

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE - UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Mateus Belmonte Macedo

**AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO
NERVO LARÍNGEO RECORRENTE
DE RATOS WISTAR EXPOSTOS A
AGROTÓXICOS**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2020

Mateus Belmonte Macedo

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO NERVO LARÍNGEO RECORRENTE DE RATOS WISTAR EXPOSTOS A AGROTÓXICOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dra. Eliane Dallegrave
Coorientadora: Dra. Taís Malysz

Porto Alegre

2020

Catalogação na Publicação

Macedo, Mateus Belmonte

Avaliação Morfométrica do Nervo Laríngeo Recorrente de Ratos Wistar Expostos a Agrotóxicos / Mateus Belmonte Macedo. -- 2020.

76 p. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2020.

Orientador(a): Eliane Dallegrave ; coorientador(a): Taís Malysz.

1. Inseticidas . 2. Ratos. 3. Nervo Laríngeo Recorrente . 4. Bainha de Mielina. 5. Exposição por Inalação . I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Dedico este trabalho à minha mãe Nilza Rosane Machado Belmonte por
todo o apoio, incentivo, carinho e amor incondicional.**

Sem você, eu jamais chegaria até aqui.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a. Eliane Dallegrave pela orientação, amizade, confiança, incentivo e ensinamentos no desenvolver deste estudo. Uma grande referência e inspiração para mim, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, por ser uma mulher de fibra, genial e visionária! Muito obrigado!

À Prof^a. Dr^a. Taís Malysz do PPG Neurociências da UFRGS pela parceria, coorientação e colaboração na construção deste trabalho. Obrigado por me acolher desde a graduação até aqui!

Ao Prof. Dr. Deivis de Campos por me orientar desde o princípio da minha jornada acadêmica na área da Anatomia Humana. Pela amizade, confiança, carinho e ensinamentos.

À Doutoranda do PPG de Patologia da UFCSPA Aléxia dos Reis pela amizade e colaboração neste estudo.

À Doutoranda do PPG de Patologia da UFCSPA Eduarda Oliveira Cunha por toda paciência, colaboração, ensinamentos e, acima de tudo, por sempre me socorrer nos momentos difíceis.

Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Marina Tuerlinckx, Rafaella Câmara, Juliana Fank e Danielly Bassani pelo apoio e carinho.

Ao Técnico do Laboratório de Anatomia Humana da UFRGS Antônio Generoso Severino por todo o auxílio na dissecação dos nervos.

À Técnica do Laboratório de Neurobiologia Comparada da UFRGS Eliane de Oliveira Borges por todo o auxílio na ultramicrotomia dos nervos.

Ao Técnico do Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS Maikel Rosa Oliveira por todo o suporte na obtenção das imagens dos nervos.

À minha mãe e Iniciação Científica Nilza Rosane Machado Belmonte por ser a pessoa que tem a alma mais grandiosa, a natureza mais nobre, o coração mais doce e o carinho mais meigo que me inspiram e me motivam. Por todo incentivo e amor incondicional. Por sempre me acolher nos momentos difíceis, aconselhar e orientar. Por ter dedicado a sua vida à minha o que, sem sombra de dúvida, foi decisivo para que eu me tornasse o ser humano que sou hoje. Além disso, por todo o auxílio imprescindível para realização das mensurações das fibras nervosas. As palavras jamais poderão expressar toda a minha gratidão! Muito obrigado!

Ao meu pai Luis Eduardo Aragão Macedo por fornecer, mesmo sem poder estar sempre presente na minha vida acadêmica, todos os subsídios para que eu chegasse até aqui! Por todo o incentivo, amor e carinho. Muito obrigado!

Ao meu irmão Fagner Eduardo Belmonte Macedo pela amizade, amor, carinho e paciência nos momentos de estresse.

Ao meu amor Bruno Carniel por colaborar com sugestões ao longo do texto, alegrar meus dias, incentivar todas as minhas decisões e por sempre estar ao meu lado.

A todos os amigos e familiares que me apoiaram e deram força para que este projeto tenha sido concebido, desenvolvido e concluído. Em especial, aos meus grandes amigos Allana Vieira, Andressa Birck, Bruna Cristaldo, Renata Demartini, Stéfane Santos e Thays Rabelo. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre pela excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado, apoio fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

Aos animais, modelos experimentais, que possibilitaram a obtenção dos resultados deste estudo que serão utilizados em prol da humanidade.

*“A sabedoria suprema é ter sonhos bastante grandes para
não se perderem de vista enquanto os perseguimos.”*

William Faulkner

RESUMO

Introdução: Indivíduos expostos pela via inalatória a compostos químicos podem apresentar sintomas respiratórios, disfagia, e alterações vocais que podem se manifestar conforme o tipo, concentração e o tempo de exposição ao agente tóxico. A cipermetrina e o diclorvós são pesticidas amplamente utilizados na agricultura, em campanhas de saúde pública, na medicina veterinária e em ambientes domésticos. Todavia, apesar das evidências científicas demonstrarem que essas substâncias podem causar danos neurodegenerativos e alterações motoras, não há estudos que avaliem os efeitos tóxicos na morfologia das estruturas responsáveis pela mobilidade vocal, especialmente o Nervo Laríngeo Recorrente (NLR). **Objetivos:** Avaliar as possíveis alterações na microestrutura do NLR secundárias à exposição inalatória subcrônica aos agrotóxicos: diclorvós (organofosforado) e cipermetrina (piretroide) em ratos Wistar. **Materiais e Métodos:** 15 ratos Wistar machos foram alocados em 3 grupos: Controle (n=5, expostos à água, veículo de diluição da formulação), Cipermetrina [n=5, expostos à cipermetrina – 1/10 da Concentração Letal Mediana Inalatória (CL₅₀) - 0.25mg/L] e Diclorvós (n=5, expostos ao diclorvós – 1/10 da CL₅₀- 1.5mg/L). A exposição inalatória ocorreu durante 4h diárias, 5 vezes por semana, por 6 semanas (CEUA-UFCSPA: 321/15 e 323/15). Os nervos foram coletados e analisados utilizando parâmetros histomorfométricos mensurados por meio do software ZEN 2.6 (Zeiss – Alemanha). **Resultados:** Os achados morfométricos do NLR dos grupos Cipermetrina e Diclorvós evidenciaram alterações significativas ($p < 0.001$, ANOVA) no g-ratio e na espessura da bainha de mielina quando comparados ao controle, no entanto, nenhum dos demais parâmetros avaliados demonstrou diferenças estatisticamente significativas. **Conclusão:** A exposição subcrônica inalatória de 1/10 da CL₅₀ da cipermetrina e do diclorvós aumentou significativamente o grau de mielinização do NLR e o diclorvós reduziu significativamente a espessura da bainha de mielina, ambos efeitos em comparação a avaliação do NLR do grupo controle em modelo animal.

Palavras-chave: diclorvós, cipermetrina, nervo laríngeo recorrente, exposição inalatória, g-ratio.

ABSTRACT

Introduction: Exposure to chemical compounds by inhalation can cause vocal disorders and dysphagia in humans, in addition to other symptoms that are manifested according to the type, concentration and duration of exposure to the substance. Cypermethrin and dichlorvos are pesticides widely used in agriculture, public health, veterinary and home environments. Although there is scientific evidence that cypermethrin and dichlorvos can cause neurodegenerative damage and motor alterations, there are no studies that evaluate their toxic effects on the morphology of structures responsible for vocal mobility, especially the Recurrent Laryngeal Nerve (RLN). **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the possible alterations in the microstructure of the RLN secondary to subchronic exposure to cypermethrin and dichlorvos in Wistar rats. **Materials and methods:** Fifteen male Wistar rats were allocated in 3 groups: Control (n = 5, exposed to water, dilution vehicle of the formulation), Cypermethrin [n = 5, exposed to cypermethrin - 1/10 of the inhalation median lethal concentration (LC₅₀) - 0.25mg / L] and Dichlorvos (n = 5, exposed to dichlorvos - 1/10 LC₅₀ - 1.5mg / L). Inhalation exposure was performed for 4 hours, 5 times per week, for 6 weeks (CEUA-UFCSPA: 321/15 and 323/15). The nerves were collected and analyzed using morphometric parameters measured using ZEN 2.6 (Zeiss – Germany). **Results:** The morphometric findings of the RLN of the Cypermethrin and Dichlorvos groups demonstrated significant changes ($p < 0.001$, ANOVA) in the g-ratio and in the thickness of the myelin sheath compared to the control. However, none of the other parameters evaluated showed statistically significant differences. **Conclusion:** 1/10 of the inhalation LC₅₀ subchronic exposure of cypermethrin and dichlorvos were able to increase the g-ratio of the RLN and dichlorvos reduced the thickness of the myelin sheath, both effects compared to the RLN assessment of the control group in animal model.

Keywords: dichlorvos, cypermethrin, recurrent laryngeal nerve, inhalation exposure, g-ratio.

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
AD	<i>Axon diameter</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOI	<i>Area of interest</i>
AP	<i>Axon perimeters</i>
AT	<i>Adipose tissue</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CF	<i>Collagen fibrils</i>
CL ₅₀	Concentração Letal, 50%
FD	<i>Myelinated fiber diameter</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i>
LC ₅₀	<i>Lethal concentration, 50%</i>
RLN	<i>Recurrent Laryngeal Nerve</i>
MFP	<i>Myelinated fiber perimeters</i>
MST	<i>Myelin sheath thickness</i>
NLR	Nervo Laríngeo Recorrente
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PChE	Pseudocolinesterase
SNC	Sistema Nervoso Central

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 ALTERAÇÕES VOCAIS E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS	15
1.3 ORGANOFOSFORADOS	17
1.3.1 DICLORVÓS	18
1.4 PIRETROIDES	19
1.4.1 CIPERMETRINA	20
1.5 NERVO LARÍNGEO RECORRENTE	21
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO	22
3. OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	27
5. CONCLUSÕES	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
7. ANEXOS	38
7.1 PARECERES DO CEUA DA UFCSPA	38

1. REFERÊNCIAL TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

As lesões do trato respiratório inferior decorrentes da inalação de compostos químicos são amplamente documentadas na literatura^{1,2}. Contudo, ainda são escassos os estudos que se referem aos efeitos no trato respiratório superior^{3,4}.

A literatura descreve que indivíduos expostos pela via inalatória a compostos químicos apresentam falta de ar, tosse, tensão na região cervical, rouquidão, rinite, disfagia para líquidos e sólidos, dispneia, irritação na garganta, faringite, laringite e disfunção das pregas vocais. Também são descritos outros sintomas que se manifestam conforme o tipo, concentração e o tempo de exposição à substância⁵⁻⁷. São referidos na literatura diversos agentes capazes de induzir alterações sobre o trato respiratório, incluindo saneantes, agrotóxicos, químicos industriais, entre outros^{8,9}.

