

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

Aléxia dos Reis

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
SUBCRÔNICA INALATÓRIA AO
DICLORVÓS NA AUDIÇÃO DE
RATOS WISTAR**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Aléxia dos Reis

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO
SUBCRÔNICA INALATÓRIA AO
DICLORVÓS NA AUDIÇÃO DE
RATOS WISTAR**

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

Orientadora: Dra. Eliane Dallegrave
Co-orientadora: Dra. Márcia Machado

**Porto Alegre
2017**

Catalogação na Publicação

dos Reis, Aléxia
Efeitos da Exposição Subcrônica Inalatória ao
Diclorvós na Audição de Ratos Wistar / Aléxia dos Reis.
-- 2017.
58 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2017.

Orientador(a): Eliane Dallegrave ; coorientador(a):
Márcia Salgado Machado.

1. Audição. 2. Toxicidade. 3. Diclorvós. 4. Ratos. I.
Título.

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

Agradecimentos e dedicatória

Agradeço a Deus, por me permitir o alcance de um grau acadêmico que tão poucos têm a oportunidade em nosso país.

Aos meus amados pais, Jorge Roberto dos Reis e Vera Lúcia dos Reis, pelo presente da vida e pelo apoio, amor incondicional e incentivo à carreira científica, sem os quais não seria possível a conclusão dessa etapa profissional.

À Dra. Eliane Dallegrave, pelo voto de confiança, amizade, paciência e por todos os ensinamentos que, com carinho, me proporcionou durante o período de orientação.

À Fga. Eduarda Oliveira Cunha, pela companhia e auxílio na execução do projeto.

À secretária Maristela Pasin, pela disponibilidade, competência e dedicação em me auxiliar sempre que precisei.

À Suelen Pizzolatto Dalmolin, colega de laboratório que tornou mais leve o peso do compromisso estabelecido.

Aos bolsistas Dora de Athayde Saul e Mateus Belmonte Macedo, pela contribuição na execução do experimento e na histologia, respectivamente.

Ao Departamento de Farmacociências e seus professores - pelo acolhimento que recebi -, em especial à Dra. Sandra Manoela Dias Macedo, por gentilmente dividir seu espaço de trabalho.

À Ms. Márcia Salgado Machado, pelo empréstimo do equipamento e auxílio nas avaliações auditivas.

À Ms. Maria Claudia Schardosim Cotta de Souza, pelo apoio técnico estatístico.

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, pela concessão de bolsa de mestrado.

A todos os colegas, alunos, professores e funcionários envolvidos direta ou indiretamente na execução da pesquisa, que porventura não tenham sido citados.

E, por fim, agradeço imensamente e dedico esse trabalho aos animais que participaram do protocolo experimental aqui descrito, por possibilitarem novas descobertas à ciência e melhorias na vida do ser humano.

Sumário

1. Introdução	Páginas 1-11
1.1 Exposição a Organofosforados	Páginas 3-5
1.2 Diclorvós	Página 5
1.3 Efeitos de agrotóxicos sobre a audição	Páginas 5-7
1.4 Modelo animal para avaliação da audição	Páginas 7-8
1.5 Protocolo de avaliação de toxicidade	Páginas 8-9
1.6 Emissões otoacústicas e análise da função coclear	Páginas 9-11
Justificativa	Página 11
Referências bibliográficas	Páginas 12-14
2. Objetivos	Página 15
3. Artigo de revisão de literatura publicado em Revista Cefac	Páginas 16-26
4. Artigo científico redigido em inglês	Páginas 27-43
5. Considerações finais	Página 44
6. Anexos	Páginas 45-50

Lista de abreviaturas

AChE: acetilcolinesterase

DDVP: 2,2-diclorovinil dimetil fosfato, diclorvós

DPOAE: distortion product otoacoustic emissions

EOAPD: emissões otoacústicas produto de distorção

LC50: lethal concentration, 50%

NR7: norma reguladora 7

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

OF: organofosforado

OP: organophosphate

PChE: pseudocolinesterase

SNC: sistema nervoso central

Resumo

Introdução: Considerando que agrotóxicos podem ocasionar distúrbios de audição em trabalhadores expostos ocupacionalmente, a escassez de estudos que comprovem os mecanismos específicos de injúria e a dificuldade de separar fatores etiológicos concomitantes, como o ruído, o presente estudo visa elucidar os efeitos da exposição a um organofosforado na audição de ratos, mimetizando as situações laborais do agricultor. **Objetivos:** Avaliar os efeitos da exposição subcrônica inalatória ao agrotóxico diclorvós na função coclear de ratos Wistar. **Material e Métodos:** Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, 60 dias, alocados em 3 grupos: Controle (n=12, expostos a água), Controle Positivo (n=12, tratados com 24mg/kg de cisplatina via intraperitoneal) e Experimental (n=12, expostos ao diclorvós – 0,0015mg/mL). A exposição ocorreu durante 4 horas, 5 vezes/semana, por 6 semanas. Foram avaliadas: amplitude de emissões otoacústicas evocadas produto de distorção nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz, antes e após a exposição; variáveis de toxicidade sistêmica. **Resultados:** Não houve alteração significativa no ganho de massa corporal e colinesterase plasmática nos animais expostos ao diclorvós, entretanto, estes manifestaram sinais clínicos transitórios de piloereção, depressão e dispneia durante a exposição inalatória. Houve diferença significativa nas frequências de 8 e 10kHz bilateralmente no grupo experimental entre a pré e pós-exposição, bem como entre o grupo controle e o diclorvós em 10kHz à direita e 8 e 10kHz à esquerda ($p<0,05$; Mann Whitney e Kruskal Wallis, respectivamente). O grupo diclorvós mostrou redução significativa na massa relativa dos pulmões e ambos os grupos evidenciaram alterações leves na histologia pulmonar. **Conclusões:** A exposição inalatória subcrônica ao diclorvós induziu ototoxicidade em ratos, sem toxicidade sistêmica relevante.

Palavras-chave: Ototoxicidade; Diclorvós; Ratos.

