um padrão na distribuição das alterações auditivas entre os grupos de exposição isolada e o controle, confirmando a diferença significativa entre estes grupos. O teste SVM foi o mais eficiente para identificação da presença de padrão, o que concorda com estudo de Zhou et al., (2014), onde 85% dos conjuntos de treinamento foram classificados como verdadeiros quando analisados quanto aos riscos de ototoxicidade por fármacos.

Konrad-Martin et al. (2012) sugerem que as abordagens multivariadas, avaliadas através de análises de padrão aplicadas junto ao diagnóstico de perdas auditivas, aumentam a confiabilidade na análise dos resultados e auxiliam no monitoramento e prevenção dos possíveis causadores de danos auditivos, corroborando assim com o estudo, que identificou o comprometimento auditivo dos grupos expostos a ambos os agentes xenobióticos, indicando a não potencialização ou efeito aditivo quando utilizados em conjunto.

CONCLUSÃO

A exposição aos agentes xenobióticos isolados ou em combinação levou a uma maior incidência de perda dos limiares auditivos em alta frequência, bem como, a maior prevalência de configuração de curva do tipo descendente. O uso combinado dos agroquímicos e cigarro não demonstrou efeito aditivo ou potencializador sobre as alterações auditivas observadas e

analisadas por meio de técnica de aprendizado de máquina. Fica claro, que indivíduos expostos estão mais susceptíveis a problemas de saúde e futura perda auditiva, com impacto sobre a qualidade de vida.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa PROSUP concedida e à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de Atividades de 2011 e 2012. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
- Agrawal, Y., Platz, E.A., Niparko, J.K., 2008. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics among US adults. Arch. Intern Med. 14, 1522 -30.
- Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdiscip Toxicol. 1, 1-12.
- Alavanja, M.C., Ross, M.K., Bonner, M.R., 2013. Reply to increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. CA Cancer J Clin. 2, 120-42.
- Altman, R.B., 2017. Artificial Intelligence (AI) Systems for Interpreting Complex Medical Data Sets. Clin. Pharmacol. Ther 9.
- Al-Shayea, Q.K., 2011. Artificial Neural Networks in Medical Diagnosis. Int J Computer Science Issues 2:150-154.
- Bilski, B., 2003. Interaction between noise and ototoxic agents in the work environment. Med Pr. 5, 481-85.
- Chung, D.Y., Gannon, R. P., Mason, K., 2009. Factors affecting the prevalence of tinnitus. Audiology. 5, 441-52.

- Cogo, L.A., Santos-Filho, V.A., Murashima Ade, A., Hyppolito, M.A., Silveira, A.F., 2016. Morphological analysis of the vestibular system of guinea pigs poisoned by organophosphate. *Braz J Otorhinolaryngol.* 1, 11-16.
- Crawford, J.M., Hoppin, J.A., Alavanja, M.C., Blair, A., Sandler, D.P., Kamel, F., 2008. Hearing Loss among Licensed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study Running title: Hearing Loss among Licensed Pesticide Applicators. *J Occup. Environ Med.* 7, 817-26.
- Cristianini, N., Shawe-Taylor, J., 2000. An Introduction to Support Vector Machines and other kernel-based learning methods. Cambridge University Press.
- Coppin, B. Inteligência artificial. Rio de Janeiro: LTC, 2010.
- Damalas, C.A., Abdollahzadeh, G., 2015. Farmer's use of personal productive equipment during handling of plant protection products: Determinants of implementation. *Sci Environ total.* 571, 730-36.
- Damalas, C.A., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticides exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 8, 1402-19.
- Deziel, N.C., Beane Freeman, L.E., Graubard, B.I., Jones, R.R., Hoppin, J.A., Thomas, K., Hines, C.J., Blair, A., Sandler, D.P., Chen, H., Lubin, J.H., Andreotti, G., Alavanja, M.C., Friesen, M.C., 2016. Relative Contributions of Agricultural Drift, Para-Occupational, and Residential Use Exposure Pathways to House Dust Pesticide Concentrations: Meta-Regression of Published Data. *Environ Saúde Perspect.*
- Donkor, U., Osei-Fosu, P., Dubey, B., Kingsford-Adaboh, R., Ziwu, C., Asante, I., 2016. Pesticide residues in fruits and vegetables in Ghana: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*
- Dunbar, M.S., Shiffman, S., Kirchner, T.R., Tindle, H.A., Scholl, S.M., 2014. Nicotine dependence, "background" and cue-induced craving and smoking in the laboratory. *Drug and Alcohol Dependence.* 142, 197-03.
- Dutta, S., Bahadur, M., 2016. Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. *Toxicology Mechanisms and methods.* 0, Iss. Ja,0.

- Finkler, A.D., Silveira, A.F., Munaro, G., Zanrosso, C.D., 2012. Otoprotection in guinea pigs exposed to pesticides and ginkgo biloba. *Bras J Otorhinolaryngol.* 3, 122-28.
- Furlan, L., Kreuzweiser, D., 2015. Alternatives to neonicotinoid insecticides for pest control: case studies in agriculture and forestry. *Environ. Sci Pollut Res Int.* 1, 135-47.
- Gomes, M.I., Hwang, S.A., sobotova, L., Stark, A.D., Maio, J.J., 2001. A comparison of self-reported hearing loss and audiometry in a cohort of New York farmers. *J. Speech Lang Hear Res.* 6:1201-8.
- Hoshino, A.C., Pacheco-Ferreira, H., Taguchi, C.K., Tomita, S., Miranda Mde, F., 2008. Ototoxicity study in workers exposed to organophosphate. *Braz J. Otorhinolaryngol* 6:912-18.
- Kim, K.H., Kabir, E., Jahan, S.A., 2016. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ.* 16.
- Konrad-Martin, D., Reavis, K.M., McMillan, G.P., Dille, M.F., 2012. Multivariate DPOAE metrics for identifying changes in hearing: perspectives from ototoxicity monitoring. *Int J Audiol.* 51, 51-62.
- Konradsen, F., Van der Hoer, W., Cole, D.C., Hutchinson, G., Daisley, H., Singj, S., Eddleston, M., 2003. Reducing acute poisoning in developing countries options for restricting the availability of pesticides. *Toxicologia.* 2-3, 249-61.
- Li-Korotky, H. S., 2012. Age-Related Hearing Loss: Quality of Care for Quality of Life. *Gerontologist.* 52. 2. 265-271.
- Meltzer, H.M., Alexander, J., Brantsaeter, A.L., Borch-lohnsen, B., Ellingsen, D.G., Thomassen, Y., Holmen, J., Ydersbond, T.A., 2016. The impact of iron status and smoking on blood divalent metal concentrations in Norwegian women in the HUNT2 study. *J. Traço. Elem. Med. Biol.* 16.
- Mizoue, T., Miyamoto, T., Shimizu, T., 2003. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. *Occup. Environ Med.* 1, 56-59.
- Nakanishi, N., Okamoto, M., Nakamura, K., Suzuki, K., Tatara, K., 2000. Cigarette smoking and risk for hearing impairment: a longitudinal study in Japanese male Office workers. *J Occup Environ Med.* 11:1045-9.

- Nasralla Neto, E., Lacaz, F.A., Pignati, W.A., 2014. Health surveillance and agribusiness: the impact of pesticides on health and the environment. *Danger ahead!*. *Cien Saúde Colet.* 12, 4709-18.
- Papa JP, Falcão AX, Suzuki CTN. Supervised pattern classification based on Optimum-Path Forest. *Int J Imaging Syst Technol.* 2009; 19: 120-131.
- Papa JP, Albuquerque VHC, Falcão AX, Tavares JMRS. Efficient supervised Optimum-Path Forest classification for large datasets. *Pattern Recognit.* 2012; 45: 512-520.
- Patel, V.L., Shortliffe, E.H., Stefanelli, M., Szolovits, P., Berthold, M.R., Bellazzi, R., Abu-Hanna, A., 2009. The coming of age of artificial intelligence in medicine. *Artific Intelligence Med* 1:5-7.
- Sharabi, Y., Reshef-Haran, I., Burstein, M., Eldad, A., 2002. Cigarette smoking and hearing loss: lessons from the young adults periodic examinations in Israel (YAPEIS) database. *IMAJ.* 4:1118-20.
- Rogha, M., Hashimi, M., Askari, N., Abtahi, SH., Sepehrnejad, M., Nilforoush, MH., 2015. Cigarette smoking effect on human cochlea responses. *Adv Biomed Res.* 4:148.
- Sharma, D., Nagpal, A., Pakade, Y.B., Katnoria, J.K., 2010. Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: a review. *Talanta.* 4, 1077-89.
- Silvestre, R.A.A., Ribas, A., Hammerschmidt, R., de Lacerda, A.B.M., 2016. High-frequency profile in adolescents and its relationship with the use of personal stereo devices. *J Pediatr.* 92:206-11.
- Sulaiman, A.H., Seluakumaran, K., Husain, R., 2013. Hearing risk associated with the usage of personal listening devices among urban high school students in Malaysia. *Saúde Publica.* 8:710-5.
- Teixeira, C.F., Augusto, G.S.L., Morata, T.C., 2002. Occupational exposure to insecticides and their effects on the auditory system. *Ruído Saúde.* 14:31-39.
- Ukaegbe, O., Ezeanolue, B., Oriji, F., 2016. The influence of tinnitus on the audiometric threshold of sufferers. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* 4:339-43.
- Van Heerden, B., Aldrich, C., du Plessis, A., 2008. Predicting student performance using artificial neural network analysis. *Med Educ.* 5:516-517.
- Wild, D.C., Brewster, M.J., Banerjee, A.R., 2005. Noise-induced hearing loss is exacerbated by long-term smoking. *Clin Otolaryngol.* 6, 517-20.

Yilmaz, A., Ari, S., Kocabiçak, U., 2016. Risk analysis of lung cancer and effects of stress level on cancer risk through neuro-fuzzy model. *Comput. Methods. Programs Biomed.* 137. 35-46.

Zhou, S., Li, G.B., Huang, L.Y., Xie, H.Z., Zhao, Y.L., Chen, Y.Z., Li, L.L., Yang, S.Y., 2014. A prediction model of drug- induced ototoxicity developed by an optimal support vector machine (SVM) method. *Comput Biol Med.* 51, 122-7.

1. Caracterização da população

Caracterização		GC	GT	GA	GTA
¹Número amostral n (%)	M	15 (41)	19 (63)	10 (33)	19 (63)
	F	22 (59)	11 (37)	20 (67)	11 (37)
²Média de idade (anos)	M	29,78 ± 6,32	26,34 ± 6,83	31,66 ± 6,63	29,97 ± 5,59
	F	27,15 ± 8,17	32,33 ± 7,18	30,27 ± 6,59	32,00 ± 4,25
²Exposição à Agroquímicos	M	-	-	15,50 ± 9,51	13,80 ± 9,82
	F	-	-	14,90 ± 6,53	14,73 ± 9,35
²Exposição ao Tabagismo	M	-	8,06 ± 6,23	-	8,57 ± 6,65
	F	-	9,13 ± 6,73	-	10,81 ± 5,33
²Cigarros/dia	M	-	11,40 ± 3,85	-	11,00 ± 5,83
	F	-	9,66 ± 3,81	-	10,83 ± 4,26

¹Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%). ²Valores expressos como média ± desvio padrão, com tempo médio de exposição e número de cigarros consumidos por dia. Teste Kruskal - Wallis com teste *a posteriori* de Dunn ($p > 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos e cigarro. M = masculino, F = feminino.

Tabela 2. Percepção auditiva em relação a dificuldades para ouvir e presença de zumbido.

Percepção auditiva	GC	GT	GA	GTA
Queixa auditiva	1 (3) ^a	16 (53) ^b	15 (50) ^b	17 (57) ^b
Zumbido	1 (3) ^a	17 (57) ^b	19 (64) ^b	21 (70) ^b
¹Bilateral	1 (100) ^a	15 (94) ^b	14 (82) ^b	13 (72) ^b
¹Ruído contínuo	1 (100) ^a	16 (94) ^b	13 (68) ^b	12 (57) ^b

Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%). ¹Frequência e porcentagem em relação aos indivíduos que relataram presença de zumbido. Teste exato de Fisher. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 3. Comparação dos limiares auditivos em frequências isoladas de ambas as orelhas entre os grupos de estudo.