Dentre os agrotóxicos mais amplamente utilizados, os inseticidas organofosforados e os piretroides são os mais relatados envolvendo casos de intoxicação¹⁰. O diclorvós é um agrotóxico da classe dos organofosforados que é utilizado para o combate de insetos na agricultura, em medicina veterinária, em ambiente doméstico, prédios comerciais e industriais, unidades de saúde, escolas, bem como na saúde pública a fim de controlar vetores¹¹. A cipermetrina é um agrotóxico, da classe dos piretroides, tipo II, que é utilizado principalmente na agricultura, na medicina veterinária, na saúde pública e em ambientes domésticos. Devido à alta eficácia e baixa toxicidade em mamíferos, os piretroides são largamente utilizados^{2,12}. Por apresentar baixo fator de risco

ambiental, a cipermetrina tem sido amplamente aplicada como alternativa às substâncias com maior potencial tóxico¹³.

Embora esses agrotóxicos apresentem menores riscos quando comparados a outras classes de agrotóxico, ainda há muitas evidências que problematizam seu uso indiscriminado. Estudos realizados em modelo animal concluem que a exposição aos agrotóxicos gera alterações hematológicas, bem como histopatológicas no encéfalo e no controle motor de ratos Wistar¹⁴⁻¹⁶.

A inalação da cipermetrina também provoca quadros alérgicos¹⁷, os quais possuem influência direta na adequada produção da voz. Em geral, as alterações encontradas nos indivíduos com distúrbios alérgicos são: modificação do padrão vibratório da laringe, comprometimento da boa projeção vocal e alteração da ressonância da voz. Além disso, os distúrbios alérgicos constituem a causa mais frequente do prolongamento da fonoterapia¹⁸⁻²¹.

Apesar da existência de evidências científicas que os piretroides e os organofosforados causam danos neurodegenerativos e alterações motoras não há estudos que avaliem os efeitos tóxicos da cipermetrina e do diclorvós na morfologia das estruturas responsáveis pela mobilidade vocal, especialmente o Nervo Laríngeo Recorrente (NLR).

1.2 ALTERAÇÕES VOCAIS E SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

Neste capítulo serão discutidas as alterações vocais induzidas por substâncias químicas, estabelecendo as possíveis relações entre a exposição aos agrotóxicos organofosforados e piretroides, sua influência sobre o sistema

nervoso periférico, incluindo estudos conduzidos em humanos ou modelos animais, fundamentados na literatura.

Primeiramente, deve-se ressaltar que a inalação de substâncias químicas e sua associação com as alterações vocais ainda não é bem estabelecida na literatura^{10,22,23} sendo que a maior parte dos estudos são relatos de caso²². Perkner *et al.* descreveram uma intoxicação na qual dois indivíduos inalaram amoníaco e propano e, após a exposição, apresentaram tosse, rouquidão, disfunção das pregas vocais, tensão na cervical e disfagia para líquidos e sólidos⁵. Outro estudo envolvendo intoxicação por substâncias químicas por via inalatória também descreve alterações vocais após a exposição. Nesse estudo, o indivíduo inalou gás de cloro em decorrência de um acidente envolvendo dois trens. Após o ocorrido, foram relatados sintomas de tosse, ardor na garganta e disfunção das pregas vocais⁷.

No estudo de Lisbôa e Mello também são descritas alterações vocais após exposição a compostos químicos. As autoras realizaram uma análise de prontuários para identificar a existência de sinais e sintomas vocais e em fala em pacientes expostos a agentes químicos. Dos registros analisados, haviam quatro pacientes expostos ocupacionalmente a agrotóxicos, ambos guardas de endemia atendidos em um ambulatório de toxicologia. Dois trabalhadores apresentavam rouquidão como um dos sintomas principais. O primeiro, do sexo masculino, manipulava e aplicava inseticida organofosforado (Malation) e piretroide (sem especificação) há 14 anos. No segundo caso, uma mulher afastada há dois anos da atividade laboral fora exposta aos inseticidas organofosforados (Malation e Temefós) por 12 anos. Os outros dois pacientes

relataram perda de voz após exposição a agrotóxicos. Uma das trabalhadoras foi exposta a organofosforado (sem especificação) por 14 anos. A outra já estava afastada da exposição laboral, porém tinha histórico de exposição aos organofosforados Malation e Temefós por 8 anos¹⁰.

Embora a utilização de compostos químicos possa estar envolvida com alterações vocais, a literatura ainda não evidencia os efeitos dos agrotóxicos na inervação motora da laringe. Entretanto, ela aponta que os efeitos neurotóxicos da cipermetrina e do diclorvós são capazes de causar danos a muitas partes do cérebro, levando a incoordenações motoras^{15,24-26}.

1.3 ORGANOFOSFORADOS

Desde o século XX, os organofosforados vêm sendo desenvolvidos e utilizados. A descoberta de seus efeitos tóxicos, em 1932, fez com que essas substâncias, infelizmente, se transformassem em uma arma de guerra perigosa ao meio ambiente e ao ser humano. No panorama ocupacional, o uso desses agrotóxicos é preocupante, uma vez que seguem sendo uma das classes de agrotóxicos mais utilizadas mundialmente. Os organofosforados são os agentes anticolinesterásicos mais envolvidos em intoxicações, sejam acidentais/ocupacionais (geralmente pela via cutânea e respiratória) ou por tentativa de suicídio (comumente a via digestiva)²⁷.

Seu mecanismo de toxicidade ocorre por meio da inibição de duas enzimas: acetilcolinesterase (AChE), encontrada nas junções sinápticas e nas hemácias, e butirilcolinesterase – também conhecida como pseudocolinesterase (PChE) ou colinesterase plasmática, encontrada no plasma. A AChE e a PChE

têm como função a quebra da acetilcolina e, quando ocorre a inibição destas enzimas, há acúmulo de acetilcolina nos receptores muscarínicos, nicotínicos e no sistema nervoso central (SNC)²⁸. Sendo assim, os anticolinesterásicos propiciam acúmulo de acetilcolina nos sítios colinérgicos, fazendo com que a transmissão colinérgica pós-sináptica não cesse no tempo adequado, o que gera uma síndrome colinérgica. Após serem absorvidos, os organofosforados se distribuem por todos os tecidos e pelo SNC, pois atravessam a barreira hematoencefálica²⁷.

1.3.1 DICLORVÓS

O diclorvós é um inseticida Organofosforado, em forma líquida, transparente e levemente amarelado, com odor característico. De acordo com a ficha técnica do formulado comercial Kelldrin®, diclorvós é utilizado para o combate de moscas e pulgas em residências, prédios comerciais e industriais, armazéns, restaurantes, padarias, escolas, hospitais e meios de transporte, bem como na saúde pública a fim de controlar vetores, e como recurso na medicina veterinária – no combate a ectoparasitas de cães e gatos¹¹. Além disso, também tem seu uso no setor primário da economia brasileira nas atividades de agricultura e pecuária. Trata-se de uma substância lipossolúvel, absorvida por via cutânea, digestiva e respiratória, sendo esta última forma, a mais eficaz de absorção, seguida por digestiva e cutânea. Dessa maneira, o início da sintomatologia tende a ser mais precoce quando este é inalado²⁷.

Os organofosforados são inseticidas amplamente utilizados em cultivos agrícolas, indústrias químicas e em saúde pública no combate de vetores. A

literatura descreve que esses compostos químicos são potenciais causadores da “Neuropatia Retardada Induzida por Organofosforados”, esta é caracterizada pela degeneração distal de axônios do SNC e periférico²⁹. Embora existam relatos de efeitos neuropáticos em seres humanos, não há descrição na literatura dos danos causados pela inalação de organofosforados à inervação motora da laringe. A compreensão dos efeitos, em especial, no NLR, responsável pela mobilidade vocal, é extremamente importante para o melhor entendimento das paralisias de pregas vocais bilaterais causadas pela exposição a organofosforados. São escassos estudos que relatem a ação dos organofosforados à voz, os existentes são relatos de casos no qual os pacientes se intoxicaram por via oral¹⁰. No estudo de Indudharan *et al.*, o indivíduo ingeriu acidentalmente um composto de organofosforado e após desenvolveu paralisia de abdução bilateral das pregas vocais, conseqüentemente gerando atraso de coaptação glótica, resultando em uma disfonia^{30,31}.

1.4 PIRETROIDES

Os piretroides são compostos sintéticos, inicialmente desenvolvidos e comercializados com ação contra insetos domésticos e posteriormente desenvolvidos para o emprego no combate de pragas da agricultura³². Atualmente, como alternativa aos agrotóxicos reconhecidos como muito tóxicos, os piretroides foram difundidos como alternativa de baixa toxicidade, baixo impacto ambiental quando comparados aos outros agrotóxicos^{33,34}.

Apesar do conhecimento do efeito tóxico dessas substâncias, o uso de agrotóxicos, como os piretroides é ainda amplamente difundido, sendo nos

últimos anos, o uso de mais comum, para controle de vetores^{32,33}. Essa grande difusão do uso de piretroides nos últimos anos se deve ao fato de apresentarem como substâncias alternativas a muitos agrotóxicos que tiveram seu uso proibido devido à alta toxicidade e/ou persistência no ambiente.

Os piretroides são divididos em dois grupos: tipo I e tipo II, baseado nos sintomas produzidos em animais experimentais que receberam doses agudas tóxicas dos piretroides e na presença ou ausência do grupo alfa-ciano em sua estrutura. Piretroides tipo II apresentam um grupo ciano em sua estrutura, como a cipermetrina e deltametrina³⁵. Os piretroides tipos II estão associados a ação no SNC, causando a Síndrome da Coreoatetose, tendo como sintomas, em ratos, a presença de salivação, agitação das patas anteriores, tremores periódicos que podem evoluir à coreoatetose e, em alguns casos, a movimentos clônicos repetitivos³².

1.4.1 CIPERMETRINA

A cipermetrina é um inseticida, usualmente em fórmula líquida, para ser diluído com água para pulverizações³⁶. De acordo com a ANVISA, a cipermetrina é utilizada na agricultura nas culturas de algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, citros, ervilha, feijão, feijão-vagem, fumo, mandioca, melancia, milho, pepino, repolho, soja e tomate. Também pode ser utilizada na cultura de fumo, controle de formigas, domissanitário e outras³⁷.