1. Introdução

Há evidências de que a exposição a agrotóxicos pode causar alterações na audição (Teixeira, Augusto e Morata, 2003; Hoshino e cols, 2008; Körbes, 2009; Körbes e cols, 2010a; Kós e cols., 2013; Alcarás, Larcera e Marques, 2013; Kós e cols., 2014; Dunder e cols., 2016). A injúria auditiva frequentemente é multifatorial (Piatto e cols., 2005) e, quando ocorre de forma ocupacional no setor primário da economia, pode estar relacionada, primordialmente, a dois fatores: exposição a produtos químicos ototóxicos, como solventes e agrotóxicos, e ruído do maquinário. A perda auditiva decorrente da exposição a ototóxicos é devido à lesão das células ciliadas da cóclea, sensorio-neural, bilateral, simétrica, irreversível, nas frequências altas (Morata e Little, 2002).

Em relação à legislação vigente, a norma reguladora NR7 (1998) recomenda que trabalhadores expostos a ruído realizem controle audiométrico, mas não especifica os exames auditivos de referência e sequenciais para aqueles expostos a agentes químicos, embora estudos já tenham sugerido a associação entre dano auditivo e exposição a agrotóxicos (Teixeira, Augusto e Morata, 2003; Körbes, 2009; Körbes e cols., 2010a; Alcarás, Larcera e Marques, 2013; Kós e cols., 2013; Dunder e cols., 2016).

Os agrotóxicos pertencentes ao grupo de compostos químicos organofosforados (OF) são amplamente utilizados na agricultura como inseticidas. O composto 2,2-diclorovinil dimetil fosfato (DDVP), denominado diclorvós, está presente em campanhas de saúde pública a fim de controlar vetores, como recurso na medicina veterinária – no combate a ectoparasitas (Souza e cols., 2006) – bem como no setor primário da economia brasileira (produção agrícola e animal) e mesmo na desinsetização doméstica. Os OF atuam como inibidores de colinesterases, sendo responsáveis por diversas intoxicações intencionais ou acidentais. Por

contemplar diversos aspectos em diferentes o DDVP foi escolhido no presente estudo que avaliou os efeitos auditivos dessa substância em ratos Wistar.

A existência de diversos agentes etiológicos causadores de perda auditiva ocupacional, como o ruído do maquinário e exposição a agentes químicos, dificulta a relação nexo causal. Nesse sentido, o estudo em modelos animais expostos somente a agrotóxicos, livres do viés proveniente do ruído ocupacional, permite a caracterização da perda auditiva e o estudo de seus mecanismos.

Na literatura há poucos estudos em modelo animal e, muitas vezes, esses utilizam vias de exposição não correlacionáveis com a exposição ocupacional, por exemplo, intraperitoneal (Körbes, 2009; Finkler e cols., 2012; Körbes e cols., 2010a). Considerando que o rato apresenta semelhanças anatômicas e patológicas com a orelha humana (Albuquerque e cols., 2009) e é um animal muito utilizado na pesquisa auditiva (Reis, Dalmolin e Dallegrave, 2017), a exposição subcrônica inalatória, por via respiratória, viabilizaria o modelo de simulação da realidade ocupacional de agricultor. Protocolos de avaliação de ototoxicidade incluindo avaliação otoscópica e da função coclear, mediante emissões otoacústicas, permitem a avaliação funcional das células ciliadas externas da cóclea (Carvallo e cols., 2015).

Com base no exposto, torna-se clara a viabilidade de uso de modelo animal para avaliação das possíveis consequências na audição devido à exposição ocupacional a agrotóxicos, proporcionando subsídios para a implantação de novas normas reguladoras, com foco na saúde auditiva do trabalhador.

1.1 Exposição a Organofosforados

Organofosforados vêm sendo desenvolvidos e utilizados desde o século XIX. Além da periculosidade referente à possível contaminação do meio ambiente por esses agentes, existe a contaminação do trabalhador. No panorama ocupacional, o uso desse tipo de produto é preocupante, pois por serem os agrotóxicos mais utilizados no mercado, os organofosforados e carbamatos são os agentes anticolinesterásicos mais envolvidos em intoxicações, sejam acidentais (geralmente pelas vias cutânea e respiratória) ou por tentativa de suicídio (via digestiva) (Filho e Souza, 2013).

Conforme dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (Nicolella, Ferreira e Lessa, 2015), das 20.345 exposições humanas registradas em 2013, 7,1% (1561) foram causadas por agrotóxicos de diferentes finalidades. Destes, cerca de 20% foram de origem ocupacional (289 casos). Os organofosforados e carbamatos, inibidores da colinesterase, estão envolvidos em 304 casos, sendo 42 dos casos induzidos pelo DDVP (Nicolella, Ferreira e Lessa, 2015). Sendo assim, dentre os OF mais frequentemente envolvidos em casos de intoxicação, pode-se citar o diclorvós.

Os OF são agentes anticolinesterásicos, pois inibem irreversivelmente ação de colinesterases como a acetilcolinesterase, resultando no acúmulo de acetilcolina nas terminações sinápticas no tecido nervoso, músculo liso e músculo estriado esquelético (Dall'Acqua e cols., 2011). Tal inibição ocorre nas seguintes 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, há acúmulo de acetilcolina nos receptores muscarínicos, nicotínicos e no sistema nervoso central (Vohra, 2014).

Sendo assim, o acúmulo de acetilcolina nos sítios colinérgicos faz com que a transmissão colinérgica pós-sináptica não cesse no tempo adequado, o que gera a síndrome colinérgica. Após serem absorvidos, os organofosforados se distribuem por todos os tecidos e pelo sistema nervoso central (SNC), pois atravessam a barreira hematoencefálica. Fígado e rins são os órgãos onde essas substâncias atingem altas concentrações (Filho e Souza, 2013).

As manifestações clínicas são características da síndrome colinérgica, envolvendo sinais muscarínicos, nicotínicos e centrais. Em humanos, incluem sialorreia, lacrimejamento, miose, bradicardia, hipersecreção brônquica, hiperhidrose, broncoespasmo (manifestações muscarínicas); fasciculações, miastenia, hipertensão arterial, taquicardia e paralisia (manifestações nicotínicas); ansiedade, confusão, convulsão, coma, depressão respiratória e cefaleia (manifestações do sistema nervoso central) (Gündüz e cols., 2015).

Entre 24 e 96 horas após a intoxicação aguda por fosforados pode ocorrer a síndrome intermediária, caracterizada por fraqueza muscular, resultando em falência respiratória. Esse quadro surge após a supressão dos sinais muscarínicos e nicotínicos, e é caracterizado por paralisia das musculaturas proximal dos membros, flexora do pescoço e respiratória (diafragma e músculos intercostais). O início da síndrome é abrupto e a consciência é preservada, exceto nos casos cuja evolução tenha sido com hipóxia (Filho e Souza, 2013).