Frequências	GC	GT	GA	GTA
250KHz	7,77 ± 4,83 ^a	12,00 ± 7,02 ^b	14,91 ± 7,04 ^b	13,83 ± 8,09 ^b
500KHz	7,56 ± 5,50 ^a	11,58 ± 6,47 ^b	13,25 ± 6,29 ^b	13,33 ± 7,73 ^b
1.000KHz	6,28 ± 5,49 ^a	9,16 ± 5,05 ^b	11,58 ± 4,99 ^b	11,58 ± 7,45 ^b
2.000KHz	2,43 ± 7,13 ^a	5,41 ± 5,46 ^b	10,66 ± 7,72 ^c	9,33 ± 10,71 ^{bc}
3.000KHz	3,04 ± 6,96 ^a	6,66 ± 6,01 ^b	12,33 ± 11,06 ^c	12,50 ± 13,16 ^{bc}
4.000KHz	2,90 ± 7,67 ^a	7,66 ± 6,13 ^b	13,00 ± 10,86 ^c	12,25 ± 14,12 ^{bc}
6.000KHz	6,35 ± 7,59 ^a	11,33 ± 9,01 ^b	18,33 ± 11,33 ^c	16,58 ± 12,83 ^{bc}
8.000KHz	2,43 ± 6,52 ^a	9,50 ± 9,32 ^b	15,41 ± 12,32 ^b	14,58 ± 12,83 ^b
9.000KHz	3,17 ± 6,17 ^a	8,75 ± 10,91 ^b	15,25 ± 13,91 ^{bc}	18,66 ± 19,43 ^c
10.000KHz	-0,40 ± 6,91 ^a	7,91 ± 13,50 ^b	14,41 ± 18,22 ^b	19,83 ± 22,84 ^b
11.200KHz	1,89 ± 8,13 ^a	14,00 ± 13,80 ^b	23,33 ± 22,25 ^b	27,08 ± 25,74 ^b
12.500KHz	-0,58 ± 8,49 ^a	16,58 ± 15,85 ^b	25,93 ± 22,29 ^b	24,36 ± 22,67 ^b
14.000KHz	-2,97 ± 10,46 ^a	23,50 ± 20,00 ^b	24,62 ± 19,97 ^b	23,43 ± 23,54 ^b
16.000KHz	0,33 ± 14,10 ^a	31,18 ± 15,34 ^b	31,25 ± 19,28 ^b	25,00 ± 23,29 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste Kruskal - Wallis com teste *a posteriori* de Dunn. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 4. Frequências graves, médias, agudas, altas grupo I e grupo II de ambas as orelhas.

Frequências	GC	GT	GA	GTA
Graves	8,45 ± 5,32 ^a	11,79 ± 6,73 ^b	14,08 ± 6,70 ^c	13,58 ± 7,89 ^b
Médias	4,22 ± 6,21 ^a	7,29 ± 5,57 ^b	11,12 ± 6,49 ^c	10,45 ± 9,25 ^{bc}
Agudas	3,34 ± 7,23 ^a	8,62 ± 7,61 ^b	14,77 ± 11,58 ^c	13,97 ± 13,77 ^c
Altas grupo I	1,84 ± 7,61 ^a	10,22 ± 13,01 ^b	17,66 ± 18,78 ^c	21,86 ± 23,00 ^c
Altas grupo II	-1,03 ± 11,73 ^a	23,60 ± 18,24 ^b	27,09 ± 20,72 ^b	24,22 ± 23,00 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste Kruskal - Wallis com teste *a posteriori* de Dunn. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Frequências graves (250 e 500KHz); médias (1.000 e 2.000KHz); agudas (3.000, 4.000, 6.000 e 8.000KHz); altas grupo I (9.000, 10.000 e 11.200KHz) e altas grupo II (12.500, 14.000 e 16.000KHz). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 5. Frequência de configuração de curva audiométrica

Configuração		GC	GT	GA	GTA
Ascendente	FC	29 (39) ^a	17(28) ^a	11 (19) ^{ac}	7 (12) ^{bc}
	AF	31 (42) ^a	3 (5) ^b	0 ^b	4 (7) ^b
Descendente leve	FC	0 ^a	5 (8) ^b	6 (10) ^b	6 (10) ^b
	AF	3 (4) ^a	32 (53) ^b	16 (27) ^{bc}	17 (28) ^c
Descendente acentuada	FC	0 ^a	0 ^a	2 (3) ^a	2 (3) ^a
	AF	0 ^a	5 (8) ^b	12 (20) ^b	7 (12) ^b
Descendente em rampa	FC	0 ^a	0 ^a	2 (3) ^a	1 (2) ^a
	AF	0 ^a	12 (20) ^{bc}	10 (16) ^{ac}	14 (23) ^{bc}
Horizontal	FC	45 (61) ^a	35 (39) ^a	36 (60) ^a	42 (70) ^a
	AF	40 (54) ^a	7 (12) ^b	22 (37) ^c	17 (28) ^c
Outros	FC	0 ^a	3 (5) ^a	3 (5) ^a	2 (3) ^a
	AF	0 ^a	1 (2) ^a	0 ^a	1 (2) ^a

Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%) para orelha direita e esquerda em conjunto (60 orelhas). Classificação segundo Silman e Silverman (1997). FC = Frequências convencionais, AF = Alta frequência. Teste exato de Fisher. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 6. Medidas de imitação acústica

	GC	GT	GA	GTA
<i>¹Tipos de curva</i>				
A	36 (97) ^a	24 (89) ^a	20 (74) ^b	17 (68) ^b
AD	1 (3) ^a	2 (7) ^a	5 (19) ^a	6 (24) ^b
AR	0 ^a	1 (4) ^a	2 (7) ^a	2 (8) ^a
<i>¹Reflexo estapediano</i>				
Normal	35 (95) ^a	24 (83) ^a	19 (70) ^b	15 (60) ^b
Alterado	2 (5) ^a	3 (17) ^a	8 (30) ^b	10 (40) ^b

Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%) para orelha direita e esquerda. Classificação de Silman e Silverman (1997). ¹Frequência e porcentagem em relação aos indivíduos que realizaram o teste. Teste exato de Fisher. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 7. Matriz de confusão considerando a classificação de três classes (GC, GT e GA), nas diferentes frequências auditivas analisadas, usando o teste SVM e 90% das amostras para conjunto de treinamento.

Classificado como (%)	Classe verdadeira (%)		
	GC	GT	GA
Grave			
GC	65	20	15
GT	40	53	6
GA	13	46	39
Média			
GC	85	5	10
GT	33	26	39
GA	19	33	46
Aguda			
GC	80	20	0
GT	26	40	33
GA	40	33	26
Alta I			
GC	95	5	0
GT	19	53	26
GA	39	26	33
Alta II			
GC	85	5	10
GT	6	33	60
GA	13	46	39

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista e GA = Grupo agroquímicos.

Tabela 8. Matriz de confusão considerando a classificação de quatro classes (GC, GT, GA e GTA), nas diferentes faixas de frequências auditivas analisadas, usando o teste SVM e 90% das amostras para conjunto de treinamento.

Classificado como (%)	Classe verdadeira (%)			
	GC	GT	GA	GTA
Grave				
GC	75	5	10	10
GT	60	20	19	0
GA	26	20	46	6
GTA	26	46	26	0
Média				
GC	55	15	10	20
GT	26	33	19	19
GA	26	19	46	6
GTA	6	39	13	40
Aguda				
GC	85	15	0	0
GT	19	46	26	6
GA	0	73	26	0
GTA	6	53	33	6
Alta I				
GC	90	0	5	5
GT	19	46	33	0
GA	0	13	86	0
GTA	13	40	46	0
Alta II				
GC	90	0	10	0
GT	26	26	19	26
GA	13	46	33	6
GTA	26	20	40	13

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Número de indivíduos alterados por grupo de acordo com a faixa de frequência. A) Frequências graves (250 e 500KHz). B) Frequências médias (1.000 e 2.000KHz). C) Frequências agudas (3.000, 4.000, 6.000 e 8.000KHz) . D) Frequências altas grupo I (9.000, 10.000 e 11.200KHz). E) Frequências altas grupo II (12.500, 14.000 e 16.000KHz). Valores expressos em porcentagem. Teste exato de Fisher. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Figura 2: Efeito do treinamento sobre o desempenho de classificação por faixas de frequências. Valores em porcentagem (%) de acurácia dos diferentes testes aplicados. *ANN* = Artificial Neural Network, *BAY* = Bayes Classifier e *SVM* = Support Vector Machine. A) Análise realizada com os quatro grupos de estudo. B) Análise realizada com os três grupos de estudo sem o grupo GTA – grupo exposto a tabagismo e agroquímicos

Figura 1

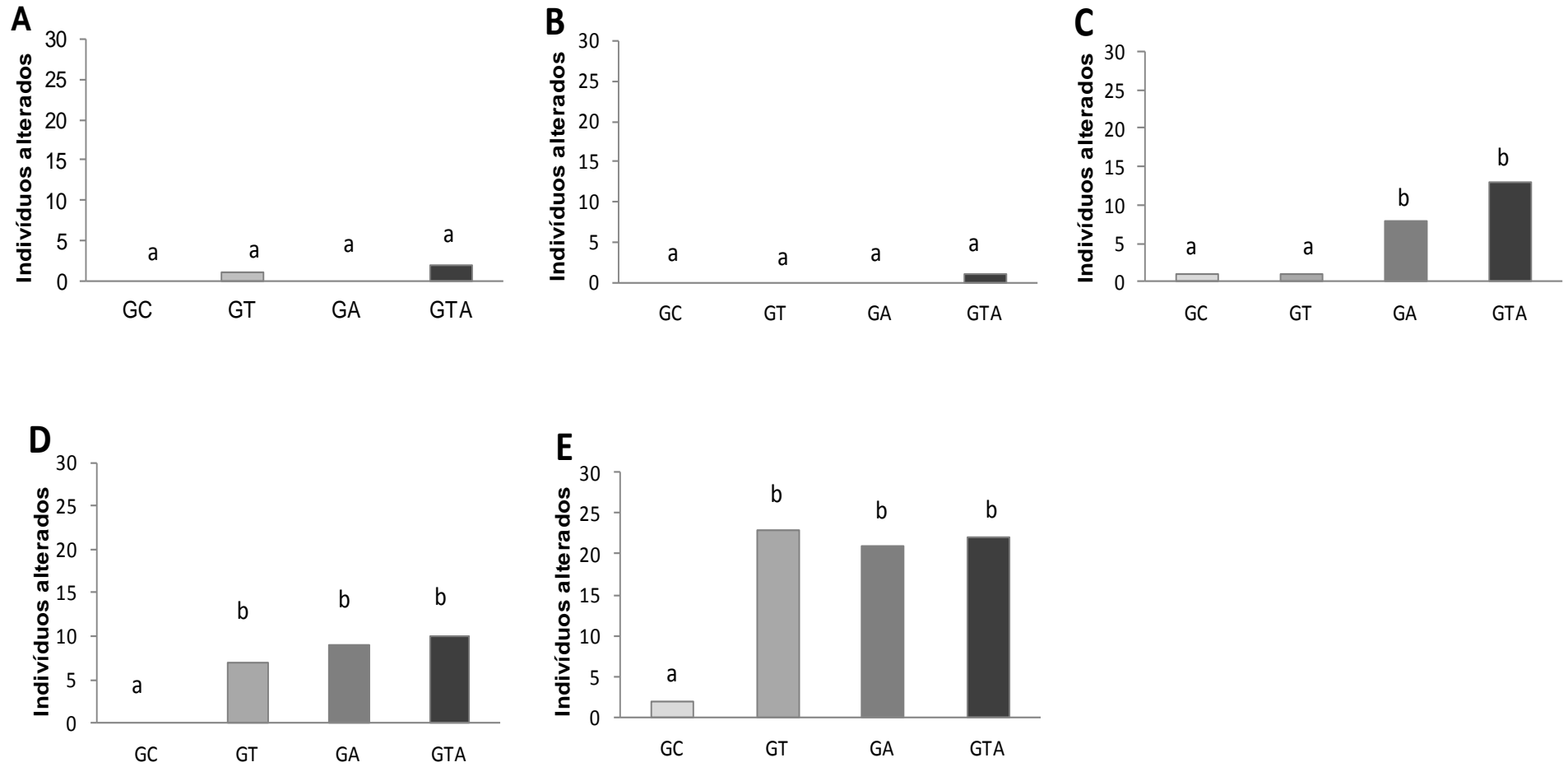
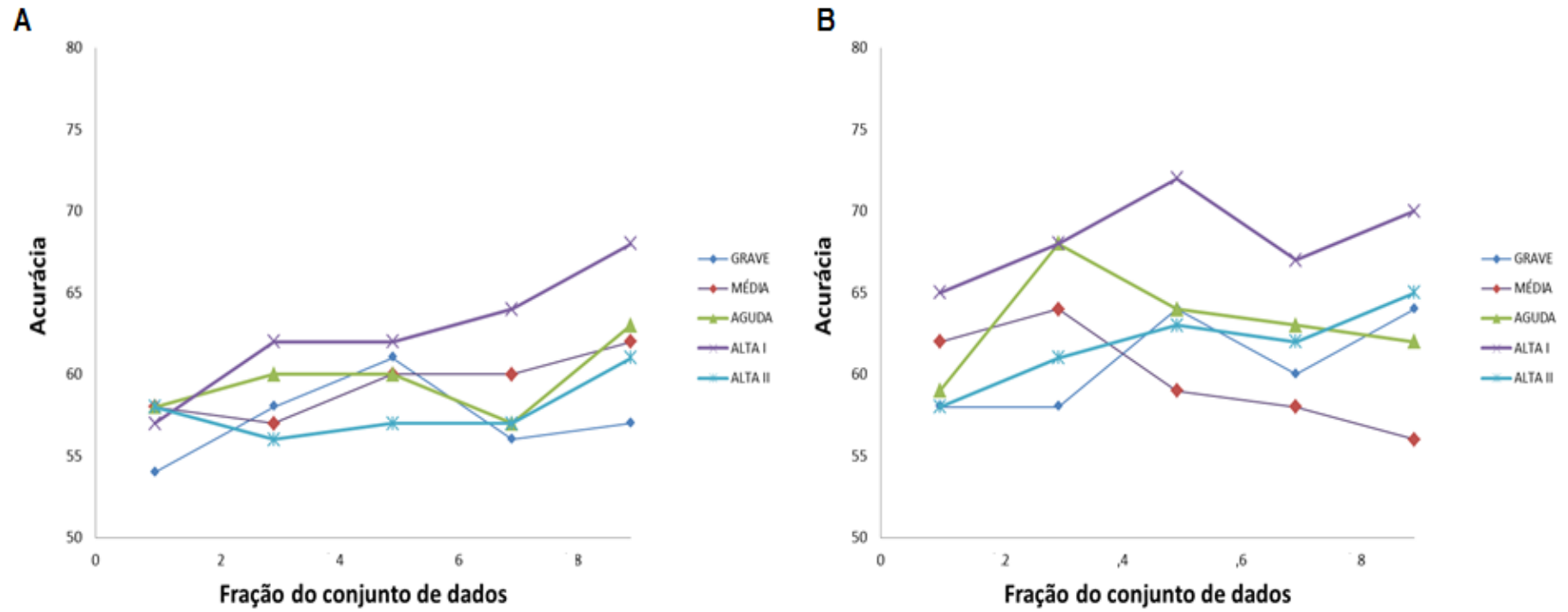