1.5 NERVO LARÍNGEO RECORRENTE

A fala é um dos principais meios de comunicação utilizados pelos seres humanos e o seu surgimento está ligado a evolução filogenética da laringe³⁸. O surgimento desse órgão, segundo evolucionistas, está atrelado a transição da vida aquática para a vida terrestre. A partir do momento em que os animais primitivos de vida aquática iniciaram a habitar águas mais rasas e, posteriormente, solos pantanosos, por seleção natural, certos indivíduos desenvolveram uma válvula para impedir a entrada de lama nos pulmões. Acredita-se que nessa fase houve o surgimento da laringe³⁹. Essa estrutura é responsável pela produção vocal em uma complexa ação concomitante de diversos músculos intrínsecos e extrínsecos da laringe em conjunto com uma orquestrada rede nervosa que executa os comandos motores para emissão da voz. Além disso, a laringe também desempenha papel importante na respiração e na proteção das vias respiratórias durante a deglutição⁴⁰.

À exceção do músculo cricotireóideo, todos os músculos intrínsecos da laringe são inervados pelo NLR, sendo responsáveis pela produção da voz, respiração e proteção das vias aéreas durante a deglutição. O NLR direito origina-se anteriormente à primeira parte da artéria subclávia. O nervo esquerdo origina-se no tórax, sobre o lado esquerdo do arco da aorta. Ambos os nervos recorrentes ascendem no interior do sulco traqueoesofágico e penetram na laringe atingindo os músculos intrínsecos⁴¹⁻⁴³.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

1. Gorguner M, Akgun M. Acute Inhalation Injury. *Eurasian J Med.* 2010;42(1):28-35. doi:10.5152/eajm.2010.09
2. Erdogan S, Handan Zeren E, Emre M, Aydin O, Gumurdulu D. Pulmonary effects of deltamethrin inhalation: an experimental study in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006;63(2):318-323. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.10.007
3. Hogg G, Goswamy J, Khwaja S, Khwaja N. Laryngeal Trauma Following an Inhalation Injury: A Review and Case Report. *Journal of Voice.* 2017;31(3):388.e27-388.e31. doi:10.1016/j.jvoice.2016.09.017
4. Spantideas N, Drosou E, Bougea A, Assimakopoulos D. Inhaled Corticosteroids and Voice Problems. What Is New? *Journal of Voice.* 2017;31(3):384.e1-384.e7. doi:10.1016/j.jvoice.2016.09.002
5. Perkner JJ, Fennelly MKP, Balkissoon R, et al. Irritant-associated vocal cord dysfunction. *J Occup Environ Med.* 1998;40(2):136-143. doi:10.1097/00043764-199802000-00009
6. Sala E, Hytönen M, Tupasela O, Estlander T. Occupational laryngitis with immediate allergic or immediate type specific chemical hypersensitivity. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1996;21(1):42-48. doi:10.1111/j.1365-2273.1996.tb01023.x
7. Allan PF, Abouchahine S, Harvis L, Morris MJ. Progressive Vocal Cord Dysfunction Subsequent to a Chlorine Gas Exposure. *Journal of Voice.* 2006;20(2):291-296. doi:10.1016/j.jvoice.2005.04.003
8. Carder M, Seed MJ, Money A, Agius RM, van Tongeren M. Occupational and work-related respiratory disease attributed to cleaning products. *Occup Environ Med.* 2019;76(8):530-536. doi:10.1136/oemed-2018-105646
9. de Matteis S, Heederik D, Burdorf A, et al. Current and new challenges in occupational lung diseases. *European Respiratory Review.* 2017;26(146). doi:10.1183/16000617.0080-2017
10. Lisbôa CD, Mello MG da S. Voice and speech signs and symptoms in individuals exposed to chemical agents: an analysis of medical records. *Revista CEFAC.* 2018;20(2):209-217. doi:10.1590/1982-0216201820214717
11. de Souza JP, Nogueira GM, Mataqueiro MI, de Queiroz-Neto A. Brain cholinesterase activity and the behavior of rats after perinatal exposure to dichlorvos. *Ciência Rural.* 2006;36(2):501-508. doi:10.1590/s0103-84782006000200021
12. Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from

- the comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2006;607(2):176-183. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.04.010
13. Sheikh N, Javed S, Asmatullah, Ahmad KR, Abbas T, Iqbal J. Histological changes in the lung and liver tissues in mice exposed to pyrethroid inhalation. *Walailak J Sci Technol*. 2014;11(10):843-849. doi:10.2004/wjst.v11i9.576
 14. Sayim F, Yavasoglu NÜK, Uyanikgil Y, Aktug H, Yavasoglu A, Turgut M. Neurotoxic effects of cypermethrin in Wistar rats: A haematological, biochemical and histopathological study. *Journal of Health Science*. 2005;51(3):300-307. doi:10.1248/jhs.51.300
 15. Kumar Singh A, Nath Tiwari M, Prakash O, Pratap Singh M. A Current Review of Cypermethrin-Induced Neurotoxicity and Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*. 2012;10(1):64-71. doi:10.2174/157015912799362779
 16. Crofton KM, Kehn LS, Gilbert ME. Vehicle and route dependent effects of a pyrethroid insecticide, deltamethrin, on motor function in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17(4):489-495. doi:10.1016/0892-0362(95)00008-F
 17. Hoppin JA, Umbach DM, Long S, et al. Pesticides are associated with allergic and non-allergic wheeze among male farmers. *Environ Health Perspect*. 2017;125(4):535-543. doi:10.1289/EHP315
 18. Pinho SMR. *Fundamentos Em Fonoaudiologia: Tratando Os Distúrbios de Voz*. 1 ed. Guanabara Koogan; 2003.
 19. Cielo CA, Finger LS, Roman-Niehues G, Deuschle VP, Siqueira M do A. Organic-functional dysphonia and complains off allergic and/or digestive disturbance. *Revista CEFAC*. 2009;11(3):431-439. doi:10.1590/s1516-18462009000300010
 20. Behlau M. Avaliação de voz. In: Behlau M, ed. *Voz: O Livro Do Especialista*. 1 ed. Revinter; 2001:85-245.
 21. Ferreira LP, Santos JG dos, Lima MFB de. Vocal symptom and its probable cause: data colleting in a population. *Revista CEFAC*. 2009;11(1):110-118. doi:10.1590/s1516-18462009000100015
 22. Williams NR. Occupational voice disorders due to workplace exposure to irritants - A review of the literature. *Occup Med (Chic Ill)*. 2002;52(2):99-101. doi:10.1093/occmed/52.2.99
 23. Ubrig-Zancanella MT, Behlau M. Relation between work environment and voice deviation in metallurgic workers. *Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia*. 2010;15(1):72-79. doi:10.1590/s1516-80342010000100013

24. Singh AK, Tiwari MN, Upadhyay G, et al. Long term exposure to cypermethrin induces nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in adult rats: Postnatal exposure enhances the susceptibility during adulthood. *Neurobiol Aging*. 2012;33(2):404-415. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.018
25. Vidair CA. Age dependence of organophosphate and carbamate neurotoxicity in the postnatal rat: Extrapolation to the human. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196(2):287-302. doi:10.1016/j.taap.2003.12.016
26. Nagymajtényi L, Dési I, Lorencz R. Neurophysiological markers as early signs of organophosphate neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol*. 1988;10(5):429-434. doi:10.1016/0892-0362(88)90004-9
27. Filho AD, Campolina D, DIAS M. *Toxicologia Na Prática Clínica*. 2 ed. Folium; 2013.
28. OLSON KR. *Manual de Toxicologia Clínica: Escrito Pelos Profissionais Do California Poison Control System*. 6 ed. Artmed; 2014.
29. Fernandes L da S. *Organophosphate Induced Delayed Neuropathy: In Vitro Study of the Neurotoxicity Mechanisms Induced by the Organophosphate Trichlorfon and Strategies of Neuroprotection*. Universidade de São Paulo; 2017. doi:10.11606/T.60.2017.tde-03072017-074355
30. Indudharan R, Win MN, Noor AR. Laryngeal paralysis in organophosphorous poisoning. *Journal of Laryngology and Otology*. 1998;112(1):81-82. doi:10.1017/s0022215100139969
31. Bae JS. Acute Vocal Fold Palsy After Acute Disulfiram Intoxication. *Journal of Voice*. 2009;23(1):125-127. doi:10.1016/j.jvoice.2007.07.003
32. Velíšek J, Jurčíková J, Dobšíková R, et al. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;23(3):297-301. doi:10.1016/j.etap.2006.11.006
33. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 2002;171(1):3-59. doi:10.1016/S0300-483X(01)00569-8
34. SANTOS MAT, AREAS MA, REYES FGR. Piretróides – uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2008;18(3):339-349. Accessed May 6, 2021. <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/view/173>
35. OSTI S, VAROLI F, MATUSHIMA E, BERNARDI1 M. Comparative Studies of Delthametrin Acute Toxicity in Exotic and Brazilian Fish. *J Braz Soc Ecotoxicol*. 2007;2(2):101-106. doi:10.5132/jbse.2007.02.002
36. Pragas online: Cipermetrina. Published 2015. Accessed September 14, 2018. <http://www.pragas.com.br/produtos/monografias/Cipermetrina.php>

37. ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Índice Monográfico – C10 Cipermetrina. Published 2015. Accessed September 14, 2018. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/629dd00047458760914ad53fbc4c6735/C10++Cipermetrina.pdf?MOD=AJPERES>
38. Tsujia DH, Watanabe LMN. The fascinating study of human vocal folds. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2014;80(2):98. doi:10.5935/1808-8694.20140022
39. HENEINE IF. *Biofísica Básica*. 2nd ed. Atheneu; 1996.
40. BEHLAU M. *Voz: O Livro Do Especialista I*. 1st ed. Revinter; 2001.
41. Silveira LF da FL da. *Reconstrução Do Nervo Laríngeo Recorrente: Estudo Experimental*. Universidade de Coimbra; 2013. Accessed September 24, 2018. <http://hdl.handle.net/10316/21668>
42. de Campos D. *Avaliação Morfométrica Do Nervo Laríngeo Recorrente Em Cadáveres Humanos*. Federal University of Rio Grande do Sul; 2008. Accessed March 19, 2019. <http://hdl.handle.net/10183/13233>
43. de Campos D, do Nascimento PS, Ellwanger JH, et al. Histological organization is similar in human vocal muscle and tongue - A study of muscles and nerves. *Journal of Voice.* 2012;26(6):811.e19-811.e26. doi:10.1016/j.jvoice.2011.12.006

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as possíveis alterações na morfologia do NLR secundárias à exposição inalatória subcrônica aos agrotóxicos diclorvós e cipermetrina em ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar e comparar os seguintes parâmetros histomorfométricos no NLR dos grupos controle, diclorvós e cipermetrina:

- Densidade das fibras mielinizadas (Fibras/mm²);
- Área intraperineural (mm²);
- Espessura da bainha de mielina (μm);
- Número total de fibras mielinizadas (Fibras/Nervo);
- Área média das fibras mielinizadas (μm²);
- Área média dos axônios (μm²);
- Diâmetro médio das fibras mielinizadas (μm);
- Diâmetro axonal médio das fibras mielinizadas (μm);
- Grau de mielinização (g-ratio) das fibras mielinizadas;
- Porcentagem da área total ocupada pelas fibras mielinizadas;
- Porcentagem da área total ocupada pelo tecido conjuntivo endoneural.