Os organofosforados também podem gerar neuropatia periférica tardia, que afeta axônios motores longos das pernas (Vohra, 2014). Esta, predominantemente motora, é caracterizada por déficit motor distal em membros inferiores associado a sintomas sensitivos, fraqueza nos músculos das pernas, parestesia e hiperestesia frequentemente, com fraqueza proximal em alguns casos (Vasconcellos, Leite e Nascimento, 2002). Também pode ocorrer dor de cabeça, vertigem, declínio mental e de memória (Wang e cols., 2015).

O tratamento indicado para intoxicações por organofosforados envolve a descontaminação e administração dos agentes reativadores de colinesterases como a atropina (Patil, Murthy e Nikhil, 2016). Para a reativação das colinesterases, o antídoto capaz de reverter precocemente sua ação trata-se de oximas como a Pralidoxima (Cavaliere e cols., 1996).

1.2 Diclorvós

O diclorvós, fosfato de 0,0-dimetil-2,2-diclorovinila, é um inseticida OF, em forma líquida, transparente e levemente amarelado.

Esse organofosforado é empregado no combate a insetos em ambiente domiciliar, prédios comerciais, restaurantes, 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 gatos (Souza e cols., 2006). 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 inalado (Filho e Souza, 2013). A intoxicação por OF pelas vias dérmica e respiratória são mais comuns na exposição ocupacional, e a via oral é a mais observada em quadros de envenenamento não ocupacional, como em tentativas de suicídio (Dall'Acqua e cols., 2011).

1.3 Efeitos de agrotóxicos sobre a audição

A literatura evidencia que a exposição a agrotóxicos pode causar alterações na audição (Kós e cols., 2013; Alcarás, Larcerda e Marques, 2013; Körbes e cols., 2010a; Körbes, 2009; Teixeira, Augusto e Morata, 2003; Hoshino e cols., 2008). Alguns estudos, principalmente em

seres humanos, caracterizam os efeitos auditivos durante ou pós-exposição a agrotóxicos (Delecrode e cols., 2012), avaliando-se o perfil audiométrico do indivíduo que está exposto de forma ocupacional a pesticidas. Entretanto, a exposição ao ruído do maquinário concomitante ao uso de agrotóxicos é um fator de confusão passível de constituir viés, dificultando a identificação da contribuição de cada um dos fatores interferentes no sistema auditivo (Teixeira, Augusto e Morata, 2003).

Em um experimento de Körbes e cols. (2010a), a exposição aguda a um agrotóxico OF em cobaias causou alterações no sistema vestibulococlear em função de danos estruturais na cóclea, lesando principalmente células ciliares externas. Ainda, Camarinha e cols. (2011) relatam que habilidades auditivas de resolução temporal e ordenação temporal estão comprometidas em indivíduos expostos a esse tipo de agente, mesmo que apresentem audição periférica normal.

Estudos em humanos indicam que a exposição à ototóxicos pode gerar perda auditiva sensorio-neural bilateral simétrica, irreversível, nas frequências altas, devido à lesão das células ciliadas da cóclea (Morata e Little, 2002). A cisplatina, por exemplo, é largamente utilizada em tratamentos oncológicos, sendo conhecida como uma droga com alto poder ototóxico (Mota e cols., 2007; De Freitas e cols., 2009; Bhavsar e cols., 2017; Esfahani e cols., 2017; Jadali, Ying, Kwan, 2017; Kumar e cols., 2017; McDonald, Mattson, Hill, 2017).

Em relação à legislação vigente, a norma reguladora NR7 (1998) recomenda que trabalhadores expostos a ruído realizem controle audiométrico, mas não especifica o exame de referência e sequenciais para aqueles expostos a agentes químicos. Tal norma estabelece apenas que os trabalhadores expostos a organofosforados e carbamatos realizem exames de sangue para determinar a atividade da colinesterase.

Além da falta de legislação específica para avaliação auditiva em trabalhadores em contato com produtos químicos – como agrotóxicos - o típico agricultor é exposto a esse tipo de agente, muitas vezes sem a devida instrução quanto à importância dos equipamentos de proteção individual necessários para a realização desse tipo de atividade (Castro e Confalonieri, 2005). Dessa forma, intoxicações acidentais devido ao manejo incorreto de agrotóxicos são comuns e não limitadas ao trabalhador, mas também extensivas a sua família e demais indivíduos pertencentes ao seu convívio.

1.4 Modelo animal para avaliação da audição

A orelha do rato apresenta semelhanças anatômicas e patológicas com a orelha humana, como cóclea projetada no interior da orelha e ossículos da cadeia claramente definidos, podendo ser retirados separadamente (Pinilla e cols., 2001; Albuquerque e cols., 2009), além de ser um animal frequentemente utilizado na pesquisa auditiva (Reis, Dalmolin e Dallegrave, 2017), consistindo, portanto, em uma escolha justificável como modelo animal no presente estudo.

Existe pouca literatura – principalmente nacional – na área da fonoaudiologia que tenha como foco tanto o modelo animal, quanto à exposição a agrotóxicos. Muitas das publicações são revisões de literatura (Körbes e cols., 2010b; Kós e cols., 2013), em especial de estudos internacionais. A realização de um estudo em ratos contemplando a exposição a um agrotóxico de amplo uso em nosso meio abordando parâmetros auditivos agrega inovação na área e foco em temas atuais regionais.

Embora existam pesquisas que já investigaram a audição de indivíduos expostos a agrotóxicos (Delecrode e cols., 2012), a perda auditiva causada por substâncias ototóxicas é muito similar à secundária a ruído, o que pode constituir um viés em tais estudos. A utilização de modelo animal viabiliza a avaliação específica, pois os efeitos apresentados são

decorrentes apenas da exposição ao agrotóxico, sem a interferência de demais fatores confundidores, como vibração ou níveis de pressão sonora elevados.

Estudos de exposição a agrotóxicos utilizando modelo animal frequentemente utilizam a via intraperitoneal (Körbes, 2009; Finkler e cols., 2012; Körbes e cols., 2010a). Contudo, essa não é uma via de exposição ocupacional, pois o trabalhador é exposto de forma dérmica e/ou inalatória, sendo ideal que os métodos de pesquisa foquem nesse tipo de via para a avaliação dos efeitos tóxicos.