Figura 2



**Avaliação citogenética de indivíduos expostos a agroquímicos e cigarro:
um estudo de algoritmos de aprendizado de máquina**

Jamile Silveira Tomiazzi¹; Meire Aparecida Judai², Gisele Alborghetti Nai³;
Danillo Roberto Pereira¹, Ana Paula Alves Favareto¹

¹Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. ²Faculdade de Ciências da Saúde – Fonoaudiologia. ³Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

* Autor de Correspondência:

Dra. Ana Paula Alves Favareto

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

CEP. 19.067-175. Tel: +55 (18) 3229- 1098

E-mail: anafavareto@unoeste.br (A.P.A. Favareto).

RESUMO

A monitorização da exposição de indivíduos a agentes químicos, por meio da análise de biomarcadores como o teste do micronúcleo, é de extrema importância para a detecção precoce de alterações biológicas e prevenção de doenças, como o câncer bucal. O presente estudo teve como objetivo avaliar a incidência de alterações citogenéticas em indivíduos expostos ocupacionalmente a agroquímicos e ao cigarro, isolados ou em combinação e identificar possíveis padrões de classificação dos grupos de estudo. Cento e vinte participantes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 39 anos foram divididos em quatro grupos: Controle (GC), Tabagista (GT), Agroquímicos (GA) e associação Tabagista e Agroquímicos (GTA). Foram coletadas células da mucosa bucal para a preparação de lâminas, posteriormente coradas com método Giemsa. A observação microscópica foi realizada em 2000 células por indivíduo das regiões de língua e bochechas. Os dados foram avaliados pelos seguintes algoritmos de reconhecimento de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY) e *Support Vector Machine* (SVM). O número total de alterações nucleares e de micronúcleos (MN) foi maior ($p < 0,05$) nos grupos expostos em relação ao grupo controle, e as análises de ambos os locais não apresentaram diferença significativa entre si. Além disso, a análise computacional evidenciou a presença de padrão na classificação de GC, GT e GA. Assim, concluiu-se que ambas as substâncias xenobióticas induziram o aumento de alterações citogenéticas, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer bucal. Entretanto, a exposição combinada não resultou em efeito aditivo ou de potencialização.

Palavras-chave: Agroquímicos. Aprendizagem de máquina. Biomarcador. Cigarro. Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A estimativa de câncer bucal no mundo é de 300 mil novos casos por ano, o que corresponde a 2,1% do total de casos. O número de óbitos anual, por este tipo de câncer no mundo, chegou a 145 mil em 2012, sendo que cerca de 80% dos casos foram registrados em regiões menos desenvolvidas (Ferlay et al., 2015). No Brasil, a estimativa de câncer bucal é de 11.140 novos casos em 2016, com 5.401 mortes (INCA, 2016).

O teste de micronúcleo (MN) tem sido utilizado como forma de identificar danos ao DNA, instabilidade cromossômica, morte celular e possíveis danos à saúde do indivíduo exposto a diferentes agentes genotóxicos (Thomas et al., 2011; Silva et al., 2012; Benedetti et al., 2013). Assim, a contagem de MN tem sido utilizada como um biomarcador de risco para o câncer (Bonassi et al., 2007; Thomas et al., 2011; Silva et al., 2012).

Desta forma, o teste do MN tem sido amplamente aplicado como forma de biomonitoramento e detecção precoce de carcinogênese bucal (Mohanta et al., 2015). Esta ferramenta tem se mostrado vantajosa, principalmente por não ser invasiva e por permitir detecção precoce e monitoramento de grandes populações (Dosi et al., 2016), além de apresentar uma correlação positiva entre a frequência de MN em células esfoliadas da mucosa bucal e lesões pré-malignas (Chatterjee et al., 2009; Bolognesi et al., 2015)

O teste do MN em células esfoliadas da mucosa bucal tem sido amplamente usado para identificação de efeitos genotóxicos de contaminantes ambientais, especialmente da exposição ocupacional a agroquímicos (Holland et al., 2008; Bolognesi et al., 2011; Bonassi et al., 2015). Estudo realizado por Abdul Hamid et al. (2016), demonstrou que a exposição de agricultores a agroquímicos contribuiu para o aumento da incidência de anomalias nucleares, sendo que tais problemas são subnotificados aos órgãos fiscalizadores. Outros autores como Costa et al. (2007) e Carbajal-López et al. (2016) identificaram que a presença de alterações citogenéticas e a incidência de MN foram maiores em indivíduos expostos a agroquímicos.

Indivíduos tabagistas também podem apresentar alta incidência de alterações celulares com a presença de MN (Bansal et al., 2012). No estudo realizado por Pradeep et al. (2014), foi identificado um aumento significativo de

alterações citogenéticas em indivíduos tabagistas em relação ao grupo não exposto. Znaor et al. (2003) relatam que indivíduos expostos às substâncias presentes no cigarro estão quase 38 vezes mais propensos a desenvolverem algum tipo de câncer.

Embora os tipos de exposição possam variar conforme as formas de manuseio e fatores regionais e/ou culturais (Dutta et al., 2016; Gesesew et al., 2016), investigar os malefícios da exposição combinada a agroquímicos e cigarro torna-se fundamental. As taxas de frequência de MN serve como forma de monitoramento e caracterização dos efeitos, antes de qualquer alteração pré-maligna clínica ou histológica (Bolognesi et al., 2011; Adad et al., 2015).

Outra importante ferramenta capaz de monitorar alterações encontradas transformando-as em valores numéricos são as análises computacionais. Essas análises auxiliam na forma de identificação das informações obtidas através de coleta de dados, transformando-as em respostas únicas e eficientes (Coppin, 2010; Hjalmar et al., 2016). Estudos demonstram que a aplicação de técnicas de algoritmos de classificação e aprendizagem de máquina pode contribuir para a área médica e biológica (Cristianini e Shawe-Taylor, 2001; Altman, 2017). Nestas áreas, as ferramentas computacionais são usadas para o auxílio do diagnóstico de câncer, identificação de riscos e benefícios cirúrgicos, possíveis terapias aplicadas e eficiência das mesmas (Yilmaz et al., 2016).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citogenéticos em células bucais esfoliadas de indivíduos expostos a agroquímicos e cigarro. Além disso, pretendeu investigar a existência de potencialização dos efeitos, quando tais substâncias são utilizadas em conjunto, utilizando algoritmos de aprendizagem de máquina para classificação dos grupos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra populacional

Foi realizado um estudo observacional, prospectivo e transversal, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade do Oeste Paulista, sob protocolo CAAE nº 48083715.4.0000.5515.

O estudo foi realizado em parceria com o Centro de Referência em Saúde do Trabalhador (CEREST/PP) de Presidente Prudente/SP. Os 120 participantes, de ambos os sexos, com idades entre 18 e 39 anos foram convidados e aceitaram participar da pesquisa. Os critérios de exclusão para o estudo foram indivíduos submetidos a tratamento quimioterápico. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os participantes foram distribuídos em quatro grupos (n = 30/grupo), sendo um grupo controle e três grupos de estudo, distribuídos da seguinte maneira: Grupo controle (GC) - indivíduos que não apresentassem exposição ocupacional a agroquímicos e não fumassem, Grupo Tabagista (GT) - indivíduos fumantes a pelo menos um ano e como um consumo mínimo de cinco cigarros/dia; Grupo Agroquímicos (GA) – indivíduos expostos ocupacionalmente a agroquímicos a pelo menos um ano e o Grupo Tabagista + Agroquímicos (GTA) – indivíduos expostos ao tabagismo + agroquímicos, seguindo os mesmos requisitos acima citados.

Os participantes responderam um questionário com dados pessoais, ocupacionais e de saúde em geral.

Análise citogenética

Para o teste de genotoxicidade, foram coletadas células epiteliais da mucosa bucal das regiões de bochecha e língua. Antes de realizar a coleta, foi solicitado ao participante que realizasse um bochecho com água, para remoção de bactérias capazes de comprometer a análise das lâminas. Na sequência, as células foram coletadas por intermédio do esfregaço (raspagem) da mucosa da bochecha direita e esquerda e parte superior da língua, com o auxílio de escovas citológicas descartáveis e individuais. O material coletado foi depositado em uma lâmina de vidro limpa e previamente identificada, conforme os respectivos grupos e locais de estudo. Na parte superior de uma das lâminas, foi transferido o material da bochecha do lado direito, e na parte inferior a do lado esquerdo, e em outra, o material coletado da língua. As lâminas foram armazenadas em caixas próprias, mantidas separadas umas das outras até a realização da coloração. As lâminas foram fixadas em metanol (15 min), lavadas com água destilada e posteriormente coradas com Giemsa

5% (40 min). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada e seca ao ar, em temperatura ambiente.

Todas as lâminas foram codificadas segundo os grupos e locais de coleta, e as análises foram realizadas em ensaio cego, em microscópio óptico de luz, sob aumento de 400X. Foi realizada a contagem de 2.000 células por indivíduo e por local de coleta para identificação das anormalidades nucleares (brotos nucleares, cariorréxe, células binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas e células com cromatina condensada, micronucleadas e picnóticas), de acordo com critério proposto por Tolbert et al. (1992) e Thomas et al. (2009). Foram consideradas células que apresentavam pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes, com a presença de citoplasma e núcleo bem delimitados.