4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

ARTICLE IN PRESS

Morphometric Evaluation of the Recurrent Laryngeal Nerve of Wistar Rats Exposed to Pesticides

*.†† Mateus Belmonte Macedo, †.†† Eduarda Oliveira Cunha, *.†† Aléxia dos Reis, *.†† Márcia Salgado Machado, †.†† Deivis de Campos, †.†† Tais Malysz, and *.†.†.†.†† Eliane Dallegrave, *††§#**†† Porto Alegre, and ††¶Santa Cruz do Sul, Brazil

ABSTRACT: The literature has been shown that exposition by inhalation to chemical compounds can cause vocal disorders and dysphagia in humans, in addition to other symptoms that are manifested according to the type, concentration and duration of exposure to the substance. Cypermethrin and dichlorvos are pesticides widely used in agriculture, public health, veterinary, and home environments. Despite the scientific evidence that cypermethrin and dichlorvos can cause neurodegenerative damage and motor alterations, there are no studies evaluating the toxic effects of these pesticides on the morphology of structures responsible for vocal mobility, especially to the Recurrent Laryngeal Nerve (RLN). Considering the association between vocal disorders in humans and variations in RLN and morphometry, the aim of this study was to evaluate the possible alterations in the microstructure of RLN secondary to subchronic exposure to cypermethrin (pyrethroid) and dichlorvos (organophosphate) in Wistar rats. The experimental protocol (approved by CEUA-UFCSPA: 321/15 and 323/15) consisted of 15 male Wistar rats, allocated in 3 groups: Control (n = 5, exposed to water), Cypermethrin (n = 5, exposed to cypermethrin - 1/10 of the inhalation median lethal concentration [LC₅₀] - 0.25 mg/L) and dichlorvos (n = 5, exposed to dichlorvos - 1/10 of the LC₅₀ - 1.5 mg/L). Inhalation exposure was performed for 4 hours, 5 times per week, for 6 weeks. The nerves were collected, histologically processed and analyzed using morphometric parameters measured using ZEN 2.6 (Zeiss – Germany). The cypermethrin and dichlorvos groups showed significant changes ($P < 0.001$, ANOVA) in the g-ratio and in the thickness of the myelin sheath of the RLN when compared to the control animals, however, none of the other parameters evaluated showed statistically significant differences. These findings indicate that repeated inhalation exposure to commercial products of cypermethrin and dichlorvos is able to modify the structure of the RLN and possibly generating vocal changes and /or dysphagia.

Key Words: Dichlorvos—Cypermethrin—Recurrent Laryngeal Nerve—Inhalation exposure—G-ratio—Rats.

INTRODUCTION

Although the literature has indicated that certain chemical compounds are harmful to airways with potential neurotoxic effects,^{1,2} there is still a lack of information about possible vocal changes resulting from inhalation exposure to these substances.^{3,4} Moreover, the few studies have described in this area are case reports that do not consider the possibility of voice disorders arise from neurotoxic effects related to nerves vocal production, thus keeping their discussion focused on the respiratory tract impacts.^{5,6}

In general, individuals exposed by inhalation to chemical compounds may present shortness of breath, cough, tension

in the cervical region, hoarseness, rhinitis, dysphagia for liquid and solids, dyspnea, throat irritation, pharyngitis, laryngitis and vocal fold dysfunction. Moreover, it is described that symptoms are manifested according to the type, concentration, and time of exposure to the substance.^{1,5-9}

Among the most widely used pesticides, organophosphate insecticides, and pyrethroids are generally represented in the literature involving poisoning cases.^{3,10,11} Dichlorvos is an organophosphate pesticide, used to fight insects in household environment, commercial and industrial buildings, health facilities, schools, as well as public health in order to control vectors.^{12,13} The neurotoxic effects of organophosphate compounds occur by inhibiting the acetylcholinesterase enzyme that generates the accumulation of neurotransmitter acetylcholinesterase in the synaptic cleft.^{14,15} Consequently, the intoxication can cause 3 distinct neurological syndromes: acute cholinergic crisis, intermediate syndrome, and organophosphate-induced retarded polyneuropathy.^{2,16} There is evidence in the literature about the occurrence of vocal fold paralysis due to organophosphate poisoning in humans.¹⁷⁻²⁰

The cypermethrin is a pyrethroid type II pesticide that is mainly used in agriculture, veterinary medicine, public health, and in home environments. It is worldwide used and considered of high efficiency and low toxicity in mammals.²¹⁻²³ Pyrethroids are able to prolong the opening of sodium ion channels causing hyperexcitability, thus being neurotoxic agents acting in axon transmission.²⁴ Due to its low environmental risk factor, it was applied as an

Accepted for publication September 23, 2021.

From the *Graduate Program in Pathology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; †Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; ‡Department of Speech Therapy and Audiology, University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; §Department of Basic Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; ¶Department of Life Sciences, University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brazil; ¶Graduate Program in Health Promotion, University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brazil; ¶Graduate Program in Neurosciences, Basic Health Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil; **Department of Pharmacosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil; and the ††Laboratory of Research in Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to Eliane Dallegrave, Department of Pharmacosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Avenida Sarmento Leite 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: elianedalla@ufcspa.edu.br

Journal of Voice, Vol. ■■■, No. ■■■, pp. ■■■-■■■

0892-1997

© 2021 The Voice Foundation. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2021.09.028>

alternative to the substances with the highest potential toxicity.^{25,26} Although these pesticides show less risk compared to others, there is still much evidence to problematize their indiscriminate use. Studies carried out on animal model concluded that pesticides exposure induces hematological and histopathological changes in the brain,^{24,27–29} and on the motor control of Wistar rats.^{29–31}

The relationship between pesticides inhalation and neurotoxicity is still slightly explored in studies, and most of the animal models research uses other routes of administration (oral, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, and percutaneous) not mimicking the occupational inhalation exposure in which the individuals who do not always adhere the use of protective equipments.^{2,32–34} Furthermore, the evidences so far is not dedicated to the assessments of neurotoxic effects of inhaled exposure to pesticides on the peripheral innervation responsible for vocal production. Nevertheless, the literature shows peripheral neurotoxicity by exposure to pesticides.^{2,32,35,36}

In this context, considering the lack of research involving neurotoxic aspects in the laryngeal nerves, we decided in an unprecedented way to evaluate the histomorphometry changes of the Recurrent Laryngeal Nerve (RLN) secondary to subchronic inhalation exposure to pesticides dichlorvos, and cypermethrin in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

This experimental study was based on the inhalation subchronic toxicity assessment protocol, number 413, according to the Organization for Economic Co-operation, and Development (OECD) - Guideline for chemical testing.²² All animal procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee of University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA) under n° 321/15, 323/15.

Animals

Fifteen 60-day-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used, weighing approximately 300 ± 50 g and kept under controlled biotarium conditions with 12h light/dark cycle, receiving feed and water *ad libitum*, except at the time of exposure to pesticides.

Exposure

The animals were randomly allocated in 3 groups: Control [n = 5, exposed to water (vehicle for formulation dilution)]; Organophosphate [n = 5, exposed to 1/10 LC₅₀ (1.5 mg/L) of Dichlorvos (Organophosphate - commercially formulated -DDVP)]; and Pyrethroid [n = 5, exposed to 1/10 LC₅₀ (0.25 mg/L) of Cypermethrin (Pyrethroid - commercially formulated concentrated emulsion)]. All groups were exposed by inhalation, during 4 hours daily, 5 times a week for 6 weeks.

Exposure to Dichlorvos, Cypermethrin and water were performed into a closed system composed of nebulizers (Inalar Compact®) connected to the upper and lateral of the

inhalation exposure boxes (56L capacity) and aspirators coupled to their contralateral lower. All flows were regulated and standardized.

Euthanasia

At the end of the experimental period (24h after the last inhalation exposure), euthanasia was performed by previous anesthesia with sodium thiopental (50mg / kg) associated to intraperitoneal lidocaine (10mg / kg). Blood was collected from the cava vein and used to assess plasma butyrylcholinesterase (organophosphate exposure biomarker).

Recurrent Laryngeal Nerve collection

The anterior cervical region was dissected, opening the structures flat to flat, deep towards the Recurrent Laryngeal Nerve. Through a stereomicroscope, it was extracted approximately 4mm fragment from the left Recurrent Laryngeal Nerve. All procedures described here were based on previous studies.^{37,38}

Histology

Recurrent Laryngeal Nerve fragments were embedded in fixative solution [0.5% glutaraldehyde (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) and 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil)] in phosphate buffer. After that, the fragments were post-fixed in 1% OsO₄ (Sigma Chemicals Co), dehydrated at increasing concentrations of acetone (Dinâmica, Brazil), soaked in acrylic resin (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) and polymerized at 60°C. Five transverse sections (1 μm) were obtained using an ultramicrotome (Leica, Nussloch, Germany) at 100 μm intervals, on slides, and stained with 1% toluidine blue (Merck, Farmstadt, Germany) in 1% tetraborate sodium (Ecibra, Curitiba, Brazil).

Histomorphometric analysis

Recurrent Laryngeal Nerve analyzes were based on previous studies.³⁸ The images of the nerves were captured using an Axio Imager.Z2 microscope (Zeiss - Germany) which has a digital camera AxioCam connected to Zen 2.6 software (Zeiss -Germany). Images were analyzed using Zen 2.6 software (Blue edition— Zeiss – Germany).

According to the previous planar morphometry protocol,^{37,39} were analyzed:

- The mean density of the myelinated nerve fibers.
- The average intraperineural area.
- Estimative of the total number of myelinated fibers.
- The mean of the area of myelinated fibers.
- The total mean of axon area.
- Diameter of myelinated fibers mean.
- The axonal diameter mean.
- The mean of the thickness of the myelin sheath.
- The mean of the myelination degree (g-ratio).
- The percentage of the total area occupied by the myelinated fibers.