Cobaias tratadas com organofosforados apresentaram alterações morfológicas cocleares, com lesões nas três espiras analisadas, além de alterações ciliares de sáculo e utrículo. Essas alterações foram intensificadas de acordo com a dosagem do organofosforado recebida (Körbes e cols, 2010a). Körbes (2009) demonstrou, em um estudo realizado em cobaias, que pode haver dano morfológico às células ciliadas externas concomitantemente à presença de emissões otoacústicas. Assim, foi evidenciado que a intoxicação aguda por um organofosforado, via intraperitoneal em doses de 0,3mg/kg/dia e 3,0mg/kg/dia por sete dias consecutivos, não causou alteração funcional da cóclea, tendo em vista que as emissões otoacústicas produto de distorção (EOAPD) estavam presentes. Entretanto observou-se diferença estatisticamente significativa nos valores médios da relação sinal-ruído nas frequências de 1.500Hz e 6.000Hz quando comparado ao grupo controle.

1.5 Protocolo de avaliação de toxicidade

O protocolo da *OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2009)* de exposição inalatória subcrônica prevê grupos de seis animais, entretanto, os estudos audiológicos em ratos utilizam até doze animais por grupo, de forma a propiciar que critérios de exclusão não reduzam o número de animais a níveis em que as diferenças entre os grupos possam ser evidenciadas (De Freitas e cols., 2009).

Por meio do estudo subcrônico pode-se avaliar sensibilidade de órgãos, a severidade de efeitos cumulativos, reversibilidade e os efeitos específicos como ototoxicidade. Além disso, a exposição subcrônica com via respiratória, método inalatório, é uma forma de mimetizar as situações laborais típicas do indivíduo que lida com agrotóxicos. Dessa forma, podem-se analisar os efeitos dessa exposição em modelo animal, evitando fatores de confusão por meio de condições controladas de laboratório.

Foi encontrado na literatura consultada apenas um estudo cuja exposição ao DDVP ocorreu pelo método inalatório (Narciso, 2012). Neste, comprovou-se toxicidade sistêmica aguda em ratos após a exposição inalatória destes na concentração equivalente a 50 mL.m^{-2} em uma área de 2m^2 por um período de 6 horas ou 24 horas, dependendo do grupo. Os animais expostos por um período de 6 horas apresentaram uma inibição enzimática da colinesterase plasmática em 26%, enquanto os expostos por um período de 24 horas apresentaram inibição de até 37%. Os sinais clínicos apresentados pelos animais foram de intensidade leve, do tipo fasciculação e irritabilidade nos animais expostos por 24 horas e nenhum sinal clínico nos expostos por 6 horas.

Inibidores de colinesterases possuem bioindicadores específicos de toxicidade, sendo assim, experimentalmente, além dos sinais colinérgicos típicos dos organofosforados, o nível de toxicidade desses compostos é avaliado pela atividade da colinesterase plasmática (Cavaliere e cols., 1996).

1.6 Emissões otoacústicas e análise da função coclear

O exame de emissões otoacústicas é rápido e não invasivo, avaliando a função das células ciliadas externas da cóclea (Carvallo e cols., 2015). As emissões otoacústicas são respostas específicas de determinada frequência, pois são geradas de acordo com a tonotopia

coclear. Essas respostas só serão geradas em bandas de frequências cujas células ciliadas externas da cóclea estiverem normais ou próximas do normal (Sousa e cols., 2010).

Esse procedimento é realizado rotineiramente para o diagnóstico de perda auditiva funcional (Mehrparvar e cols., 2015). De acordo com Carvallo e cols. (2015), a presença de respostas normais em um exame de emissões otoacústicas é um forte preditor de função auditiva íntegra. O exame é realizado por meio de uma sonda acoplada a um microfone, sendo esse acessório adaptado ao meato acústico externo (Sousa e cols., 2010).

Em uma revisão de literatura, Reis, Dalmolin e Dallegrove (2017) evidenciaram que a pesquisa de EOAPD foi a avaliação auditiva mais frequentemente utilizada nos estudos analisados contemplando modelos animais, como ratos, havendo similaridade entre essas respostas em ratos e humanos (Martin e cols., 2011).

Segundo Shen e cols. (2015), os dois tipos de emissões otoacústicas evocadas mais comuns são: transientes e produto de distorção.

As transientes são sons breves de fraca intensidade produzidos pela cóclea em resposta a um estímulo acústico, sendo que os mais utilizados para o exame são o clique ou *toneburst* (Mantzari e cols., 2014; Sousa e cols., 2010).

As EOAPD são respostas geradas pela cóclea, evocadas por 2 tons puros (F1 e F2) cuja relação F1/F2 é igual a 1,22. F1 e F2 são apresentados simultaneamente em níveis moderados de intensidade; esses tons puros possuem frequências sonoras muito próximas. Como a cóclea não é capaz de amplificar de forma linear dois estímulos diferentes surge um produto de distorção, sendo que o mais utilizado é $2f_1-f_2$ por ser a maior resposta detectada (Mantzari e cols., 2014; Azevedo, 2003; Sousa e cols., 2010).

As EOAPD possuem maior especificidade de frequência do que as transientes, podendo-se avaliar a cóclea desde a espira basal até a apical (Azevedo, 2003).

Além da observação da presença ou ausência de EOAPD, também é necessária a avaliação da relação sinal-ruído dessas, pois pode ocorrer lesão às células ciliadas externas e – mesmo assim – presença de otoemissões (Körbes, 2009).

Em relação à anatomia otológica do rato, um estudo de Albuquerque e cols. (2009) comprovou, por meio de microscopia eletrônica de varredura, que este possui cóclea composta por espira basal, espira 2 e a espira apical, onde se observa na cóclea a Membrana Tectória, a Membrana de Raissner e o Órgão de Corti.

O rato possui um padrão W/V na disposição das células ciliadas externas e células ciliadas internas do órgão de Corti (Albuquerque e cols., 2009). As células ciliadas externas da terceira fileira no rato apresentam células que se localizam fora da fileira a cada intervalo de espaço e na membrana timpânica desse animal existe uma particularidade que possivelmente o predispõe à otite média, que é uma abertura entre a bigorna e o martelo, que dá acesso à orelha média (Albuquerque e cols., 2009).