Algoritmos de classificação

As análises computacionais foram realizadas por intermédio de diferentes algoritmos de reconhecimento de padrões, de modo a verificar a existência de padrões no diferentes dados coletados. Para a verificação da existência/reconhecimento de padrões foram utilizadas as alterações citogenéticas analisadas, sendo elas: Micronúcleos, células binucleadas, broto nuclear, cariolíticas, cariorréxis, cromatina condensada, picnose, tri e tetranucleadas. Foram utilizados diferentes testes de reconhecimento para as análises de padrões: *Artificial Neural Network* (ANN), *Bayes Classifier* (BAY) e *Support Vector Machine* (SVM). Com intuito de manter a clareza e facilitar a discussão dos resultados, foi utilizado matriz de confusão. A matriz de confusão ou de classificação foi criada a partir de um conjunto de dados divididos em categorias, que determinaram se os resultados (valores) esperados correspondem ao valor real, sendo o total desses resultados exibidos em uma matriz.

Métricas de avaliação estatística

O teste ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey foi utilizado para a comparação das médias entre os grupos de estudo. Para comparação do número de células com alterações citogenéticas entre as análises de língua e bochecha foi utilizado o teste Wilcoxon pareado. O teste exato de Fisher foi

aplicado para comparar dados de proporção e a análise de regressão linear simples para correlação entre tempo de exposição e alterações citogenéticas.

O limite de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado para as análises foi o GraphPad InStat 3.0.

Para as análises computacionais foi utilizada a métrica de acurácia propostas por Papa et al. (2009), que leva em consideração o desequilíbrio entre classes. Sua precisão é medida considerando que as classes podem apresentar diferentes quantidades de amostras, vide Fórmula (1):

$$e_{i,1} = \frac{FP_i}{|D_2| - |D_2^i|}$$

Na fórmula (2), k representa o número de classes, D_2 o número de amostras. O taxa de atribuição das frequências auditivas foi medida pelo i e FP e $FN1$, onde representam o número de falsos positivos e negativos. O número de amostras classificadas como i em D_2 e o número de amostras da classe i que forem incorretamente classificadas são apresentadas como b .

$$e_{i,2} = \frac{FN_i}{D_2^i}, i = 1, 2, \dots, K,$$

O total de erros da classe foi então demonstrado vide formula (3):

$$E_i = e_{i,1} + e_{i,2}$$

Na última etapa, aferiu-se a acurácia das alterações analisadas, submetidas a um sistema de grade, proporcionando uma amostragem sistemática. Após isso, determinou-se um arquivo raster no qual foram alocados os dados do grupo sem a exposição (GC) e os grupos expostos (GT, GA e GTA), em cada um dos pontos de cruzamento das linhas raster. As informações de “veracidade de campo” foram inseridas e analisadas dentro dos índices de acurácia descritos por Brites et al. (1996) podem ser vistas através das seguintes equações: Exatidão Global ($G = [\sum_{i=1}^n n_{ii}] / N$); Kappa ($K = [Po - Pc] / [1 - Pc]$) e Tau ($T = [Po - 1/M] / [1 - 1/M]$).

Por fim, a equação $\sum_{i=1}^M n_{ii}$ = somatório dos pontos corretamente classificados dentro de cada classe onde N = número total de pontos contemplados na matriz; P_o = proporção de unidades que concordam plenamente; P_c = proporção de unidades que concordam por casualidade; e M = número de categorias na classificação. A precisão dos valores demonstrados com a acurácia (Acc) pode ser definida pela equação:

$$Acc = 1 - \frac{\sum_{i=1}^K E_i}{2K}$$

Essas fórmulas permitem avaliar de forma confiável o real desempenho dos valores de frequências auditivas e suas respectivas classes. Todo o treinamento e teste dos algoritmos de classificação foram feitos em um computador com um processador Intel i7 5500U com 8GB de RAM, usando Linux como operacional.

RESULTADOS

A população estudada foi composta de 46,6% de indivíduos do sexo masculino e 53,3% do sexo feminino, apresentando uma média de idade de 29 anos. Todos os participantes dos grupos GA e GTA apresentaram ampla utilização ocupacional de agroquímicos, sendo que dos sete compostos relatados, quatro são potencialmente carcinogênicos em humanos (Tabela 1).

As doenças crônicas relatadas pelos participantes foram: diabetes, hipotireoidismo, hipertensão, problemas respiratórios e de coluna, sendo que o aparecimento das mesmas não foi significativamente diferente entre os grupos de estudo (Tabela 2).

A avaliação citogenética foi realizada mediante material coletado na língua e bochecha de ambos os lados. (Tabela 3). Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) no número de alterações entre os diferentes locais de coleta de material (Tabela 3). Desta forma, as comparações entre os grupos de estudo foram realizadas considerando um único local de coleta das células (bochecha).

O consumo de bebida alcoólica foi relatado em todos os grupos de estudo. No entanto, os grupos GT e GTA apresentaram maior ($p < 0,05$)

incidência de consumo em relação ao GC (Tabela 4). Assim, foi realizada comparação do número de alterações citogenéticas totais e de MN entre os grupos, com a separação em categorias de consumidores e não consumidores de bebida alcoólica (Tabela 5).

A média geral de alterações citogenéticas e de MN foi maior ($p < 0,05$) nos três grupos expostos (GT, GA e GTA) em relação ao GC. Isso foi observado, tanto na comparação em categorias (consumidores e não consumidores de bebida alcoólica – Tabela 5), quanto com total de indivíduos de cada grupo (Figura 1). Além disso, o número total de alterações citogenéticas foi maior em GA e GTA ($p < 0,05$) em relação à GT, considerando apenas os etilistas (Tabela 5) e todos os participantes (Figura 1A). Como a separação nestas categorias manteve resultados semelhantes ao conjunto total de indivíduos (sem separação), as demais alterações nucleares foram avaliadas sem a separação nestas categorias.

Todas as demais alterações citogenéticas avaliadas apresentaram-se aumentadas ($p < 0,05$) nos grupos expostos em relação ao grupo controle (Figura 2), com exceção do número de células de cromatina condensada em GA (Figura 2E). Além disso, o número de células tri e tetranucleadas foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos de estudo (dados não mostrados).

Não foram observadas diferenças significantes entre GA e GTA, em nenhum tipo de alteração avaliada (Figura 1B e Figura 2). Já, o número de células cariolíticas (Figura 2C) e cariorréxis (Figura 2D) foi menor ($p < 0,05$) em GT em relação a GA e GTA. Além disso, o número de células picnóticas (Figura 2F) e binucleadas (Figura 2A) foi, respectivamente, menor e maior ($p < 0,05$) em GT em relação a GA.

Não houve correlação significativa ($p > 0,05$) entre o tempo de exposição (a agroquímicos e/ou tabagismo) e a frequência de alterações citogenéticas totais ou de células micronucleadas observadas nos grupos expostos a estes fatores de forma isolada ou combinada (dado não demonstrado).

Análise dos algoritmos de classificação

As análises de matriz de confusão foram realizadas de maneira individual, segundo o número de alterações citogenéticas apresentadas por cada grupo de estudo. Os testes aplicados foram: *ANN*, *BAY* e *SVM* (Figura 3),

sendo o *SVM* o teste que apresentou melhor classificação (Tabela 6 e 7 e Figura 3).

Todos os testes foram aplicados duas vezes, obtendo-se a classificação com os três grupos de estudo (GC, GT e GA) (Tabela 6) e os quatro grupos (GC, GT, GA e GTA) (Tabela 7). Ao analisar a matriz de confusão, verificamos uma precisão maior nos resultados referentes a classe GC (Tabela 6 e 7).

A classificação com a exclusão do grupo GTA, ocorreu devido à semelhança entre o número de alteração encontradas neste grupo em relação aos de exposição isolada (GT e GA) (Tabela 6). Os dados de análise de acurácia de acordo com o tamanho da amostra de treinamento também manteve este mesmo perfil, obtendo-se maior precisão de classificação sem o GTA para todos os testes (Figura 3).

Os resultados demonstram que o teste de análise de padrão não atribuiu valores reais ao grupo GTA, não conseguindo identificar a qual grupo ele realmente pertencia. Diferente dos grupos GT e GA em relação ao GC, onde os dados foram distribuídos com padrão entre as diferentes frequências e classificadas corretamente.

DISCUSSÃO

A utilização da avaliação de alterações citogenéticas de células da mucosa bucal, como um biomarcador de genotoxicidade, tem sido relatada como uma ferramenta eficaz na identificação de danos causados por xenobióticos ao DNA (Thomas et al., 2011). Além disso, esta avaliação pode ser um importante indicativo de risco para o desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (Bonassi et al., 2007).

No presente estudo, a relação entre a exposição a dois tipos de xenobióticos (agroquímicos e cigarro isolados ou em combinação), com possível potencial carcinogênico, e o número de alterações citogenéticas foi avaliada. Até o momento, não foram encontrados estudos que avaliassem a associação da exposição a estes dois compostos e as possíveis alterações a biomarcadores de genotoxicidade.

O número total de alterações citogenéticas e de MN apresentou-se maior em todos os grupos expostos em relação ao grupo controle. Além disso,

a exposição a agroquímicos isolados ou em combinação demonstrou ser mais prejudicial, do ponto de vista citogenético, do que o tabagismo.

Diversos estudos também têm relatado o aumento de células micronucleadas e/ou com alterações citogenéticas associado à exposição a agroquímicos (Bansal et al., 2012, Abdul Hamid et al., 2016).

Carbajal et al. (2016) realizaram a avaliação do efeito genotóxico em células da mucosa bucal (ensaio de cometa e teste de MN) em 111 homens expostos ocupacionalmente a diferentes tipos de agroquímicos no México. Os autores observaram aumento de danos nucleares, de forma semelhante ao encontrado por Rekhadevi et al. (2016). Neste estudo, foi relatado que trabalhadoras rurais expostas a mistura de agroquímicos, apresentaram aumento da frequência de MN, células binucleadas, cariolíticas e cariorréxis. Além disso, os autores também identificaram dano significativo no DNA e aumento de aberrações cromossômicas em ambas as populações expostas.

A associação do aumento de alterações citogenéticas e exposição a agroquímicos também tem sido relatada em modelos experimentais. Moore et al. (2011) observaram que a exposição a organofosforados aumentou a presença de MN e aberrações cromossômicas em ratos expostos. Assim, como no presente estudo, estes autores observaram prejuízo nuclear mesmo após a exposição a compostos com potencial carcinogênico intermediário ou baixo.

Além dos agroquímicos, outro xenobiótico que vem sendo relacionado a alterações citogenéticas, com reconhecido potencial carcinogênico, é o cigarro (MOTGI et al., 2014; SILVA et al., 2015). Segundo Pradeep et al. (2014) indivíduos tabagistas apresentam aumento da presença de MN e de broto nuclear. Kausar et al. (2009) também observaram aumento destas alterações e de cariólise, cariorréxis, células binucleadas e picnóticas em indivíduos usuários de sadagura, uma mistura tabágica tradicional do nordeste da Índia.

No presente estudo, indivíduos que apresentaram o hábito tabagista também tiveram um aumento de alterações citogenéticas e da presença de MN. Tais alterações, além de demonstrarem instabilidade cromossômica, também podem ser indicadores de citotoxicidade, e relacionadas à formação de células cancerígenas (SILVA et al., 2012).

Vários estudos observaram que além do tabagismo, indivíduos etilistas podem apresentar aumento de células micronucleadas (Bloching et al., 2000;

Bohrer et al., 2005; Dosi et al., 2016). No entanto, Santovito et al. (2015) relataram uma baixa incidência de MN e um aumento de aberrações cromossômicas em indivíduos etilistas.

Todos os grupos de estudo apresentaram grande número de etilistas, porém, o GT apresentou número mais elevado com 93% do total. Este dado sugere associação entre os dois hábitos (tabagista e etilista). No entanto, o consumo de bebida alcoólica não interferiu de forma significativa no número de alterações nucleares totais e de MN, já aumentadas pela exposição ao tabagismo e agroquímicos.

A presença de alterações nucleares foi mais evidente nos grupos expostos aos agroquímicos do que em relação ao tabagismo, o que sugere que os agroquímicos apresentam maior potencial genotóxico em relação ao cigarro com ou sem associação ao álcool. Além disso, observou-se que o uso concomitante de cigarro e agroquímicos não levou a efeito aditivo ou de potencialização dos efeitos genotóxicos.