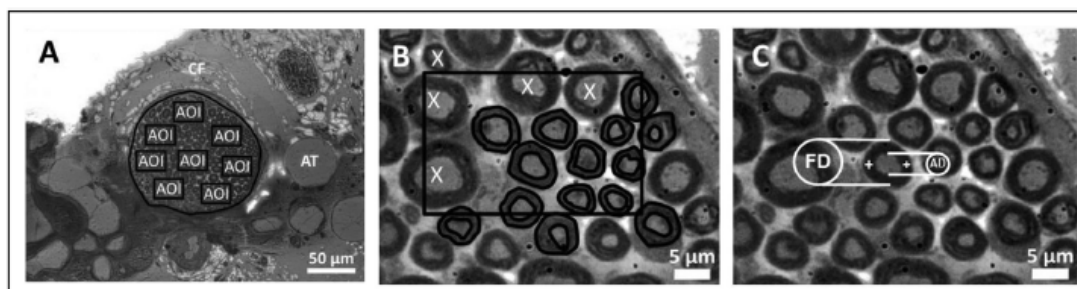


FIGURE 1. Planar morphometry protocol. Image A presents a cross-section of the RLN that demonstrates the allocation of the 8 areas of interest (AOI) and the respective delimitation of the intraperineural area in a final magnification of 400x. In B, the method of measuring the area of the myelinated nerve fibers and the axonal area, demonstrated through the delineation of the nerve fibers at a final magnification of 1,000x, is represented. Furthermore, it can be observed that the fibers containing an “x” were not measured for touching the AOI exclusion bar. In C, the diameter of the myelinated fiber (DF) and the axonal diameter (AD) are represented, followed by the signaling from the myelin sheath of a nerve fiber demonstrated by the “+” signs at a final magnification of 1,000x. AT, adipose tissue, CF, collagen fibrils.

- The percentage of the total area occupied by the endoneurial connective tissue.

The planar morphometry protocol can be better understood through Figure 1, which illustrates the measurements performed. The histomorphometric variables analyzed, except the intraperineural area, were evaluated using 8 Area of Interest (AOI) measuring $600 \mu\text{m}^2$ allocated to central, lateral, upper, and lower nerve portions in the scanned image with a final increase of 1,000x, totaling $24,000 \mu\text{m}^2$ of RLN per group.

Fiber density was obtained from the following equation: total number of fibers counted in all AOI / analyzed area. The intraperineural area were measured from 1 cross section of the nerve with magnification of 400x, from the intraperineural delineation the total fiber in each nerve was estimated by multiplying the fiber density by the intraperineural area of RLN.

Axonal area was measured from fiber design without including the myelin sheath and the area of the myelinated fiber was measured and obtained from the myelin sheath itself. From these data, the respective diameters were estimated from the conversion by the equivalent area of a circle, and its respective diameter value.⁴⁰

The myelin sheath thickness (MST) was estimated by the axon perimeters (AP) and myelinated fiber perimeters (MFP) using the following formula:⁴¹

$$MST = \frac{(MFP - AP)}{(2\pi)}$$

The g-ratio was estimated for each nerve fiber measured in the AOI from a division between the axonal diameter by the diameter of the myelinated nerve fiber. Afterwards, the average of the g-ratio of several fibers per animal was calculated, and compared by ANOVA between the groups.

The percentage of the total area occupied by myelinated nerve fibers was estimated through the following equation: total area occupied by myelinated fibers / intraperineural area x 100.

The percentage of the total area occupied by endoneurial connective tissue were calculated by the following subtraction: 100% - the percentage of the total area occupied by myelinated nerve fibers.

Statistical analysis

The histomorphometric parameters evaluated from the Recurrent Laryngeal Nerve of the control, cypermethrin and dichlorvos groups were represented as mean and standard error mean and compared independently by the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc, considering a 95% confidence. All statistical analyzes were performed using Microsoft Excel 16.0 (Microsoft - USA) Statistical Software Package (SPSS version 21.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

The cross sections of the left unilateral Recurrent Laryngeal Nerve (RLN) innervation, stained with toluidine blue, is showed in Figure 2. The histomorphometric analysis demonstrated well-defined limits, easily observed under the optical microscope.

Results of morphometric parameters are summarized in Figure 3A-3K. Only 2 parameters were found to be significantly different from controls g-ratio [$P = 0.0001$; 1-way ANOVA, Bonferroni (Figure 3I)] and the Dichlorvos group showed alteration of thickness myelin sheath [$P = 0.009$; 1-way ANOVA, Bonferroni (Figure 3H)].

No statistically significant differences (Figure 3A-3G and 3J-3K) were found for the other parameters [Density of the myelinated nerve fibers ($P = 0.509$); Intraperineural area ($P = 0.095$); Number of myelinated fibers/nerve ($P = 0.352$); Myelinated fibers area ($P = 0.367$); Axon area ($P = 0.338$); Myelinated fibers diameter ($P = 0.367$); Axonal diameter of myelinated nerve fibers ($P = 0.414$); Percentage of the myelinated fibers by occupied area ($P = 0.817$); Percentage of

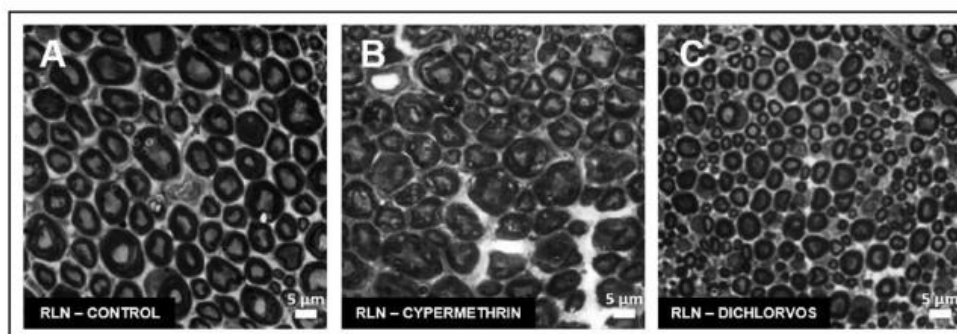


FIGURE 2. Histomorphometric analysis of the cross sections of the left unilateral recurrent laryngeal nerve of rats after water, cypermethrin, or dichlorvos subchronic inhalation exposure. Images A, B, and C show the cross sections of the recurrent laryngeal nerve in a final magnification of 1,000x.

the endoneurial connective tissue by occupied area ($P = 0.817$)). Furthermore, plasma butyrylcholinesterase did not present a statistically significant difference when compared to the control group [$P = 0.73$; 1-way ANOVA (data not shown)].

DISCUSSION

Inhalation is the main route of exposure to chemicals such as pesticides.^{42,43} However, most of the evidence found in the literature used intraperitoneal, and oral routes in their experiments involving these substances.^{27,28,30,44,45} So, this study is a pioneer in assessing damage to the RLN myelin sheath by inhaled subchronic exposure to cypermethrin and dichlorvos.

The pesticides concentration used in this study was lower than the mentioned in the previous studies - one tenth of the inhaled lethal concentration for Wistar rats - LC50.²⁵ Nonetheless, it was able to cause an increase in the degree of myelination (g-ratio), and the concentration of dichlorvos was also able to change the thickness of the myelin sheath. It is a concern, since humans are exposed to higher concentrations, and for longer daily exposure periods than that used in this study (4h per day). In this context, it could be exemplified by the use in indoor environments, such as domestic ones, in which cypermethrin can stay for more than 30 days on the surface of furniture, walls, and floors.⁴⁶ This study has provided evidence that vocal changes in humans may be related to changes in the morphological structure of RLN due to inhalation exposure to pesticides.

Although the literature does not provide specific data about our results, we will discuss in the next sections about the neurotoxicity mechanisms of pesticides, the damage in the peripheral nervous system, and the vocal pathophysiological implications.

Neurotoxic mechanism of pesticides

Pesticides in general, including organophosphates, and pyrethroids can be neurotoxic.^{2,15} Exposure to pesticides such as organophosphate class, exemplified in this study by

dichlorvos, can inhibit the action of the enzyme acetylcholinesterase, causing neurotoxicity by the mechanism of post-synaptic superstimulation of cholinergic receptors.^{3,14,47,48} Organophosphate poisoning is well established in the literature and can generate 3 distinct neurological syndromes: acute cholinergic crisis, intermediate syndrome and organophosphate-induced delayed polyneuropathy.^{6,34} In humans, the less severe cases of acute cholinergic crisis of organophosphate poisoning described in the literature report the beginning of symptoms such as headache, dizziness, nausea, vomiting, pupillary constriction, sweating, tearing, and salivation.³⁴ In more severe cases, symptoms of muscle weakness and spasms, bronchospasms and changes in heart rate that can progress to seizures and coma are reported in studies.^{2,34}

The intermediate syndrome, characterized by the appearance of symptoms of intoxication 1 to 4 days after exposure, usually presents with muscle weakness, which can be fatal if the respiratory muscles are compromised.³⁴

Delayed polyneuropathy induced by organophosphates is a syndrome characterized by involvement of the sensory component, muscle cramps, weakness, and even muscle paralysis.³⁴ The picture generated by polyneuropathy is a consequence of axonal death and can be irreversible due to the inhibition of neural enzyme called neuropathy target esterase.^{2,34}

Organophosphate poisoning has additional long-term sequelae, including some studies showing the emergence of changes after ten years of exposure, such as deficits in cognitive and psychomotor function, decreased sensitivity and motor dysfunction.^{34,49}

Cypermethrin, the pesticide used in this study, is a type II pyrethroid that can prolong the opening of sodium channels in the nervous system leading to hyperpolarization and hyper-excitation of neurons, thus, neurotoxic agents acting in axon transmission.^{50,51} It has also been described in the literature that cypermethrin generates nerve conduction block, reducing the amplitude of the action potential,^{52,53} also inducing neurotoxicity by modulating the level of gamma-aminobutyric acid - GABA.^{54,55}