Justificativa

Tendo em vista a escassez de pesquisas que explorem a relação entre exposição inalatória de agrotóxicos e dano auditivo, a necessidade de controle do viés do ruído concomitante à exposição a esses agentes, e a falta de legislação brasileira específica que regule o controle audiométrico de trabalhadores em contato com substâncias químicas, justifica-se a realização do presente estudo.

Referências bibliográficas

Albuquerque AAS, Rossato M, Oliveira JAA, Hyppolito MA. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2009 Feb;75(1):43-49.

Alcarás PAS, Larcerda ABM, Marques JM. Study of Evoked Otoacoustic Emissions and suppression effect on workers exposed to pesticides and noise. *CoDAS.* 2013;25(6):527-533.

Azevedo MFD. Emissões Otoacústicas. In: Figueiredo MS (Org.). *Conhecimentos essenciais para entender bem Emissões Otoacústicas e BERA.* São José dos Campos: Pulso, 2003;p. 35-83.

Bhavsar AP, Gunaretnam EP, Li Y, Hasbullah JS, Carleton BC, Ross CJD. Pharmacogenetic variants in TPMT alter cellular responses to cisplatin in inner ear cell lines. Sobol RW, ed. *PLoS ONE.* 2017;12(4):e0175711.

Brasil. Portaria nº 19. Secretaria Segurança e Saúde no Trabalho 09/04/1998/ NR7. Programa de Controle médico de Saúde ocupacional. Diretrizes e parâmetros mínimos para avaliação e acompanhamento da audição em trabalhadores expostos a níveis de pressão sonora elevado. (D.O.U. 22/04/1998)

Camarinha CR, Frota SMMC, Pacheco-Ferreira H, Lima MAMT. Avaliação do processamento auditivo temporal em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos organofosforados. *J. Soc. Bras. Fonoaudiol.* 2011;23(2):102-106.

Carvallo RMM, Sanches SGG, Ibidi SM, Soares JC, Durante AS. Efferent inhibition of otoacoustic emissions in preterm neonates. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015;81:491-497.

Castro JSM, Confalonieri U. Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacu (RJ). *Ciênc. saúde coletiva.* 2005 Abr;10(2):473-482.

Cavaliere MJ, Calore EE, Perez NM, Rodrigues PF. Miotoxicidade por organofosforados. *Rev. Saúde Pública.* 1996 June;30(3):267-272.

Nicolella A, Ferreira EM, Lessa CAS. Relatório Anual 2013 - Dados de atendimento. Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2015.

Dall'Acqua EL, Rossi BG, Couto TBM, Moreira HM. Diagnóstico de intoxicação por organofosforados baseado em quadro clínico / Organophosphate intoxication diagnosis based on clinical present. *Rev Bras Med.* 2011 maio;68(5).

De Freitas MR, Figueiredo AA, Brito GAC, Leitao RFC, Carvalho JJV, Gomes JRM *et al* . The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 2009 Oc;75(5):745-752.

Delecrode CR, Freitas TD, Frizzo ACF, Cardoso ACV. A prevalência do zumbido em trabalhadores expostos à ruído e organofosforados. *Int. Arch. Otorhinolaryngol.* 2012 Sep;16(3):328-334.

Dundar MA, Derin S, Aricigil M, Eryilmaz MA. Sudden bilateral hearing loss after organophosphate inhalation. *Turk J Emerg Med.* 2016 May;16(4):171-172.

Esfahani Monfared Z, Khosravi A, Safavi Naini A, Radmand G, Khodadad K. Analysis of Cisplatin-Induced Ototoxicity Risk Factors in Iranian Patients with Solid Tumors: a Cohort, Prospective and Single Institute Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Mar;18(3):753-758.

Filho ADA e Souza SD. Anticolinesterásicos. In: Filho ADA, Campolina D, Dias MB. *Toxicologia na Prática Clínica*. 2ª edição. Belo Horizonte: Folium, 2013;p. 89-95.

Finkler AD, Silveira AF, Munaro G, Zanrosso CD. Otoproteção em cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba. *Braz. j. otorhinolaryngol*. 2012 June;78(3):122-128.

Gündüz E, Dursun R, Icer M, Zengin Y, Gullu MN, Durgun HM, *et al*. Factors affecting mortality in patients with organophosphate poisoning. *J. Pak. Med. Assoc*. 2015;65(9):967-972.

Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, Miranda MF. Ototoxicity study in workers exposed to organophosphate. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008 Nov-Dec;74(6):912-8.

Jadali A, Ying Y-LM, Kwan KY. Activation of CHK1 in Supporting Cells Indirectly Promotes Hair Cell Survival. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:137.

Körbes D. Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias: estudo anatômico e funcional. [dissertação] Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2009.

Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz. j. otorhinolaryngol*. 2010a Apr;76(2):238-244.

Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. *Rev. soc. bras. fonoaudiol*. 2010b;15(1):146-152.

Kós MI, Hoshino AC, Asmus CIF, Mendonça R, Meyer A. Efeitos da exposição a agrotóxicos sobre o sistema auditivo periférico e central: uma revisão sistemática. *Cad. Saúde Pública*. 2013 Aug;29(8):1491-1506.

Kós MI, Miranda MF, Guimarães RM, Meyer A. Evaluation of the auditory system of farm workers exposed to pesticides. *Rev. CEFAC*. 2014 June;16(3):941-948.

Kumar P, Barua CC, Sulakhiya K, Sharma RK. Curcumin Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity and Potentiates Its Anticancer Activity in SD Rats: Potential Role of Curcumin in Breast Cancer Chemotherapy. *Front Pharmacol*. 2017;8:132.

Mantzari E, Maragoudakis P, Kandiloros D, Ferekidis E, Korres, SG. The Profile of Otoacoustic Emissions and Multifrequency Tympanometry in Otosclerotic Patients Undergoing Two Types of Stapes Surgery: Small Fenestra and Microtraumatic Stapedotomy. *Med Sci Monit*. 2014;20:1613-1620.

Martin GK, Stagner BB, Chung YS, Lonsbury-Martin BL. Characterizing distortion-product otoacoustic emission components across four species. *J Acoust Soc Am*. 2011;129(5):3090-103.

McDonald ME, Mattson J, Hill E. Profound sensorineural hearing loss after one cycle of intraperitoneal cisplatin in treatment of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol Rep.* 2017;20:103-104.