O mesmo foi observado em relação ao estado de saúde geral e relato de doenças crônicas. No entanto, cabe ressaltar que o índice de problemas respiratórios nos grupos expostos apresentados pelo estudo, mesmo que pequenos, merecem destaque, já que tais substâncias (agroquímicos e cigarro) podem induzir o desenvolvimento de doenças pulmonares, cânceres de pulmão, asma, dentre outros (Polosa et al., 2016). Tantisuwat e Thaveeratitham (2014) realizaram um estudo com jovens de 15 a 18 anos fumantes e não fumantes, e identificaram efeitos iniciais no sistema respiratório. Já o estudo de Ming Ye et al., (2013) cita que trabalhadores rurais expostos a agroquímicos apresentam a função pulmonar reduzida, bem como doenças como asma e bronquite.

Gangemi et al. (2016) relataram a presença de doenças crônicas em indivíduos expostos ocupacionalmente a agroquímicos. Além disso, indicaram que a falta de utilização de EPI's adequados pode potencializar os danos à saúde geral. No presente estudo, nenhum participante relatou a utilização de EPI's adequados para manuseio de tais produtos, o que pode estar associado ao maior dano observado nestes indivíduos.

Apesar do tempo de exposição ocupacional aos agroquímicos ou ao tabagismo ser um fator relevante quanto ao aparecimento de doenças, não foi

observada correlação significativa entre este parâmetro e o número de alterações nucleares. Entretanto, Carbajal-López et al. (2016) verificou que indivíduos com maior tempo de exposição podem apresentar elevados índices de alterações citogenéticas principalmente a presença de MN, quando comparados a indivíduos com baixo tempo de exposição ocupacional agroquímicos.

O reconhecimento de padrões é uma das funcionalidades mais importantes da inteligência artificial (Papa et al., 2012). Os padrões podem ser reconhecidos por aquisição e coleta de dados, extração e representação de recursos, detecção de similaridade, design de classificadores de padrões e avaliação de desempenho (Rosenfeld e Wechsler, 2000). Estes processos são semelhantes aos que foram realizados no presente estudo.

Diversos estudos tem demonstrado a eficiência do procedimento de classificação por máquinas na área medica e biológica (Van Heerden et al., 2008; Patel et al., 2009; Al-Shayia, 2011; Yilmaz, et al.,2016; Altman, 2017). No entanto, este foi o primeiro estudo que utilizou esta ferramenta para correlacionar avaliação citogenética e exposição isolada e combinada a xenobióticos.

A análise de aprendizado de máquina identificou um padrão na distribuição das alterações citogenéticas entre os grupos de exposição isolada e o controle, confirmando a diferença significativa observada entre estes grupos. O teste SVM foi o mais eficiente para identificação da presença de padrão, o que concorda com estudo de Papa et al. (2009).

A análise realizada com os quatro grupos, indicou proximidade dos dados dos grupos de exposição isolada e combinada, levando a erros de classificação. Estes dados permitiram identificar a ausência de efeito potencializador ou aditivo dos agentes xenobióticos, quando utilizados em conjunto.

CONCLUSÃO

A utilização de agentes xenobióticos como agroquímicos e cigarro apresentaram características capazes de induzir o aumento de alterações citogenéticas e de células micronucleadas, sendo que tais alterações demonstraram-se mais evidentes nos indivíduos expostos aos agroquímicos do

que em relação ao tabagismo. No entanto, tais substâncias quando utilizadas em conjunto não apresentaram efeitos potencializador para tais alterações, o que foi evidenciado pela técnica de aprendizado de máquina e análises de padrão. Estes dados indicam que o uso de agroquímicos por trabalhadores rurais deve ser feito de forma cautelosa, visto que pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer bucal, tanto em exposição isolada, quanto em exposição combinada a um reconhecido agente carcinogênico (cigarro).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa PROSUP concedida e à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) pelo apoio financeiro para a realização do estudo.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul Hamid Z, Mohd Zulkifly MF, Hamid A, Lubis SH, Mohammad N, Ishak I, Mohd Saat NZ, Othman HF, Ghazali AR, Mohd Razaai MJ, Mohd Noor MR, Rajab NF (2016). The association of nuclear abnormalities in exfoliated buccal epithelial cells with the health status of different agricultural activities farmers in Peninsular Malaysia. *Genes Environ* 38: 7.
- Adad LM, de Andrade HH, Kvitko K, Lehmann M, Cavalcante AA, Dihi RR (2015). Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genet Mol Biol* 3: 308-15.
- Altman RB (2017). Artificial Intelligence (AI) Systems for Interpreting Complex Medical Data Sets. *Clin. Pharmacol. Ther* 9.
- Al-Shayea QK (2011). Artificial Neural Networks in Medical Diagnosis. *Int J Computer Science Issues* 2:150-154.
- Bansal H, Sandhu VS, Bhandari R, Sharma D (2012). Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population. *Contemp Clin Dent* 2:184-87.
- Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Dos Santos CE, Dias JF, da Silva J (2013). Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides:

Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat res* 1-2: 28-33.

Bloching M, Hofmann A, Lautenschläger C, Berghaus A, Grummt T (2000). Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology*. 36:550-555.

Bohrer DDS, Filho MS, Paiva RL, da Silva IL, Rados, PV (2005). Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Citologica*. 49:265-72.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando WP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zieger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulsk-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksić G, Martell A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi A, Zijno A, Norppa H, Fenech M (2007) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 3: 625–31.

Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, Ceppi M (2015). Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutat Res* 766:20-31.

Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 1: 19–26.

Carbajal-López Y, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Calderón-Segura ME, Martínez-Arroyo A (2016). Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environ Sci Pollut Int* 3: 2513-20.

Chatterjee S, Dhar S, Sengupta B, Ghosh A, De M, Roy S, Raychowdhury R, Chakrabarti S (2009). Cytogenetic monitoring in human oral cancers and other oral pathology: the micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Toxicol Mech Methods* 6-7: 427-33.

Costa C, Silva S, Coelho P, Roma-Torres J, Teixeira JP, Maia O (2007). Micronúcleos análise em uma população Português expostos a pesticidas: levantamento preliminar. *Int J Hyg Environ Saúde* 3-4: 415-18.

Coppin, B. Inteligência artificial. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

da Silva FR, Da Silva J, Nunes E, Benedetti D, Kahl V, Rohr P, Abreu MB, Thiessen FV, Kvitko K (2012). Application of the buccal micronucleus cytome

assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6*9(-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers. *Environ Mol Mutagen* 7: 525-34.

Dosi T, Gupta D, Hazari A, Rajput R, Chauhan P, Rajapuri AS (2016). Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *J. Int Soc Prev Community Dent* 2, 143-47.

Dutta S, Bahadur H (2016). Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. *Toxicology Mechanisms and methods*. v. 0, Iss. Ja,0.

Fenech M (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 1-2: 81-95.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN. *Int. J. Cancer* 136: 359-86.

Gangemi S, Miozzi E, Teodoro M, Briguglio G, de Lucca A, Alibrando C, Polito I, Libra M (2016). Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review). *Mol Med Rep*. 5:4475-88.

Gesesew HA, Woldemichael K, Massa D, Mwanri L (2016). Farmers Knowledge, Attitudes, Practices and Health Problems Associated with Pesticide Use in Rural Irrigation Villages, Southwest Ethiopia. *PLOS ONE* 13: 11.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 1-2: 93–108.

Huang CJ, Yang YJ, Yang DY, Chen VJ (2008). Frog classification using machine learning techniques. *Expert systems with applications*. 79. 20-32.

Hjalmar KT, Ribeiro S, Pereira DR, Papa JP, Albuquerque VHC (2016). Machine learning algorithms for automatic classification of marmoset vocalizations. Article *in* PLoS ONE. September.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 122p. INSB 978-85-7318-283-5 (Versão eletrônica), Rio de Janeiro, 2016.

Kausar A, Giri S, Mazumdar M, Dhar P (2009). Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without sadagura, a unique smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India. *Mutation Research*. 1-2:72-5.

Ming Ye, Praia J, Martin JW, Senthilselvan A (2013). Occupational pesticide exposures and respiratory health. *Int J. Environ Res and Public Health*. 10.12. 6442-71p.

Mohanta A, Mohanty PK, Parida G (2015). An in vivo cytogenetic analysis of human oral squamous cell carcinoma. *South Asian J Cancer* 3:123-6.

Moore PD, Patlolla AK, Tchounwou PB (2011). Cytogenetic evaluation of malathion-induced toxicity in Sprague-Dawley rats. *Mutat. Res*. 1-2:78-82.

Motgi AA, Chavan MS, Diwan NN, Chowdhery A, Channe PP, Shate MV (2014). Assessment of cytogenetic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. *J. Cancer Res. Ther*. 1:165-70.

Papa JP, Albuquerque VHC, Falcão AX, Tavares JMRS. Efficient supervised Optimum-Path Forest classification for large datasets. *Pattern Recognit*. 2012; 45: 512-520.

Patel VL, Shortliffe EH, Stefanelli M, Szolovits P, Berthold MR, Bellazzi R, Abu-Hanna A (2009). The coming of age of artificial intelligence in medicine. *Artific Intelligence Med* 1:5-7.

Pradeep MR, Guruprasad Y, Jose M, Saxena K, Deepa K, Prabhu V (2014). Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *J Clin Diagn Res* 5: ZC21-4.

Pereira da Silva VH, de Luna Antonio R, Pompeia S, Ribeiro DA (2015). Cytogenetic biomonitoring in buccal mucosa cell from Young smokers. *Acta Cytologica* 6: 474-78.

Polosa R, Campagna D, Sands MF (2016). Counseling patients with asthma and allergy about electronic cigarettes: an evidence-based approach. *Ann allergia Asma Immunol*.116.2. 106-11p.

- Rekhadevi PV, Rahman MF, Mahboob M, Kumari SI, Chinde S, Bhanuramya M, Naresh D, Grover P (2016). Assessment of genotoxicity in female agricultural workers exposed to pesticides. *Biomarkers*.
- Rosenfeld A, Wechsler H. Pattern recognition: Historical perspective and future directions (2000). *Inter Journal of imaging Systems and Techonology*. 11.2. 101-16.
- Santovito A, Cervella P, Delpero M. (2015). Evidence of genotoxicity in lymphocytes of non-smoking alcoholics. *Mol Biol Rep*. 42:53.
- Tantisuwat A, Traveeratitham P (2014). Effects os smoking on chest expansion, lung function, and respiratory muscle strength of youths. *J.Phys Ther*. 26: 167-70.
- Thomas P, Fenech M (2011). Buccal micronucleus cytome assay. *Métodos Mol Biol* 682: 235-48.
- Tolbert, P.E.; Shy, C.M.; Allen, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalues in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol*, 134.69-77.
- Van Heerden B, Aldrich C, du Plessis A (2008). Predicting student performance using artificial neural network analysis. *Med Educ*. 5:516-517.
- Yilmaz A, Ari S, Kocabiçak U (2016). Risk analysis of lung cancer and effects of stress level on cancer risk through neuro-fuzzy model. *Comput. Methods. Programs Biomed*. 137. 35-46.
- Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P (2003). Individuals with both the habits of smoking and drinking are almost 38 times more prone to develop oral cancers than those who do not have any deleterious habit. *Int J Cancer* 5: 681-86.

Tabela 1. Agroquímicos relatados pelos trabalhadores rurais dos grupos GA (Grupo Agroquímicos) e GTA (Tabagista e Agroquímicos).

Composto químico	Classe	Classificação toxicológica¹	Potencial Carcinogênico²	GA³	GTA³
Amitraz	Acaricida/Inseticida Formamidínico	III	Grupo C – possível carcinógeno humano	5 (16)	8 (27)
Cipermetrina	Inseticida/Piretróide	II	Grupo C – possível carcinógeno humano	10 (33)	10 (33)
Clorpirifós	Inseticida/Organofosforado	II	Grupo E – sem evidência de carcinogênese	13 (43)	8 (27)
Deltametrina	Inseticida/Piretróide	I	Grupo E – sem evidência de carcinogênese	5 (16)	4 (13)
Glifosato	Herbicida	IV	Grupo E – sem evidência de carcinogênese	13 (43)	14 (47)
Parationa Metílica	Inseticida/Organofosforado	I	Grupo C – possível carcinógeno humano	5 (16)	6 (20)
Succinato de dietila	Inseticida/Organofosforado	II	Grupo C – possível carcinógeno humano	5 (16)	8 (27)

¹Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014. ²Environmental Protection Agency – EPA. ³Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%). Cada indivíduo poderia estar exposto a mais de um tipo de agroquímico. n = 30/grupo.

Tabela 2. Presença de doenças crônicas.