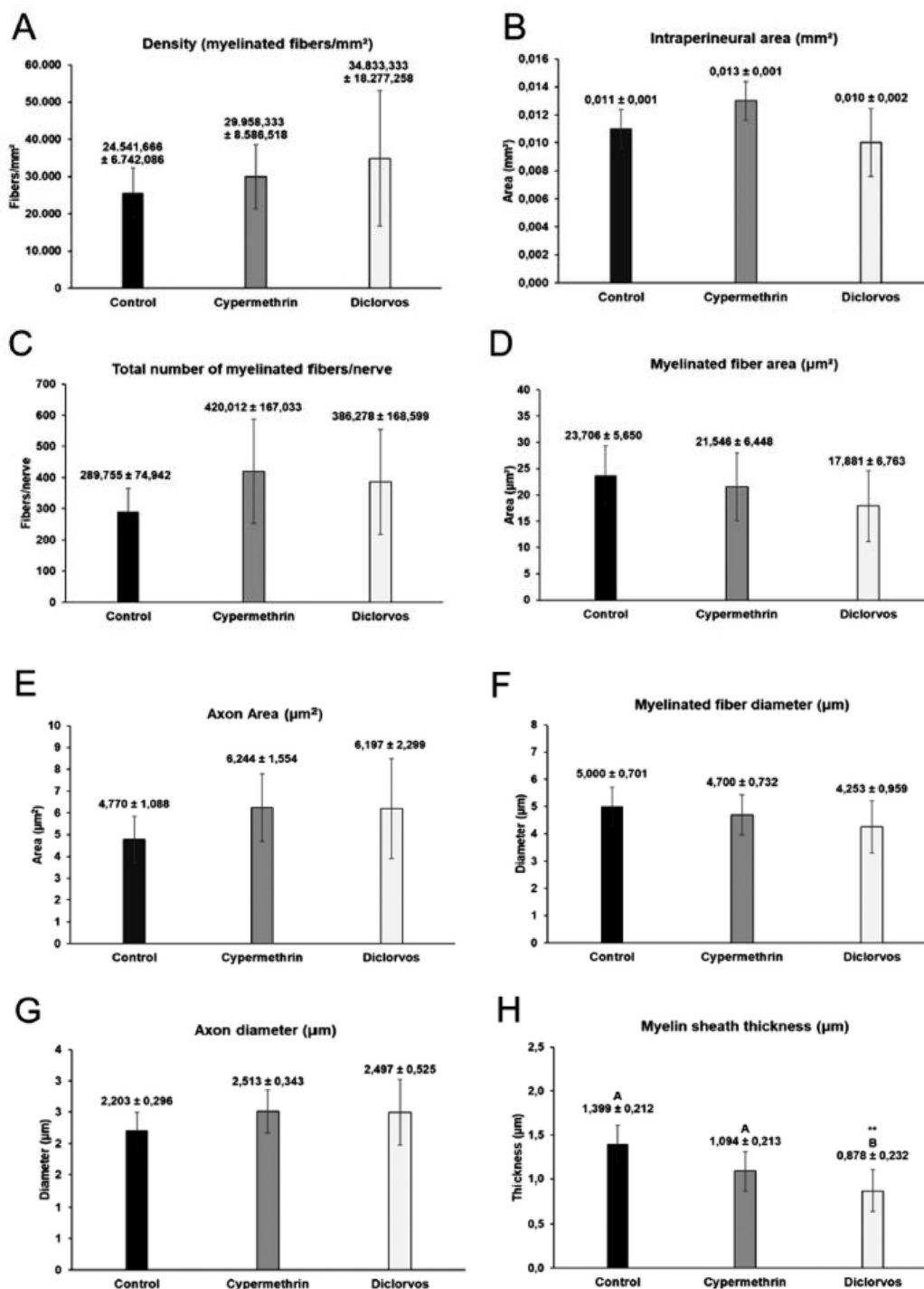


FIGURE 3. Comparison of myelinated fibers density A. intraperineural area B. total number of myelinated fibers C. myelinated fiber area D. axon area E. myelinated fiber diameter F. axon diameter G. myelin sheath thickness H. *g*-ratio I. area of myelinated fibers J. and area of connective tissue K. between the RLN of group control, cypermethrin, and dichlorvos. ***P* < 0.05 and ****P* < 0.001 (ANOVA). Different letters indicate significant differences between groups (Bonferroni post hoc test).

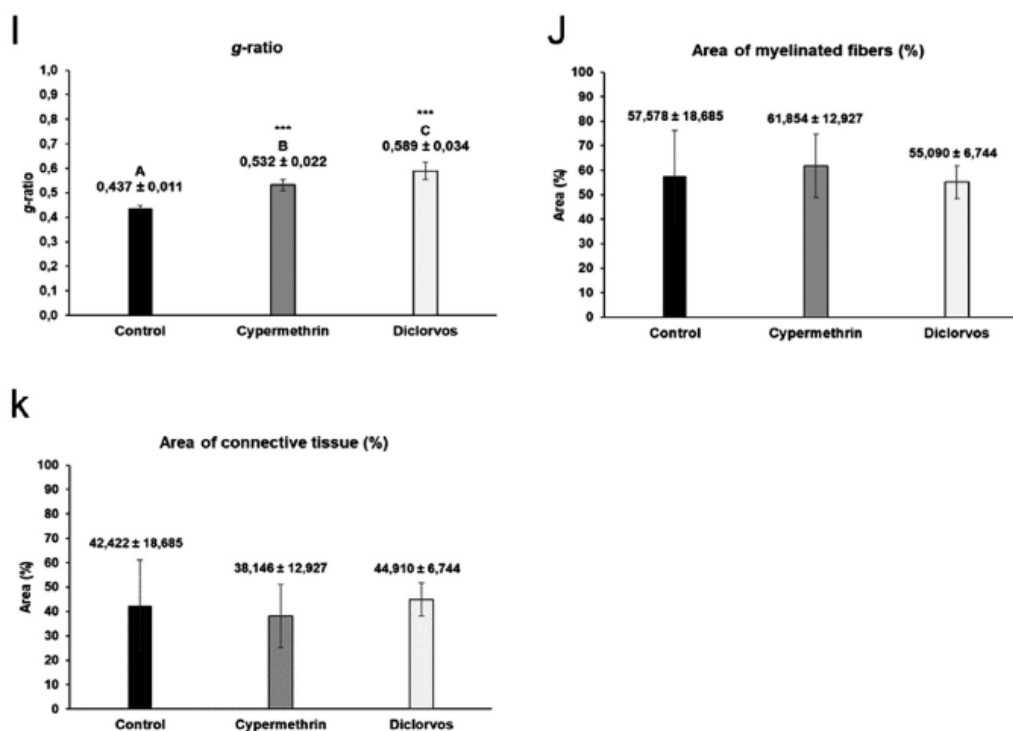


FIGURE 3. Continued

Pyrethroids are considered less toxic to mammals when compared to other classes of pesticides,^{21–23} however, studies do not assess their neurotoxicity by chronic exposure isolated in humans.^{34,49} In this scenario, it is important to consider that individuals are frequently exposed to many pesticides or mixtures of different pesticides, simultaneously or in series. These exposures problematize the identification of the effects of some agents in humans.^{34,49}

In this context, the peripheral neurotoxicity described by the morphometric parameters of this study is extremely important for a better understanding of the neurotoxic effects of these substances. The use of animal models is essential, as it can help to better understand the findings of research with humans exposed to pesticides, since they allow controlling possible biases.⁵⁶

Effects of pesticides on the peripheral nervous system

The literature has not presented enough evidence that assess the effects of inhalation pesticides in the peripheral nervous system.^{2,32,34,56} Studies in humans exposed to pesticides show that some organophosphorus compounds are capable of causing damage to peripheral nerve conduction.³⁴ On the other hand, considering the other pesticide classes, there is still need for further studies.³⁴

Research involving animal models seems to corroborate the findings in humans. A study carried out in rats evaluated the electrophysiology and histopathology of the respiratory tract, diaphragm, and phrenic nerve after inhalation of dichlorvos. The data obtained in this research demonstrated that the inhalation of the organophosphate compound caused neuropathy with involvement of the diaphragm and phrenic nerve, in addition to damage to the respiratory tract.³² Another study also investigated the damage to the nervous system after exposure to pesticides in rats. For this, histopathological damage in the brain, spinal cord and sciatic nerve after subchronic ingestion of an organophosphate, a carbamate and their mixture were evaluated. The result of the study showed central and peripheral neurotoxicity in the evaluated animals.³⁶

Although there are no studies as our research that evaluated the damage to laryngeal motor innervation secondary to inhaled exposure to pesticides, few studies involving other models show recurrent laryngeal nerve paralysis after exposure to organophosphate compounds. The studies cite the occurrence of recurrent laryngeal nerve paralysis after ingestion of haloxon, an anthelmintic composed of organophosphate, in foals, pigs, and horses.^{20,57,58} Two other studies involving cats that experimentally received an organophosphate compound by intraperitoneal route developed axonal degeneration in the recurrent laryngeal nerve.^{59,60}

Implications for pathophysiology of vocal function

Only a few studies describe exposure to pesticides and vocal problems.³ From this perspective, it is important to consider that pesticide poisoning cannot always be diagnosed, especially among rural workers with limited access to the health system.³⁴ Furthermore, most studies that report vocal problems describe cases of acute intoxication by ingestion of organophosphate compounds in suicide attempts, in other words, cases with high severity that resulted in vocal fold paralysis.^{18,20} It is relevant to highlight that medium cases of vocal alterations caused by pesticides possibly do not reach medical attention, as individuals may minimize these symptoms by not using their voice professionally.

In the researched literature, only one study involving the analysis of medical records reported the symptoms of vocal alterations in workers exposed to pesticides chronically. In this study, hoarseness was the main symptom described and the pesticides involved belonged to the class of organophosphates and pyrethroids.³ The data obtained in our study corroborated these findings, as both classes of pesticides mentioned are present in our experimental model, which showed damage to the laryngeal motor innervation that could possibly result in vocal changes.

Even though our study only provides evidence on neurotoxicity for vocal motor function, we must consider that the nerves are generally affected, so the laryngeal sensory innervation is also damaged, and may contribute to vocal problems in individuals exposed to pesticides. In this context, our inferences can be corroborated by other studies involving the assessment of sensory nerves after exposure to pesticides with consequent development of neuropathy.^{61,62}

It is important to recognize that the present study showed significant increase in the degree of myelination (g-ratio) of the RLN of rats exposed to dichlorvos and cypermethrin, as well as a reduction in the thickness of the myelin sheath of rats exposed to dichlorvos by subchronic inhalation route, which represents alterations that could affect voice. The other measurements did not show a significant difference, possibly due to the low concentration of pesticides used, corroborated by the absence of butyrylcholinesterase reduction in the exposed animals.⁴⁸ According to these results, the g-ratio seems to be a more sensitive measurement to assess the change in RLN induced by subchronic inhalation exposure to these pesticides.