Mehrpavar AH, Mollasadeghi A, Hashemi SH, Sakhvidi MJZ, Mostaghaci M, Davari MH. Simultaneous effects of noise exposure and smoking on OAEs. *Noise & Health.* 2015;17(77):233-236.

Morata TC, Little MB. Suggested guidelines for studying the combined effects of occupational exposure to noise and chemicals on hearing. *Noise Health.* 2002;4(14):73-87.

Mota LAA, Melo MSI, Santos MHP, Albuquerque KMG, Tavares CL. Ototoxicidade da cisplatina: série de casos. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2007 Aug;53(4):370-373.

Narciso ES. Avaliação do grau de efeito toxicológico do diclorvós, após exposição inalatória em ambiente sem ventilação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 2012;71(4).

Patil G, Murthy N, Nikhil M. Contributing Factors for Morbidity and Mortality in Patients with Organophosphate Poisoning on Mechanical Ventilation: A Retrospective Study in a Teaching Hospital. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(12):UC18-UC20.

Piatto VB, Nascimento ECT, Alexandrino F, Oliveira CA, Lopes ACP, Sartorato EL, *et al.* Genética molecular da deficiência auditiva não-sindrômica. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2005;Apr;71(2):216-223.

Pinilla M, Ramírez-Camacho R, Jorge E, Trinidad A, Vergara J. Ventral approach to the rat middle ear for otologic research. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001;124(5):515-7.

Reis A, Dalmolin SP e Dallegrave E. Animal models for hearing evaluations: a literature review. *Rev. CEFAC.* 2017;19(3):417-428.

Shen H, Hao W, Li L, Ni D, Cui L, Shang Y. A study of cochlear and auditory pathways in patients with tension-type headache. *J Headache Pain.* 2015;16:76.

Sousa LCA e cols. Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas. 2ª ed. Ribeirão Preto: Novo Conceito. 2010.

Souza JP, Nogueira GM, Mataqueiro MI, Queiroz-Neto A. Atividade colinesterásica cerebral e comportamento de ratos após exposição perinatal ao diclorvós. *Cienc. Rural.* 2006;36(2):501-508.

Teixeira CF, Augusto LGS, Morata TC. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. *Rev. Saúde Pública.* 2003 Aug;37(4): 417-423.

Vasconcellos LFR, Leite AC, Nascimento OJM. Organophosphate-induced delayed neuropathy: case report. *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 2002 Dec;60(4):1003-1007.

Vohra R. Inseticidas de Carbamato e Organofosforados. In: Olson KR *et al.* Manual de Toxicologia Clínica: Escrito pelos profissionais do California Poison Control System. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed. 2014;285-292.

Wang J, Shao Y, Shi K, Yang H, Li M. Restricted diffusion in the splenium of the corpus callosum in organophosphate induced delayed neuropathy: case report and review of literatures. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(8):14246-14250.

2. Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar os efeitos sistêmicos e auditivos (função coclear) da exposição subcrônica inalatória ao diclorvós em ratos Wistar.

Objetivos específicos

- Revisar os estudos contendo avaliações auditivas em modelos animais.
- Avaliar o funcionamento das células ciliadas externas de ratos Wistar expostos subcronicamente via inalatória ao diclorvós.
- Avaliar a toxicidade sistêmica, incluindo massa corporal, sinais clínicos, níveis de colinesterase plasmática, massa relativa dos órgãos e histologia pulmonar de ratos Wistar expostos subcronicamente via inalatória ao diclorvós.
- Correlacionar os efeitos sistêmicos e auditivos em ratos Wistar expostos subcronicamente via inalatória ao diclorvós.

3. Artigo de revisão publicado na Revista Cefac

REVISTA CEFAC

SPEECH, LANGUAGE, HEARING SCIENCES AND EDUCATION JOURNAL

Rev. CEFAC, 2017, Maio-Jun; 19(3):417-427

doi: 10.1590/1862-02162017193117

Revision articles

Animal models for hearing evaluations: a literature review

Modelos animais para avaliação auditiva: revisão de literatura

Aléxia dos Reis⁽¹⁾
 Suelen Pizzolatto Dalmolin⁽¹⁾
 Eliane Dallegrave⁽¹⁾

⁽¹⁾ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Source: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

Conflict of interest: none-existent

Received on: February 09, 2017
 Accepted on: May 31, 2017

Mailing address:
 Eliane Dallegrave
 Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre
 Rio Grande do Sul, Brasil
 CEP: 91050-170
 E-mail: eliane@ufcspa.edu.br

ABSTRACT

This review aims to outline which animal models are viable for preclinical hearing research, considering their anatomical and physiological characteristics, and their advantages and disadvantages of use. PubMed, Scielo, and Portal Periódicos Capes were consulted, using descriptors concerning hearing, hearing tests and animal species, individually and crossed with each other. The abstracts of the articles found in the databases were read, with subsequent selection based on the following criteria: free articles, use of animal models in audiological procedures that included the description of the evaluation methods, the advantages and/or disadvantages of using the species, and published between 1995 and 2016. Despite the existence of alternative models, mammals are still widely used in research. It has been found that rats, mice and guinea pigs are frequently used, and, in addition to these, sheep, rabbits and chinchillas. The methods for auditory evaluation mainly comprise distortion product otoacoustic emissions, brainstem auditory evoked potential and histological evaluation, especially in rodents. Choosing the experimental animal to evaluate the auditory system depends on anatomical, physiological, economic, spatial and psychosocial factors, and on the evaluation's objective.

Keywords: Models; Animal; Hearing; Speech, Language and Hearing Sciences

RESUMO

O objetivo dessa revisão é delinear os modelos animais viáveis para a pesquisa pré-clínica auditiva, considerando suas características anatômicas, fisiológicas, vantagens e desvantagens. Foram consultadas as bases de dados Scielo, Pubmed e Periódicos Capes, utilizando descritores envolvendo audição, testes auditivos e espécies animais, individualmente e cruzados entre si. Foram lidos os resumos dos artigos encontrados nas bases de dados, com posterior seleção baseada nos critérios: artigos disponíveis em sua integridade, uso de modelos animais em procedimentos audiológicos que incluíse a descrição dos métodos de avaliação, as vantagens e/ou desvantagens do uso da espécie, publicados entre 1995 e 2016. Apesar da existência de modelos alternativos, os mamíferos são ainda amplamente utilizados em pesquisa. Constatou-se que os ratos, camundongos e cobaias são frequentemente utilizados e, além destes, ovelhas, coelhos e chinchilas. Os métodos para avaliação auditiva contemplam principalmente emissões otoacústicas por produto de distorção, potencial evocado auditivo de tronco encefálico e avaliação histológica, principalmente em roedores. A escolha do animal de experimentação para avaliação do sistema auditivo depende de fatores anatômicos, fisiológicos, econômicos, espaciais, psicossociais e do objetivo da avaliação.