Doenças crônicas	GC	GT	GA	GTA	TOTAL
Presença de doenças crônicas	2 (7)	3 (10)	4 (13)	5 (17)	8 (27)
¹Diabetes	-	-	1 (25)	-	1 (12,5)
¹Hipertensão	1 (50)	1 (33)	-	1 (20)	2 (25)
¹Hipotireoidismo	1 (50)	-	-	1 (20)	2 (25)
¹Problemas respiratórios	-	2 (67)	2 (50)	2 (40)	2 (25)
¹Problemas de coluna	-	-	1 (25)	1 (20)	1 (12,5)

Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%). n = 30/grupo.
¹Frequência e porcentagem em relação aos indivíduos que relataram presença de doenças crônicas. Teste exato de Fisher ($p > 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 3: Comparação de alterações citogenéticas entre análises de língua e bochecha

Alterações Citogenéticas	Língua	Bochecha
Micronúcleo	13,88 ± 12,24	14,03 ± 11,77
Binucleada	8,47 ± 6,33	8,95 ± 6,04
Broto nuclear	3,83 ± 3,29	3,83 ± 3,48
Cariolítica	29,11 ± 22,52	29,93 ± 21,93
Cariorréxis	45,25 ± 35,37	46,14 ± 34,84
Cromatina Condensada	2,31 ± 2,75	2,06 ± 2,13
Picnótica	27,05 ± 24,34	28,01 ± 23,99
Tetranucleada	0,04 ± 0,37	0,05 ± 0,26
Trinucleada	0,31 ± 0,81	0,21 ± 0,59
Total	129,19 ± 85,89	130,29 ± 86,99

Valores expressos como média ± desvio padrão. Teste Wilcoxon pareado. ($p > 0,05$).

Tabela 4. Consumo de bebida alcoólica.

Consumo	GC	GT	GA	GTA
Ingestão de bebida alcoólica	11 (37) ^a	28 (93) ^b	15 (50) ^{ac}	23 (77) ^{bc}
<i>¹Tipo de bebida</i>				
Cerveja	8 (73)	27 (96)	14 (93)	21 (91)
Destilados	3 (27)	1 (4)	1 (7)	2 (9)
<i>¹Frequência de ingestão</i>				
2 a 3 dias/semana	9 (82)	28 (79)	11 (73)	16 (70)
3 ou mais dias/semana	2 (18)	6 (21)	2 (9)	7 (30)

Resultados apresentados em número absoluto e porcentagem – n (%). n = 30/grupo. ¹Frequência e porcentagem em relação aos indivíduos que relataram ingestão de bebida alcoólica. Teste exato de Fisher. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos.

Tabela 5. Frequência de alterações nucleares em consumidores e não consumidores de bebida alcoólica

	GC	GT	GA	GTA
Consumidores				
Alterações totais	24,36 ± 11,12 ^a	108,64 ± 67,57 ^b	202,40 ± 58,34 ^c	177,43 ± 63,42 ^c
MN	1,27 ± 1,19 ^a	12,50 ± 11,11 ^b	21,60 ± 8,76 ^c	19,17 ± 11,15 ^{bc}
Não Consumidores				
Alterações totais	28,78 ± 15,94 ^a	-	166,06 ± 39,47 ^b	237,85 ± 60,40 ^c
MN	1,57 ± 1,53 ^a	-	21,60 ± 8,76 ^b	23,85 ± 17,63 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. n = 30/grupo. Teste ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes (linha) indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (p < 0,05). Os dados de não consumidores do grupo GT não foram comparados, pois apenas dois participantes do grupo apresentavam-se nesta categoria, não possibilitando a análise estatística. GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos, MN = Micronúcleos.

Tabela 6. Matriz de confusão considerando a classificação de três classes (GC, GT e GA), em relação as alterações citogenéticas analisadas, usando o teste SVM e 90% das amostras para conjunto de treinamento

Classificado como (%)	Classe Verdadeira (%)		
	GC	GT	GA
GC	90	6	3
GT	3	76	19
GA	1	1	86

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista e GA = Grupo agroquímicos.

Tabela 7. Matriz de confusão considerando a classificação de quatro classes (GC, GT, GA e GTA), em relação as alterações citogenéticas analisadas, usando o teste *SVM* e 90% das amostras para conjunto de treinamento

Classificado como (%)	Classes			
	GC	GT	GA	GTA
GC	96	3	0	0
GT	9	56	3	29
GA	0	19	60	19
GTA	0	29	20	50

Resultados apresentados em porcentagem. Classes referentes aos grupos de estudo: GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1: Total de alterações nucleares e de células micronucleadas (células da bochecha). A) Média total de alterações nucleares; B) Média de células micronucleadas. Foram consideradas 2.000 células por indivíduo. GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 2: Média de alterações nucleares dos diferentes grupos (células da bochecha). A) células binucleadas; B) células cariolíticas; C) células cariorréxis; D) células com cromatina condensada; E) células picnóticas. Foram consideradas 2.000 células por indivíduo. GC = Grupo controle, GT = Grupo tabagista, GA = Grupo agroquímicos, GTA = Grupo tabagista e agroquímicos. ANOVA com teste *a posteriori* de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 3: Efeito de treinamento sobre o desempenho de classificação das alterações citogenéticas. Valores em porcentagem (%) de acurácia dos diferentes testes aplicados. ANN = Artificial Neural Network, BAY = Bayes Classifier e SVM = Support Vector Machine. Análise realizada com os quatro grupos de estudo (c/GTA) e sem o grupo GTA - grupo exposto ao tabagismo e agroquímicos (s/GTA).

Figura 1

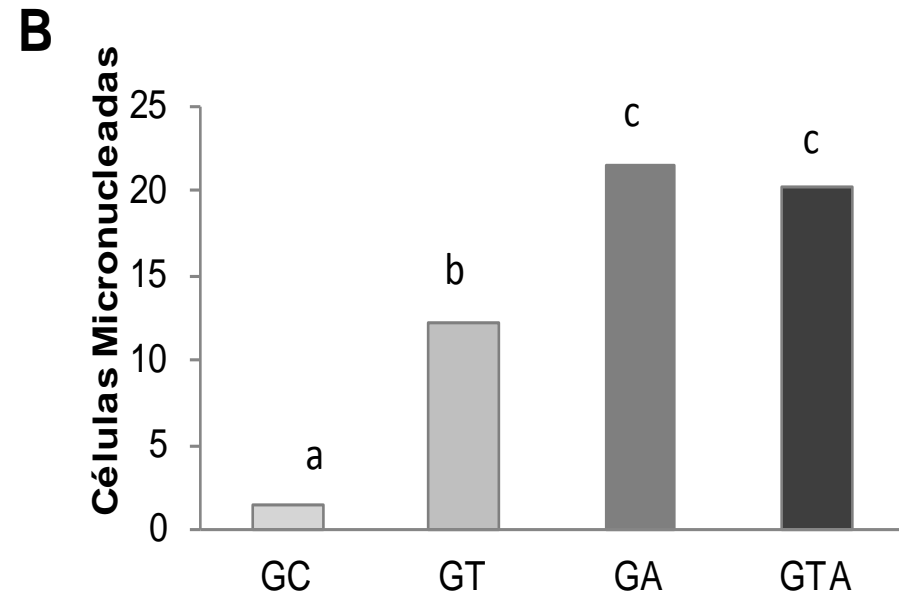
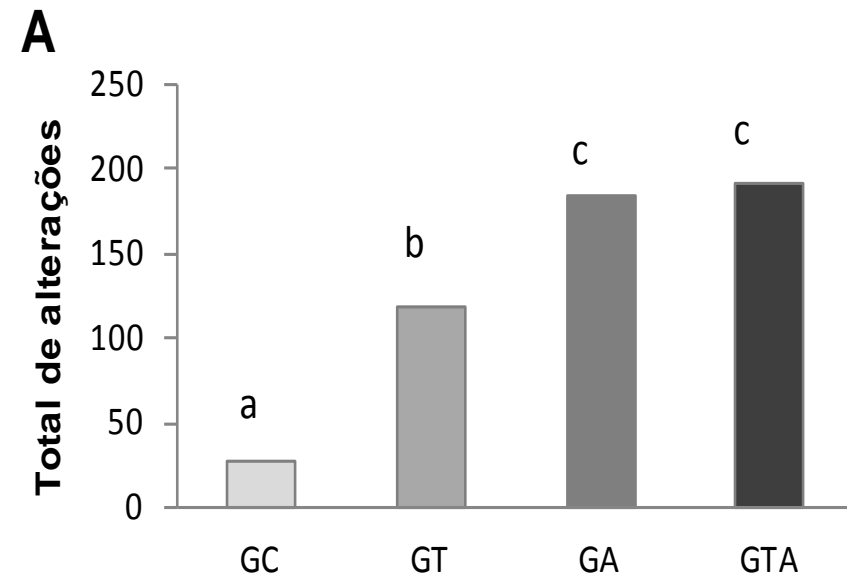


Figura 2

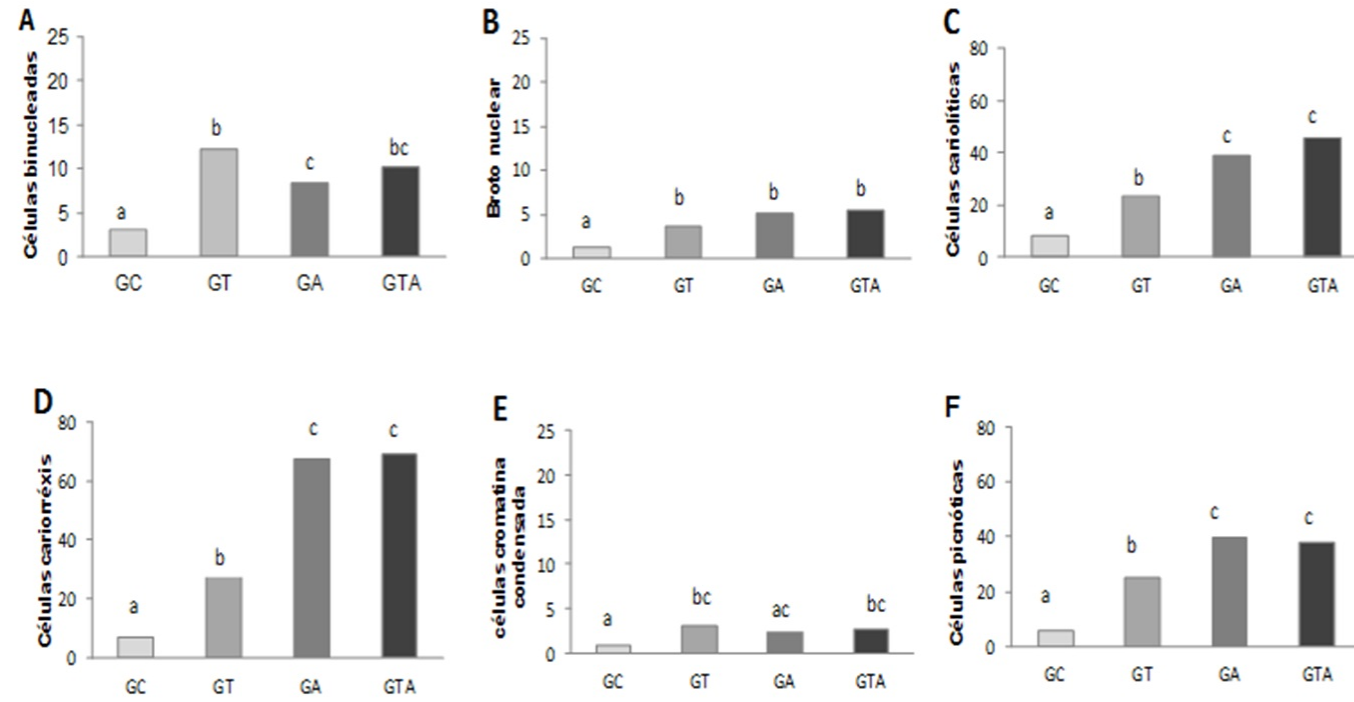
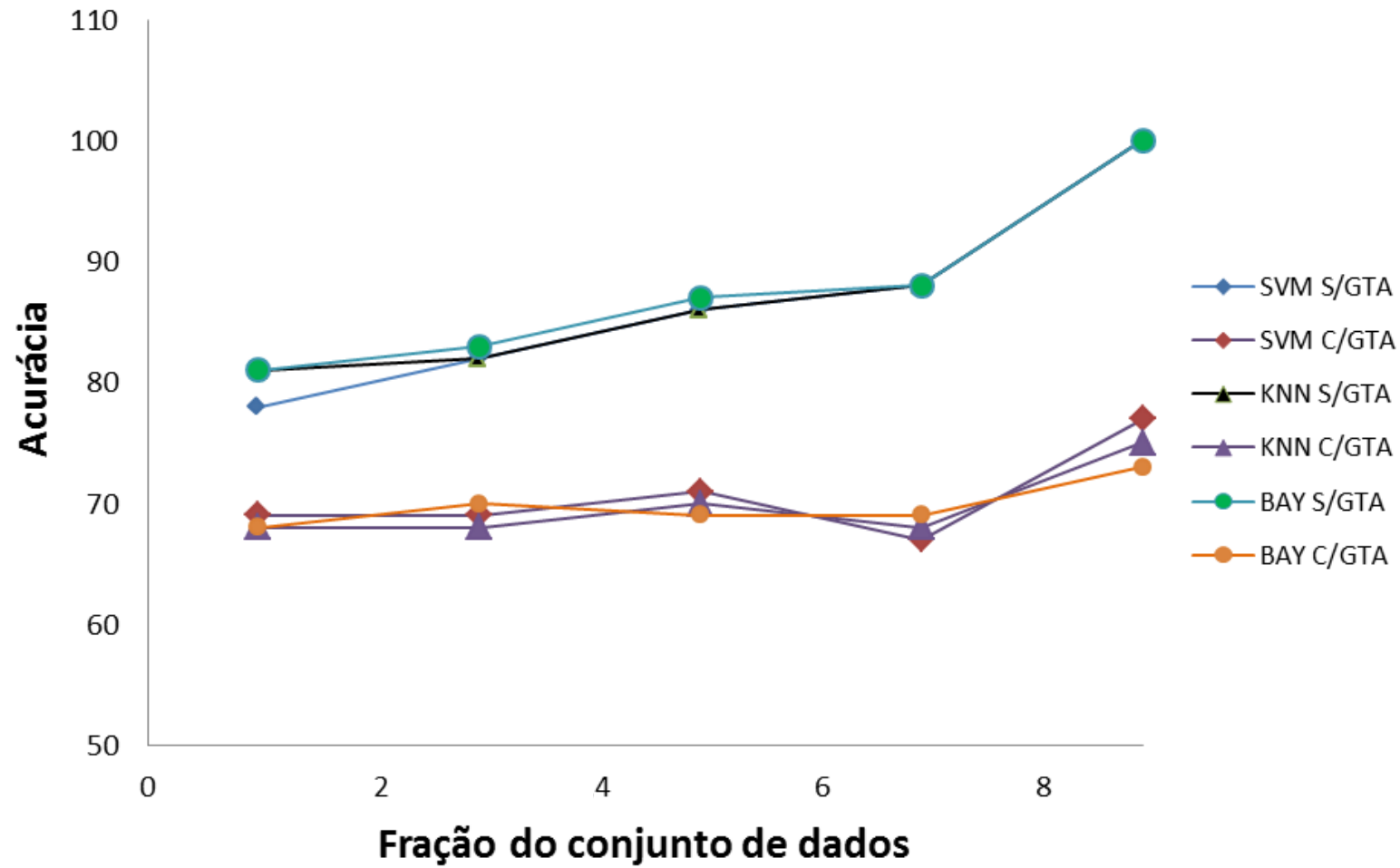