The g-ratio is widely applied as a functional and structural index of peripheral axonal myelination.³⁸ This measure is important when evaluating the recovery process of demyelinating fibers.^{63,64} Then, it can be used to assess the relationship between nerve conduction velocity, and peripheral nerve fiber morphology during its regeneration.⁶⁵ Likewise, other studies^{39,66} used g-ratio as an important parameter for the assessment of the degree of myelination of peripheral nerve fibers in the field of microsurgery.⁶⁷

The reduction of the thickness of the myelin sheath affects the speed of nerve conduction and can cause changes in nerve impulse transmission, generating differences in the firing frequency of action of the thyroarytenoid muscle fibers,

and, consequently, in the rate that the vocal folds open and close - glottic pulse.⁶⁸ The literature also describes that the demyelination of the RLN is associated to vocal fold paralysis.⁶⁹

This study has provided evidence that the pesticides cypermethrin and dichlorvos in low concentrations can affect the histomorphometry of the RLN. The results obtained here complement the studies involving the neurotoxicity of pesticides in Wistar rats as it provides information regarding their action on the myelin sheath of a peripheral nerve, essential for vocal mobility, protection of the airways during swallowing, and breathing.

CONCLUSIONS

Subchronic inhalation exposure to cypermethrin at a concentration of 0.25 mg/L and dichlorvos at a concentration of 1.5 mg/L for 4 hours daily, 5 times a week for 6 weeks, increased the degree of myelination of RLN, and also dichlorvos reduced the thickness of the myelin sheath of RLN when compared control group. It is the first study to bring data on subchronic inhalation to cypermethrin and dichlorvos using commercial formulations and their effects on the myelin sheath of a peripheral nerve fundamental for vocal mobility, simulating an occupational exposure using animal model. Moreover, this work has provided subsidies for new research involving pesticides and their association with vocal and swallowing disorders. The data obtained here corroborate the others by pointing out that inhalation exposure to cypermethrin and dichlorvos may be a public health problem.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support (Code 001) and the undergraduate student of Biological Sciences Nilza Rosane Machado Belmonte for her important collaboration in obtaining measurements of nerve fibers.

REFERENCES

1. Kim S, Seo M, Na M, et al. Investigation on combined inhalation exposure scenarios to biocidal mixtures: biocidal and household chemical products in south korea. *Toxics*. 2021;9:1-12. <https://doi.org/10.3390/toxics9020032>.
2. Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS, et al. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathologica*. 2019;138:343-362. <https://doi.org/10.1007/S00401-019-02033-9>.
3. Lisboa CD, Mello MG, da S. Voice and speech signs and symptoms in individuals exposed to chemical agents: an analysis of medical records. *Revista CEFAC*. 2018;20:209-217. <https://doi.org/10.1590/1982-0216201820214717>.
4. Williams NR. Occupational voice disorders due to workplace exposure to irritants - A review of the literature. *Occup Med*. 2002;52:99-101. <https://doi.org/10.1093/occmed/52.2.99>.
5. Perkner JJ, Fennelly MKP, Balkissoon R, et al. Irritant-associated vocal cord dysfunction. *J Occup Environ Med*. 1998;40:136-143. <https://doi.org/10.1097/00043764-199802000-00009>.

6. Allan PF, Abouchahine S, Harvis L, et al. Progressive vocal cord dysfunction subsequent to a chlorine gas exposure. *J Voice*. 2006;20:291–296. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2005.04.003>.
7. Sala E, Hytönen M, Tupasela O, et al. Occupational laryngitis with immediate allergic or immediate type specific chemical hypersensitivity. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1996;21:42–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2273.1996.tb01023.x>.
8. Lin N, Rosenberg MA, Li W, et al. Occupational exposure and health risks of volatile organic compounds of hotel housekeepers: field measurements of exposure and health risks. *Indoor Air*. 2021;31:26–39. <https://doi.org/10.1111/ina.12709>.
9. Li X, Zhong Y, He W, et al. Co-exposure and health risks of parabens, bisphenols, triclosan, phthalate metabolites and hydroxyl polycyclic aromatic hydrocarbons based on simultaneous detection in urine samples from guangzhou, south China. *Environ Pollut*. 2021;272:115990. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115990>.
10. Dos Anjos DBM, Ricardi AST, Fernandes CFB, et al. Severe acute toxic exposures in children and adolescents: case series. *Revista Paulista de Pediatria*. 2021;39. <https://doi.org/10.1590/1984-0462/2021/39/2019262>.
11. Franck MC, Monteiro MG, Limberger RP. Toxicology of suicide cases in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, 2017 to 2019. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2021;45:45–e28. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2021.28>.
12. De Souza JP, Nogueira GM, Mataqueiro MI, et al. Brain cholinesterase activity and the behavior of rats after perinatal exposure to dichlorvos. *Ciencia Rural*. 2006;36:501–508. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782006000200021>.
13. Mishra A, Kumar J, Melo JS, et al. Progressive development in biosensors for detection of dichlorvos pesticide: a review. *J Environ Chem Eng*. 2021;9: 105067. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105067>.
14. Proskocil BJ, Bruun DA, Thompson CM, et al. Organophosphorus pesticides decrease M2 muscarinic receptor function in guinea pig airway nerves via indirect mechanisms. *PLOS ONE*. 2010;5:e10562. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010562>.
15. Costa L, Giordano G, Guizzetti M, et al. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Front Biosci*. 2008;13:1240–1249. <https://doi.org/10.2741/2758>.
16. Jokanović M, Kosanović M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environ toxicol Pharmacol*. 2010;29:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.01.006>.
17. Indudharan R, Win MN, Noor AR. Laryngeal paralysis in organophosphorus poisoning. *J Laryngol Otol*. 1998;112:81–82. <https://doi.org/10.1017/s0022215100139969>.
18. Jin Y, Jeong T, Lee J. Isolated bilateral vocal cord paralysis with intermediate syndrome after organophosphate poisoning. *Clin Toxicol*. 2008;46:482–484. <https://doi.org/10.1080/15563650701704842>.
19. Thompson JW, Stocks RM. Brief bilateral vocal cord paralysis after insecticide poisoning: a new variant of toxicity syndrome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:93–96. <https://doi.org/10.1001/ARCHOTOL.1997.01900010103016>.
20. de Silva H, Sanmuganathan P, Senanayake N. Isolated bilateral recurrent laryngeal nerve paralysis: a delayed complication of organophosphorus poisoning. *Hum Exp Toxicol*. 1994;13:171–173. <https://doi.org/10.1177/096032719401300306>.
21. Erdogan S, Handan Zeren E, Emre M, et al. Pulmonary effects of deltamethrin inhalation: an experimental study in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2006;63:318–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.007>.
22. Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, et al. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutat Res*. 2006;607:176–183. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.04.010>.
23. Zhao H, Wang Y, Guo M, et al. Environmentally relevant concentration of cypermethrin or/and sulfamethoxazole induce neurotoxicity of grass carp: involvement of blood-brain barrier, oxidative stress and apoptosis. *Sci Total Environ*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143054>.
24. Yadav A, Tandon A, Seth B, et al. Cypermethrin impairs hippocampal neurogenesis and cognitive functions by altering neural fate decisions in the rat brain. *Mol Neurobiol*. 2021;58:263–280. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02108-9>.
25. Sheikh N, Javed S, Asmatullah Ahmad KR, et al. Histological changes in the lung and liver tissues in mice exposed to pyrethroid inhalation. *Walailak J Sci Technol*. 2014;11:843–849. <https://doi.org/10.2004/wjst.v11i9.576>.
26. Martínez MA, Lopez-Torres B, Rodríguez JL, et al. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of Type II pyrethroids cyfluthrin and alpha-cypermethrin in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2020;137. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111173>.
27. Sayim F, Yavasoglu NÜK, Uyanikgil Y, et al. Neurotoxic effects of cypermethrin in Wistar rats: a haematological, biochemical and histopathological study. *J Health Sci*. 2005;51:300–307. <https://doi.org/10.1248/jhs.51.300>.
28. Kumar Singh A, Nath Tiwari M, Prakash O, et al. A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol*. 2012;10:64–71. <https://doi.org/10.2174/157015912799362779>.
29. Ali H, El-Sayed NM, Khodeer DM, et al. Cellular Mechanism involved in cypermethrin induced neurotoxicity. *Records Pharm Biomed Sci*. 2020;4:32–39. <https://doi.org/10.21608/rpbs.2019.17969.1043>.
30. Crofton KM, Kehn LS, Gilbert ME. Vehicle and route dependent effects of a pyrethroid insecticide, deltamethrin, on motor function in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 1995;17:489–495. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(95\)00008-F](https://doi.org/10.1016/0892-0362(95)00008-F).
31. Ravula AR, Yenugu S. Pyrethroid based pesticides—chemical and biological aspects. *Crit Rev Toxicol*. 2021. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007>.
32. Atiş S, Cömelekoğlu U, Coşkun B, et al. Electrophysiological and histopathological evaluation of respiratory tract, diaphragm, and phrenic nerve after dichlorvos inhalation in rats. *Inhal Toxicol*. 2002;14:199–215. <https://doi.org/10.1080/089583701753403999>.
33. Misik J, Pavlikova R, Cabal J, et al. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem Toxicol*. 2015;38:32–36. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.900070>.
34. Kamel F, Hoppin J. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ Health Perspect*. 2004;112:950–958. <https://doi.org/10.1289/EHP.7135>.
35. Naughton S, Hernandez C, Beck W, et al. Repeated exposures to diisopropylfluorophosphate result in structural disruptions of myelinated axons and persistent impairments of axonal transport in the brains of rats. *Toxicology*. 2018;406-407:92–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.06.004>.
36. Wang H, Liang Y, Sun Y, et al. Subchronic neurotoxicity of chlorpyrifos, carbaryl, and their combination in rats. *Environ toxicol*. 2014;29:1193–1200. <https://doi.org/10.1002/TOX.21851>.
37. De Campos D, Do Nascimento PS, Ellwanger JH, et al. Histological organization is similar in human vocal muscle and tongue - A study of muscles and nerves. *J Voice*. 2012;26:811.e19–811.e26. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.12.006>.
38. De Campos D, Heck L, Jotz GP, et al. Degree of myelination (g-ratio) of the human recurrent laryngeal nerve. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271:1277–1281. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2690-y>.
39. Ilha J, Araujo RT, Malysz T, et al. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008;22:355–366. <https://doi.org/10.1177/1545968307313502>.
40. Schenk HC, Haastert-Talini K, Jungnickel J, et al. Morphometric parameters of peripheral nerves in calves correlated with conduction velocity. *J Vet Intern Med*. 2014;28:646–655. <https://doi.org/10.1111/jvim.12271>.
41. Gillespie MJ, Stein RB. The relationship between axon diameter, myelin thickness and conduction velocity during atrophy of mammalian peripheral nerves. *Brain Res*. 1983;259:41–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91065-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91065-X).