Descritores: Modelos Animais; Audição; Fonologia

INTRODUCTION

In the present scenario, many scientific tests are carried out by *in vitro* methods in a controlled laboratory environment, or *in silico*, mimicking biological processes with computer assistance. Neither of them use animals, but they have restrictions, as some research can only be performed *in vivo*.

The importance of animal use in research for scientific advancement and improvement of the knowledge of the physiological mechanisms of diseases is highlighted in several studies, showing the importance of *in vivo* evaluation techniques that can be applied in humans in the future¹.

The basis of the use of animal models permeates many aspects for its justification. To be able to use living beings in research, it is essential to know the characteristics of their anatomy and physiology, which tests are appropriate for the correct interpretation of results, and the advantages and disadvantages of using each species.

Thus, this review aims to delineate viable animal models for preclinical hearing research – that is, performed on animals to predict possible effects in humans –, considering their anatomical characteristics, and advantages and disadvantages of use.

METHODS

Scielo, PubMed and Portal Periodicos Capes were consulted, using descriptors in English concerning hearing, hearing tests and animal species, individually and crossed with each other. The descriptors used for hearing were *hearing*, *ear*, *auditory*, *hair cell*, *ear anatomy*, *anatomy hearing* and *hearing advantages*, while those related to hearing tests were *distortion product* and *streams processing auditory cortex*. As for the animals, the descriptors used to cross the terms were *animal*, *animal model*, *cat*, *dog*, *chinchilla*, *Rhesus*, *zebrafish* and *rabbits*.

The abstracts of the articles found in the databases were read, with subsequent selection based on the following inclusion criteria: free articles, use of animal models in audiological procedures that included the

description of the evaluation methods, the advantages and/or disadvantages of use of the species, and published between 1995 and 2016.

The exclusion criterion was use of animal models in audiological procedures without the description of the evaluation method.

Other sources, such as the Alternative Methods Network (RENAMA)² and the National Council for Animal Experimentation Control³ (CONCEA), were consulted in order to standardize the concept of the conscious use of animals and examine other sources, duly cited, outside the described databases.

LITERATURE REVIEW – RESULTS

Table 1 shows the research results, according to the descriptors and consulted databases.

The search for alternative methods for auditory evaluation in animal models that are adequate to predict the possible effects in humans of the exposure to ototoxic agents reveals that, among the specific methods, distortion products and auditory evoked potential were the most used (Table 2).

Regarding animal models in hearing research, rodents are the most commonly used animals, often in the investigation of the pathophysiological mechanisms of hearing damage and their possible reversal. In addition to these animals, fish, sheep, dogs, cats, monkeys and other alternative models were also cited.

After evaluating the abstracts of the studies selected by the inclusion criteria, the anatomical, histological and audiological characteristics, which will base the classification of the models regarding the advantages and disadvantages, will be presented and discussed.

Anatomical studies

The external ear of domestic animals, such as dogs and cats, is composed of pinna, external ear canal and tympanic membrane, and is responsible for the transmission and direction of sound waves to the middle ear⁴. The external ear canal does not lead directly to the tympanic membrane; it makes a turn (important for proper otoscope insertion and cleaning)⁵.

Table 1. Research results according to the databases consulted, descriptors, evaluated articles and referenced articles

Database	Descriptor	Evaluated	Referenced
Periódicos CAPES	Animal hearing	3	1
SciELO	Auditory and dogs	10	2
	Animal model anatomy	2	1
Pubmed	Chinchilla distortion product	10	6
	Rabbit model hearing	13	5
	Hair cell zebrafish	178	3
	Alternative methods animal ear	72	2
	Alternative methods animal hearing	27	2
	Hearing mice advantages	13	2
	Rabbit ear anatomy hearing	10	2
	Streams processing auditory cortex	82	2
	Auditory evaluation methods in animal models	18	1
	Alternative methods model insects hearing	2	1
	Cat ear anatomy	101	1
	Dogs ear anatomy	87	1
	Rabbit distortion product	12	1
	Rhesus hearing	34	1

Table 2. Studies containing hearing evaluations in animal models

Evaluation	Species	Number of studies
Distortion Product Otoacoustic Emissions (DPOAEs)	Paca ¹² , Chinchilla ^{10,31,32,33} , Guinea Pig ²⁸ , Rabbit ^{28,29,34,48} , Rabbit/Rat/Chinchilla ³⁰	11
Brainstem Auditory Evoked Potential (BAEP)	Paca ¹² , Rhesus Monkey (<i>Macaca mulata</i>) ¹⁵ , Chinchilla ^{10,32} , Rabbit ²⁵ , Guinea Pig ²⁶ , Mouse ²⁷ , Dog ^{26,37}	9
Tympanometry	Chinchilla ¹⁸ , Mouse ²⁷ , Rabbit ^{28,29}	4
Cochlear microphonic	Chinchilla ^{32,33}	2
Summating potentials; Compound action potentials	Chinchilla ^{32,33}	2
Auditory Evoked Potential (AEPs)	Zebrafish ¹⁹ , Turtle (<i>Caretta caretta</i>) ²⁸	2
Evoked Potentials from a Inferior Colliculus	Chinchilla ^{31,33}	2
Compound action potentials; Optically evoked compound action potentials	Cat ³⁵	1
Transient otoacoustic emissions	Paca ¹²	1
Pure Tone Responses	Locust (<i>Locusta migratoria</i>) ³⁸	1
Behavioral methods	Turtle (<i>Caretta caretta</i>) ²⁸	1
Otoscopy	Mouse ²⁷	1
Otologic surgery	Pig ⁸	1
Histology by optical microscopy	Cat ^{6,35} , Chinchilla ^{7,31,32} , Guinea Pig ⁶ , Sheep ¹¹ , Rhesus Monkey (<i>Macaca mulata</i>) ¹⁵ , Guinea Pig/Rat ¹⁷ , Zebrafish ¹⁹ , Mouse ²⁷ , Rabbit ²⁸	12
Histology by electron microscopy	Paca ¹² , Guinea Pig/Rat ¹⁷ , Rabbit ²⁵ , Guinea Pig ²⁸	4
Cytocochleogram/cochleogram	Chinchilla ^{31,32}	2
Time-Lapse Imaging	Zebrafish ¹⁹	1
Computed tomography	Chinchilla ⁷	1

The tympanic membrane separates the external from the middle ear, being supported by a tympanic ring, which is dorsally interrupted by a notch. The tympanic ring has the configuration of an inclined semi-transparent blade, being oval in dogs, pointed in cats, circular in swine, and oval in equines and bovines⁴. In cats, it spans the width of the fibrocartilaginous rings that form the entrance to the external ear canal, and is fine, semitranslucent, and of white-gray color⁶.