Figura 3



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição a agroquímicos e cigarro, de maneira isolada ou em combinação, demonstrou ser potencialmente ototóxica e genotóxica, levando ao desenvolvimento de alterações citogenéticas e impactos sobre a saúde geral dos indivíduos. Em relação às alterações citogenéticas e presença de células micronucleadas, os indivíduos expostos a agroquímicos demonstraram maiores alterações quando comparados aos expostos ao tabagismo. Já em relação à audição, ambas as substâncias apresentaram efeito capaz de reduzir os limiares auditivos em alta frequência. Quanto à exposição combinada aos dois agentes xenobióticos, não foi observado efeito potencializador ou aditivo para nenhuma das análises realizadas. Além disso, a análise de aprendizado de máquina demonstrou ser uma eficiente ferramenta para identificação de padrões nos resultados auditivos e citogenéticos. Isto demonstra a importância desta ferramenta em estudos na área da saúde.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL Y; PLATZ, E.A; NIPARKO, J.K. Prevalence of hearing loss and differences by demographic characteristics among US adults. **Arch Intern Med.**, v. 168, p. 1522-30, 2008.
- ALAVANJA, M. C.; ROSS, M. K.; BONNER, M. R. Neceased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. **CA Cancer J Clin.**, v. 63, n. 2, p. 120-42, apr. 2013.
- ALTMAN, R. B. Artificial intelligence (AI) systems for interpreting complex medical data sets. **Clin. Pharmacol. Ther.** , v. 9, 2017.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev. Bras. Epidemiol.**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, 2003.
- ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Relatório de atividades de 2011 e 2012**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2002. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home.>>. Acesso em: 23 mai. 2015.
- AUGUSTO, L. G. S. et al. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde: 2ª parte. Rio de Janeiro: **ABRASCO**, 2012.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- BARONE, L. A; MELAZZO, E. S; SILVA, A. A. **Célula do Pontal do Paranapanema – SP: acompanhamento e Informação para o desenvolvimento rural**. Presidente Prudente: Ministério do Desenvolvimento Agrário, n. 5, p. 1-116, 2011.
- BARRETO, M. J. **Territorialização das agroindústrias canavieiras no Pontal do Paranapanema e os desdobramento para o trabalho**. 2013. 244 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente.
- BEDUSCHI-FILHO, L. C. **Sociedade, natureza e reforma agrária: assentamentos rurais e unidades de conservação na região do Pontal do Paranapanema**. 2002. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- BEUREN, I. M. Como elaborar trabalhos monográficos em contabilidade. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2010.
- BLOCHING, M. et al. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. **Oral Oncology**, v. 46, n. 3, 2008.

BOLOGNESI, C. et al. Review: micronuclei and pesticide exposure. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 19-26, 2011.

BOMBARDI, L. M. **Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil**: a nova versão do capitalismo oligopolizado. São Paulo: USP, Departamento de Geografia, 2011.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a **Lei nº 7.802**, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências [documento *on-line*]. Diário Oficial da União; 8 jan 2002. Disponível em URL: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: 22 set. 2016.

BRASIL. Presidência da República, Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Lei Nº 7.802**, de 11 de Julho de 1989.

BÜCKER, A.; WANDERSON, C.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **ACTA Amazônica**, Manaus, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

CARHART, R. Classifying audiograms: na improved method for classifying audiograms. **Laryngoscope**, v. 55, p. 640-62, 1945.

CHEN, M. et al. Residential exposure to pesticide during childhood and childhood cancers: a meta-analysis. **Pediatrics**. v. 136, n. 4, p. 719-729, out. 2015.

CHOI, S. W. et al. Hearing loss as a risk factor for agricultural injuries. **Am. J. Ind.Med.**, v. 48, n. 4, p. 293-301, out. 2005.

CHUNG, D. Y. et al. Factors affecting the prevalence of tinnitus. **Audiology**, v. 23, n. 5, p. 441-52. 12. 2009.

COELHO, C. V. et al. Teste dos micronúcleos: um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **R. Fac.Odontol**. Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan./dez. 2007.

COGO, L. A. et al. Morphological analysis of the vestibular system of guinea pigs poisoned by organophosphate. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 82, n. 1, p. 11-16. 2016.

CONSELHO FEDERAL DE FONOAUDIOLOGIA. **Manual de procedimentos em audiometria tonal limiar, logaudiometria e medidas de imitância acústica**. [S.I.]: Sistema de Conselho Federal e Regionais de Fonoaudiologia, fev., 2013.

COPPIN, B. **Inteligência artificial**. Rio de Janeiro: LTC, 2010.

CRISTIANINI, N.; Shawe-Taylor, J. **An introduction to support vector machines and other kernel-based learning methods**. [S.l.]: Cambridge University Press, 2000.

CRUZ, M. S. et al. Prevalência de deficiência auditiva referida e causas atribuídas: um estudo de base populacional. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 5, p. 1123-1131, may 2009.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 153-61. 2011.

DIAS, A. et al. Associação entre perda auditiva induzida pelo ruído e zumbidos. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 63-68. jan. 2006.

DIMATOS, O. C. et al. Perfil dos pacientes do programa de saúde auditiva do estado de Santa Catarina Atendidos no HU-UFSC. **Arq. Int. Otorrinolaringol. / Intl. Arch. Otorhinolaryngol**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 59-66, jan./mar. 2011.

DUTTA, S.; BAHADUR, H. Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. **Toxicology Mechanisms and methods**, 2016.

EPIPHÂNIO, P. P. D.; ARAUJO, H. B. É o desenvolvimento sustentável, sustentável? (uma análise crítica a toda a retórica que se tem feito em torno do tema). **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 7, n. 11, fev., 2008.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, n. 455, v. 1-2, p. 81-95, nov. 2000.

FENECH, M. et al. Intra and inter laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide scoring exercise by the HUMN project. **Mutat res.**, v. 534, p. 45-64. 2003.

FRAGA, W. G. et al. Identificação dos principais ingredientes ativos em agrotóxicos ilegais apreendidos pela Polícia Federal do Brasil e quantificação do Metsulfurometílico e Tebuconazol. **Rev. Vitual Quim.** v. 8, n. 3, p. 561-575, Jan. 2016.

FRONZA, A. B. et al. Association between auditory pathway efferent functions and genotoxicity in young adults. **Braz J. Otorhinolaryngol.** Santa Maria, v. 77, n. 1, p. 107-14, 2011.

GOMES, M. A. F.; BARIZON, R. R. M. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011. **Documentos 98 EMBRAPA**, maio, 2014.

GREIM, H. et al. Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. **Crit. Rev Toxicol.**, v. 45, n. 3, p. 185-208, mar. 2015.

HEFFERMAN, T. The impact of active and passive smoking upon health and neurocognitive function. **Frente Psychiatry**, v. 7, 2016. (Editorial).

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN Project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res.**, v. 659, p. 93-108, 2008.

HOSHINO, A. C. et al. Ototoxicity study in workers exposed to organophosphate. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 6, p. 912-18, 2008.

IBAMA. **Consumo de agrotóxicos e afins (2010 – 2014)**. Disponível em: <www.ibama.gov.br/consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº4.074/2002>. Acesso em: 22 jun 2016.

INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JALLOW, M. F. et al. Pesticide risk behaviors and factors influencing pesticide use among farmers in Kuwait. **Sci. Total Environ.**, v. 574, p. 490-498, Set. 2016.

JERGER, J. Clinical experience with impedance audiometry. **Arch. Otolaryngol.**, v. 92, n. 4, p. 311-324, 1970.

JERGER, J.; SPEAKS, C.; TRAMMELL, J. A new approach to speech audiometry. **J Speech Hear Disord.**, v. 33, p. 318. 1968.

JERGER, S.; JERGER, J. **Alterações auditivas**: um manual para avaliação clínica. Atheneu: São Paulo, 1989. p. 102.

JUDAI, M. A.; ANTUNES, P. A. **Estudo dos limiões auditivos em frequências convencionais e altas frequências de moradores e trabalhadores expostos a praguicidas na região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo, Brasil**. 2015.144 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Sci. Total Environ.**, v. 0048, n. 16, 2016.

KOERICH, A. **Aprendizagem de Máquina**. Paraná: [s.n.], 2012.

KOPJAR, N. et al. Acute cytogenetic effects of antineoplastic drugs on peripheral blood lymphocytes in cancer patients chromosome aberrations and micronuclei. **Tumori.**, v. 88, p. 300-12, 2002.

KÖRBES, D. **Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias**: estudo anatômico e funcional. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

KÖRBES, D. et al. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição a agrotóxico: revisão de literatura. **Revista Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**. v. 15, n. 1, p. 146-52, 2010.

KÓS et al. Efeitos da exposição a agrotóxicos sobre o sistema auditivo periférico e central: uma revisão sistemática. **Cad. Saúde Pública**, v. 29, n. 8, p. 1491-1506, 2013.

KUNST, L. R. **Audição e biomarcadores do metabolismo oxidativo em escolares de região fumicultora do Rio Grande do Sul**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Distúrbios da Comunicação Humana) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

LINDEBERG, H. et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutat Res.**, v. 617, p. 33-45, 2007.

LLOYD, L. L.; KAPLAN, H. Audiometric interpretation: a manual of basic audiometry. **University Park Press**, Baltimore, 1978.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MAIA, A. P. J. S. Avaliação auditiva: como proceder. **Revista de Pediatria SOPERJ**, p. 35-39, 2011.