42. Dixon D, Herbert RA, Kissling GE, et al. Summary of chemically induced pulmonary lesions in the national toxicology program (NTP) toxicology and carcinogenesis studies. *Toxicol Pathol.* 2008;36:428–439. <https://doi.org/10.1177/0192623308315360>.
43. Yoshida T, Mimura M, Sakon N. Estimating household exposure to pyrethroids and the relative contribution of inhalation pathway in a sample of Japanese children. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;28:19310–19324. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12060-9>.
44. Verdín-Betancourt FA, Figueroa M, Soto-Ramos AG, et al. Toxicokinetics of temephos after oral administration to adult male rats. *Arch Toxicol.* 2021;95:935–947. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-02975-8>.
45. Ravula AR, Yenugu S. Effect of oral administration of a mixture of pyrethroids at doses relevant to human exposure on the general and male reproductive physiology in the rat. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;208: 111714. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111714>.
46. Keenan JJ, Vega H, Krieger RI. Potential exposure of children and adults to cypermethrin following use of indoor insecticide foggers. *J Environ Sci Health B.* 2009;44:538–545. <https://doi.org/10.1080/03601230902997733>.
47. Cavaliere MJ, Calore EE, Perez NM, et al. Organophosphate-induced myotoxicity. *Revista de Saude Publica.* 1996;30:267–272. <https://doi.org/10.1590/s0034-89101996000300010>.
48. Tsai YH, Lein PJ. Mechanisms of organophosphate neurotoxicity. *Curr Opin Toxicol.* 2021;26:49–60. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2021.04.002>.
49. Farahat TM, Abdelrasoul GM, Amr MM, et al. Neurobehavioural effects among workers occupationally exposed to organophosphorus pesticides. *Occup Environ Med.* 2003;60:279–286. <https://doi.org/10.1136/OEM.60.4.279>.
50. Eells J, Dubocovich M. Pyrethroid insecticides evoke neurotransmitter release from rabbit striatal slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;246:514–521.
51. Kirby ML, Castagnoli K, Bloomquist JR. In vivo effects of deltamethrin on dopamine neurochemistry and the role of augmented neurotransmitter release. *Pestic Biochem Physiol.* 1999;65:160–168. <https://doi.org/10.1006/pest.1999.2440>.
52. Tan J, Liu Z, Wang R, et al. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol Pharmacol.* 2005;67:513–522. <https://doi.org/10.1124/mol.104.006205>.
53. Narahashi T. Neuronal ion channels as the target site of insecticides. *Pharmacol Toxicol.* 1996;79:1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1996.tb00234.x>.
54. Manna S, Bhattacharyya D, Mandal TK, et al. Neuropharmacological effects of alfa-cypermethrin in rats. *Indian J Pharmacol.* 2005;37:18–20. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.13849>.
55. Elser BA, Kayali K, Dhakal R, et al. Combined maternal exposure to cypermethrin and stress affect embryonic brain and placental outcomes in mice. *Toxicol Sci.* 2020;175:182–196. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa040>.
56. Moser V. Animal models of chronic pesticide neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2007;26:321–331. <https://doi.org/10.1177/0960327106072395>.
57. Rose RJ, Hartley WJ, Baker W. Laryngeal paralysis in Arabian foals associated with oral haloxon administration. *Equine Vet J Suppl.* 1981;13:171–176. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1981.tb03477.x>.
58. Wells G, Bradley R. Haloxon neurotoxicity in the pig. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1977;3:218–221.
59. Bouldin TW, Cavanagh JB. Organophosphorous neuropathy. I. A teased-fiber study of the spatio-temporal spread of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979;94:241–252.
60. Bouldin TW, Cavanagh JB. Organophosphorous neuropathy. II. A fine-structural study of the early stages of axonal degeneration. *Am J Pathol.* 1979;94:270.
61. Jayasinghe SS, Pathirana KD, Buckley NA. Effects of acute organophosphorus poisoning on function of peripheral nerves: a cohort study. *PLOS ONE.* 2012;7:e49405. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0049405>.
62. Moretto A, Lotti M. Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;64:463–468. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.4.463>.
63. Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS ONE.* 2009;4:e7754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007754>.
64. Zhang J, Ren J, Liu Y, et al. Resveratrol regulates the recovery of rat sciatic nerve crush injury by promoting the autophagy of Schwann cells. *Life Sci.* 2020;256. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117959>.
65. Ikeda M, Oka Y. The relationship between nerve conduction velocity and fiber morphology during peripheral nerve regeneration. *Brain Behav.* 2012;2:382–390. <https://doi.org/10.1002/brb3.61>.
66. Kim PD, Hayes A, Amin F, et al. Collagen nerve protector in rat sciatic nerve repair: a morphometric and histological analysis. *Microsurgery.* 2010;30:392–396. <https://doi.org/10.1002/micr.20760>.
67. Isaacs J, Friebe I, Mallu S, et al. Neurotrophic effects of perfluorocarbon emulsion gel: a pilot study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2011;6:11. <https://doi.org/10.1186/1749-7221-6-11>.
68. Smith DRR, Patterson RD. The interaction of glottal-pulse rate and vocal-tract length in judgements of speaker size, sex, and age. *J Acoust Soc Am.* 2005;118:3177–3186. <https://doi.org/10.1121/1.2047107>.
69. Hayashi M, Isozaki E, Oda M, et al. Loss of large myelinated nerve fibres of the recurrent laryngeal nerve in patients with multiple system atrophy and vocal cord palsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997;62:234–238. <https://doi.org/10.1136/jnnp.62.3.234>.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que a cipermetrina e o diclorvós são substâncias potencialmente tóxicas ao NLR, podendo causar danos especialmente à bainha de mielina das fibras que compõe esse nervo. A exposição por via inalatória a uma concentração de 0.25 mg/L de cipermetrina e 1.5 mg/L de diclorvós, por 4 horas diárias, 5 vezes por semana, por 6 semanas aumentou o grau de mielinização (g-ratio) e o diclorvós reduziu significativamente a espessura da bainha de mielina das fibras nervosas do NLR quando comparados ao grupo controle. Estes achados indicam que a exposição inalatória repetida a produtos comerciais de cipermetrina e diclorvós é capaz de alterar a estrutura do NLR e, possivelmente, gerar alterações vocais e/ou disfagia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É relevante destacar que este estudo é pioneiro em fornecer dados sobre a exposição subcrônica inalatória à cipermetrina e ao diclorvós utilizando formulações comerciais e evidenciando os efeitos causados à bainha de mielina das fibras de um nervo periférico fundamental para mobilidade vocal, mimetizando uma exposição laboral em baixas concentrações. Destaca-se que os achados deste estudo podem ser utilizados para pesquisas futuras que avaliem se ocorre a regeneração das fibras que constituem o NLR após o cessamento da exposição a agrotóxicos, posto que a inervação periférica é passível de regeneração em conformidade com o grau do dano. Uma possível limitação do estudo está no tamanho amostral que seguiu os parâmetros da OECD para ensaios de toxicidade subcrônica, utilizando poucos animais por grupo, e talvez não demonstrando a alteração estatisticamente significativa nos demais parâmetros histomorfométricos avaliados.

Ademais, este estudo fornece subsídios para novas pesquisas envolvendo a exposição ocupacional a agrotóxicos e sua associação com alterações vocais e deglutitórias em humanos. Mais do que isso, possui aplicabilidade clínica ao tornar relevante a necessidade de uma anamnese mais detalhada sobre a exposição a agrotóxicos, visto que reações alérgicas e/ou tóxicas constituem a causa mais frequente de prolongamento da fonoterapia.

7. ANEXOS

7.1 PARECERES DO CEUA DA UFCSPA



CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 188/16 Parecer 323/16

2) DATA DO PARECER: 11/11/16

3) TÍTULO DO PROJETO:

Avaliação da ototoxicidade da cipermetrina em ratos Wistar

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Eliane Dallegri

5) RESUMO DO PROJETO:

Trata-se de um estudo que tem por objetivo avaliar os efeitos da exposição subcrônica inalatória ao agrotóxico do tipo piretroide cipermetrina na audição de ratos Wistar. Para tal, serão utilizados 36 ratos wistar, distribuídos em 3 grupos experimentais: Controle, Controle Positivo para lesão auditiva e Experimental (n=12 por grupo). Serão avaliadas: presença ou ausência e possíveis mudanças na amplitude de emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção, estruturas que compõem o sistema auditivo, variáveis de toxicidade sistêmica, sinais clínicos, e massa relativa dos órgãos e histologia pulmonar.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar os efeitos da exposição subcrônica inalatória ao agrotóxico do tipo piretroide cipermetrina na audição de ratos Wistar.

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequada Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

8) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Procedimentos que podem causar dor ou estresse exigindo o emprego de anestésicos, analgésicos ou ansiolíticos.

Espécie: **Número Amostral:**

10 animais para estudo piloto e 30 animais para protocolo experimental

Redução Amostral: Sim Não

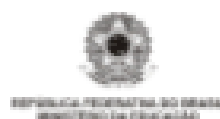
Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessária, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessária, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Diotério/Laboratório): Laboratório de estresse oxidativo e poluição atmosférica da UFCSPA.

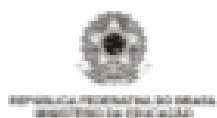
Outra instituição, Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Ratos	Machos	44

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado



UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE
Data de início: 01/16 Data de Término: 12/17

Comentários gerais sobre o projeto:

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO****1) PROTOCOLO Nº: 168/15 Parecer 321/15****DATA DO PARECER: 11/11/2015****3) TÍTULO DO PROJETO:**

Efeitos da exposição subcrônica inalatória ao Diclorvós na audição de ratos Wistar.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Eliane Dallegarve

5) RESUMO DO PROJETO:

Avaliar o efeito do agrotóxico Diclorvós em parâmetros auditivos de ratos Wistar. Os animais serão expostos de maneira inalatória ao agrotóxico em dose 1/10 da CL50 durante 6 semanas (4h/dia 5x semana). O controle positivo receberá Cisplatina por via intraperitoneal como modelo padrão de lesão auditiva. Serão avaliadas a presença ou ausência e possíveis mudanças de amplitude de emissões otoacústicas evocadas por produto de distorção, as estruturas que compõem o sistema auditivo, sinais clínicos, níveis de colinesterase plasmática, massa relativa dos órgãos e estrutura pulmonar.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Avaliar os efeitos sistêmicos e auditivos (função coclear) da exposição subcrônica inalatória ao diclorovós em ratos Wistar.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

Adequado

Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Espécie: **Número Amostral:**

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
------	---------	------	------------

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início_01/01/16 Data de Término 15/12/17