MANJABOSCO, C. A. W.; MORATA, T. C.; MARQUES, J. M. Perfil audiométrico de trabalhadores agrícolas. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, v. 8, n. 4, p. 285-295, out/dez., 2004.

MARTINO, J. M. **Elementos de inteligência artificial utilizados em jogos digitais: conceitos, objetivos e tendências**. Campinas: [s.n.], 2009.

MELLO, C. M; SILVA, L. F. Fatores associados à intoxicação por agrotóxicos: estudo transversal com trabalhadores da cafeicultura no sul de Minas Gerais. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 609-620, out./dez. 2013.

MELTZER, H. M., et al. The impact of iron status and smoking on blood divalent metal concentrations in Norwegian women in the HUNT2 study. **J. Traço. Elem. Med. Biol.**, 2016.

MENEZES, P. L.; NETO, S. C; MOTTA, M. A. **Biofísica da audição**. São Paulo: Lovise, 2005. p.185.

MINICUCCI, E. M. et al. DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumor undergoing chemotherapy. **Clin Exp. Med.**, v. 8, n. 2, p. 79-85, jul. 2008.

MOMENSOHN-SANTOS, T. M; RUSSO, I. P. **Prática da audiologia clínica**. 7.ed. São Paulo: Cortez, 2009.

MIZOUE, T.; MIYAMOTO, T.; SHIMIZU, T. Combined effect of smoking and occupational exposure to noise on hearing loss in steel factory workers. **Occup. Environ Med.**, v. 60, n. 1, p. 56-9, jan. 2003.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação do risco à saúde humana decorrente do uso de agrotóxicos na agricultura e pecuária na região Centro Oeste. **Relatório de Pesquisa**, Brasília, 2010.

NASCIMENTO, L. A; SANTOS, W. P. **Uma ferramenta de auxílio à Terapia audiológica para Portadores de deficiência auditiva**. 2010. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Escola Politécnica de Pernambuco, Universidade de Pernambuco.

NAKANISHI, N. et al. Cigarette smoking and risk for hearing impairment: a longitudinal study in Japanese male Office workers. **J. Occup. Environ. Med.**, v. 42, n.11, p.1045-9, 2000.

NOORHASSIM, I.; RAMPAL, K. G. Multiplicative effect of smoking and age on hearing impairment. **Am. J. Otology**, v. 19, n. 4, p. 240-3, 1998.

NORTHEN, J. L.; DOWS, M. P. Hearing in children. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. P. 89.

ODUM, E. P.; BARRET, G. W. **Fundamentos de ecologia**. São Paulo: Cengage Learning, 2008. v. 5, p. 612.

OGANDO, P. B.; LUBIANCA NETO, J. F. Entendendo a triagem auditiva neonatal e as causas da perda auditiva na infância. **Boletim Científico de Pediatria**, v. 1, n. 2. 2002.

OLIVEIRA, C. C. C.; VARGAS, M. M.; SENA, T. R. R. Saúde auditiva e qualidade de vida em trabalhadores expostos a agrotóxicos. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v. 18, n. 6. jan/jun., 2013.

OLIVEIRA, D. C. C. M.; LIMA, M. A. M. T. Da audiometria tonal limiar em baixa e alta frequência: comparação dos limiares auditivos entre tabagistas e não-tabagistas. **Braz. J. Otorhinolaryngol.** v. 75, n. 5. set/out. 2009.

OLIVEIRA, N. F. P. Alterações no epigenoma e o hábito de fumar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 14, n. 4, p. 101-106, 2011.

PASCHOAL, C. P; AZEVEDO, M. F. O cigarro como um fator de risco para alterações auditivas. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, São Paulo, v. 75, n. 6, p. 893-902, nov./dec., 2009.

PEREIRA, L. M. Inteligência artificial: mito e ciência . São Paulo: [s.n.], 2005.

PINTO, P. C. L.; SANCHEZ, T. G.; TOMITA, S. Avaliação da relação entre severidade do zumbido e perda auditiva, sexo e idade do paciente. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 76, n. 1. jan/fev., 2010.

RAMOS, E. M. C. et al. Reversibility of impaired nasal mucociliary clearance in smokers following a smoking cessation programme. **Respirology**, n. 16, p. 849-855, 2011.

REYNOL, F. **Pesquisa da Unicamp impulsiona campo da computação quântica**. São Paulo: [s.n.], 2010.

ROCHA, R.S. **Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais**. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.

ROGHA, M. et al. Cigarette smoking effect on human cochlea responses. **Adv. Biomed. Res.**, v. 4, p. 148, 2015.

SANTOS, M. A. T; AREAS, M.,A.; REYES, F. G. R. Piretróides: uma visão geral. **Alim. Nutri.**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, jul./set. 2007.

SARAN, R. et al. Risk assessment of oral cancer in patients with pre-cancerous state of the oral cavity using micronucleus test and challenge assay. **Oral Oncol.**, v. 44, p. 354-360. 2008.

SAVOY, V. L. T. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 91-92, 2011.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Res.**, v. 31, p. 9-15, 1975.

SEARCHFIELD, G. D. et al. The impact of hearing loss on tinnitus severity. **J. Audiol.**, v. 29, n. 2, p. 67-76. 2007.

SILMAN, S.; SILVERMAN, C. A. Basic audiologic testing. In: SILMAN, S.; SILVERMAN, C. A. **Auditory diagnosis: principles and applications**. San Diego: Singular Publishing Group, 1997. p. 44-52.

SILVA, F. R. et al. Application of the buccal micronucleus cytome assay and analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6*9(-48T>G) polymorphisms in tobacco farmers. **Environ. Mol. Mutagéneo**, n. 7, p. 525-34. 2012.

SILVA, S. T. et al. Combate ao Tabagismo no Brasil: a importância estratégica das ações governamentais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 2, p. 539-552, 2014.

SILVA, V. H. P. et al. Cytogenetic biomonitoring in buccal mucosa cell from Young smokers. **Acta Cytologica**, v. 59, n. 6, p. 474-478, Fev. 2015.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSÍVOS AGRÍCOLAS – SINDAG. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>. Acesso em: 25. Jun. 2016.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas**. 2011. Disponível em:http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=105&sid=107 acesso em: 16 jun. 2015.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Micronuclei in exfoliated human cells as an internal dosimeter for exposures to carcinogens. In: STICH, H.F. (Ed.). **Carcinogens and Mutagens in the Environment**. Boca Raton: CRC Press, 1983. v. 2, p. 17-25.

THOMAS, P.; FENECH, M. Buccal micronucleus cytome assay. **Métodos Mol Biol**. v. 682, p. 235-248, 2011.

TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. **Am. J. Epidemiol**, v. 134, p. 69-77, 1992.

UMBUZEIRO, G. A.; HERINGA, H.; ZEIGER, E. In vitro genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. **Adv. Biochem Eng. Biotechnol. set.**, 2016.

VEIGA, M. M; MELO, C. F. C. A. Análise da eficiência dos equipamentos de proteção aos agrotóxicos utilizados em saúde pública. **Laboreal**, Porto , v. 12, n. 1, p. 53-62, jul. 2016.

VERGES, N. M. **Crítica à noção de multifuncionalidade rural em assentamentos de reforma agrária no Pontal do Paranapanema – SP**. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente.

XAVIER, R. F. et al. Effects of cigarette smoking intensity on the mucociliary clearance of active smokers. **Respiratory**, v. 86, n. 6, p. 479-85., abr. 2013.

WILD, D. C.; BREWSTER, M. J.; BANERJEE, A. R. Noise-induced hearing loss is exacerbated by long-term smoking. **Clin Otolaryngol.**, v. 30, n. 6, p 517-20., dez. 2005.

ZULAUF, W. E. O meio ambiente e o futuro. **Estud. Av. São Paulo**, v. 14, n. 39, mai./ago. 2000.

ANEXOS**ANEXO A – PARECER FINAL**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica**Parecer Final**

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO AUDITIVA DE TRABALHADORES RURAIS EXPOSTOS À COMBINAÇÃO PRAGUICIDAS E CIGARRO E SUA CORRELAÇÃO COM UM BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 2754 e tendo como participante(s) ANA PAULA ALVES FAVARETO (responsável), PATRICIA ALEXANDRA ANTUNES (docente), MEIRE APARECIDA JUDAI (docente), JAMILE SILVEIRA TOMIAZZI (discente), NATALIA DOS SANTOS MEIA CASA (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 2 de Fevereiro de 2016.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Dr. Gisele Alborghetti Nai
Coordenadora do CEP - UNOESTE

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “Avaliação auditiva e citogenética de trabalhadores rurais expostos à combinação de tabagismo e agroquímicos”.

Nome do (a) Pesquisador (a): Jamile Silveira Tomiazzi; Natália Dos Santos Meia Casa; Ana Paula Alves Favareto; Patrícia Alexandra Antunes; Meire Aparecida Judai.

Natureza da pesquisa: O Sr (Sra.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade avaliar possíveis alterações auditivas de trabalhadores expostos à combinação de tabagismo e agroquímicos.

Participantes da pesquisa: 120 trabalhadores que tenham contato com agroquímicos e cigarro.

- 1- Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo o sr (sra) permitirá que a pesquisadora Jamile Silveira Tomiazzi faça a coleta de dados através da aplicação de questionário, realização de exames auditivos, e teste de biomarcador com o exame de saliva. O sr (sra.) tem liberdade de não participar e ainda de não continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone do Comitê de Ética em Pesquisa.
- 2- Sobre as avaliações:** o estudo contará com um questionário com 10 questões fechadas para caracterização dos participantes e coleta de informações específicas sobre a audição, uso de cigarro e agroquímicos. Além disso, serão realizados exames auditivos e coleta de materiais (saliva) de forma não invasiva e seguindo todos os procedimentos éticos necessários.
- 3- Riscos e desconforto:** Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.
- 4- Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o (a) pesquisador (a) (e/ou equipe de

pesquisa) terá conhecimento de sua identidade e o pesquisador compromete-se a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

5- **Benefícios:** ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes a autoeficácia e o bem-estar na profissão docente. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos, respeitando-se o sigilo das informações coletadas, conforme previsto no item anterior.

6- **Pagamento:** o sr (sra.) não terá nenhum tipo de despesa ao participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Confiro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento para participar da pesquisa.

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante

RG ou CPF do Participante da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

RG ou CPF do Pesquisador

Pesquisador: Jamile Silveira Tomiazzi; Ana Paula Alves Favareto; Patrícia Alexandra Antunes

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa: Profa. Dra. Gisele Alborgheti
Nai

Vice-Coordenadora: Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira

Telefone do Comitê: 3229-2077

Telefone da Pesquisadora: (18) 98152-2646

E-mail cep@unoeste.br

ANEXO C - QUESTIONÁRIO

Data: ___ / ___ / ____

Identificação:

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: (M) (F) Trabalha atualmente? () Sim () Não

Função que exerce: _____

Há quanto tempo? _____

1. Trabalhou ou trabalha com ruído?

() Sim () Não Há quanto tempo? _____

2. Trabalhou ou trabalha com agroquímicos:

() Sim () Não Há quanto tempo? _____

Qual(s) o(s) agroquímicos (s) utilizado(s)?

Modo de aplicação: _____

3. Já utilizou ou utiliza EPI?

() Sim () Não

Quais? _____

4. Já apresentou quadros de intoxicações?

() Sim () Não

Quais os sintomas apresentados? _____

5. Fuma?

() Sim () Não Há quanto tempo? _____

Quantos cigarros fuma diariamente? _____

Qual a marca do cigarro usa? _____

6. Consumo de bebida alcoólica?

() Sim () Não Qual? _____

() Diariamente () Aos finais de semana () 2 ou 3 vezes na semana

7. Tem dificuldades para ouvir?

() Sim () Não

8. Ouve zumbido?

() Sim () Não () Orelha Direita Orelha Esquerda ()

Desde quando? _____

9. Qual a natureza do ruído?

() Contínuo

() Rítmico, pulsátil ?

10. Apresenta alguma doença crônica?

() Sim () Não

Qual (is)? _____

ANEXO D - GUIA PARA AUTORES

Revista Environmental Health Perspectives

Link: <https://ehp.niehs.nih.gov/publication-sequence/>

Revista Chemico - Biological Interactions

Link: <https://www.elsevier.com/journals/chemico-biological-interactions/0009-2797/guide-for-authors>