The middle ear consists of tympanic cavity, hearing ossicles and auditory tube. The latter connects the tympanic cavity to the nasal pharynx and has the function of equalizing the air pressure on both sides of the tympanic membrane⁴. The tensor tympani muscle provides greater sensitivity to the transmission system, and the stapes muscle has a mitigating effect on the transmission⁴.

The inner ear consists of membranous chambers and ducts filled with endolymph – the membranous labyrinth –, and the endolymph movement stimulates the inner ear's sensory cells. The membranous labyrinth comprises the vestibular labyrinth, including sacculus, utricle, cochlear labyrinth and union duct, where the spiral organ of Corti and the cochlea are situated⁴.

The most important differences in relation to human anatomy include, in rats, the facial nerve, which emerges more superficially and in the antero-rostral temporal bone, the thickness of the ossicles in the middle ear, which are almost entirely hidden on the epitympanum, and the carotid artery, which passes between the crura of the stapes¹. Among the differences identified in chinchillas, we highlight the fusion of the malleus and the incus ossicles⁷; and, in pigs, analysis revealed that the external appearance of the temporal bone shows discrepancy when compared to humans⁸.

Anatomically, there is a difference between the VIII nerve of guinea pigs and men, due to the fact that guinea pigs have the cochlear component involved by the vestibular component until both fascicles join so it is not possible to distinguish the cochlear vestibular component⁹. In monkeys, the Eustachian tube is shorter and flexible, especially in the first years of life, and the physiological function is lower due to the paratubal muscles' anatomy¹⁰.

In sheep, the temporal bone has no defined den – as there is in the human mastoid –, and the mastoid cells are not filled by adipocytes and hematopoiesis's precursor cells¹¹. There is an anatomical bulla, the mastoid is not aerated, and the hypotympanum opens

inferiorly to the bulla¹¹. Moreover, the otoacoustic emissions in animals are different from the results found in humans, and these can be correlated with the differences already known in hair cell patterns¹².

The use of monkeys as animal models for auditory evaluation is especially recommended in the analysis of cerebral cortex function in central processing deficits, because this area finds more similarities between monkeys and humans than between humans and rodents¹³⁻¹⁵. Besides that, there are similarities between monkeys and humans in progressive hearing damage, which increase in severity with aging¹⁵.

The function of the Eustachian tube in humans is smaller when compared to monkeys, probably due to differences between the two species in the anatomy of the tensor veli palatini muscles and the levator veli palatini muscles. In addition, it is highlighted that the occurrence of otitis media in humans, especially in children, is remarkably higher than in laboratory monkeys¹⁰.

There are similarities between the anatomy of human and sheep ears, and the access paths used for surgery are preserved in the procedure. An important similarity between the auditory system of humans and sheep is the size relationship between the structures¹⁶.

Rats have a fragile junction of the tympanic bulla and two and a half turns of the cochlea. They are not as easy to handle as guinea pigs and often present otitis media, because the tympanic membrane does not seal around the external auditory canal and the Eustachian tube is inherently horizontal in the anatomy of rats¹.

Guinea pigs have full bullas, fused malleus and incus, and three and a half turns of the cochlea¹⁷. In Guinea pigs, the anatomy of the temporal bone, the cochlea and its components, and the vestibulocochlear nerve resembles the humans¹, which makes them excellent models for comparative studies to the human ear. This animal does not have internal auditory meatus, only external, and the Eustachian tube is cartilaginous⁹.

Authors claim that, in research on drugs that have an effect on the cochlea, guinea pigs are a better model than rats due to the greater number of cochlear turns¹⁷. Furthermore, guinea pigs were easily handled in surgical experiments concerning stapes, the tympanic membrane and the oval window, as well as in micro-dissections, by reason of the size and strength of the temporal bone¹⁷.

Pacas are also animals used in hearing research. Anatomically, their cochlea has a spiral structure constituted by three and a half turns, called: basal turn

(1 turn), turn 2 (1 turn), turn 3 (1 turn) and apical turn (1/2 turn)¹⁰.

One advantage of using chinchillas in auditory system research is easy access to surgery of middle ear structures, as these animals have large tympanic bullae¹⁶. Their ear has similar structures to the human ear, such as stapes, cochlea, distribution of hair cells and vestibular system⁷. However, it has anatomical differences when compared to the human ear, such as a fusion of the malleus and the incus ossicles, which has also been identified in guinea pigs⁷.

Zebrafish (*Danio rerio*) do not have an auditory organ, such as the cochlea, but they have vestibular otolith organs similar to those of mammals, such as the saccule and the utricle¹⁹. In addition, these fish have an accessible set of hair cells in the lateral line, neuromasts, similarly to other cold-blooded vertebrates, such as salamanders, newts and tadpoles²⁰. They also have small organs, which require fewer cells to perform body functions²¹, and the access to hair cells in the zebrafish's body surface is a factor that allows the precise determination of the time of exposure to an agent, in this study, the cisplatin²².

Yet, despite the advantages of the zebrafish model over the mammal model as to the high throughput and easy access to the sensory hair cells, some data on fish cannot be applied to mammals, by virtue of the cell differences, molecular characteristics of the teleost and auditory cells of mammals²³.

The pig is an alternative model for otologic surgery because, anatomically, the temporal bone is in the same position as in humans, and the tympanic membrane, middle ear and ossicular chain have similarities regarding structure dimensions. The temporal line, the spina suprameatum, the external auditory canal and the mastoid cells are considered classic landmarks found in humans; however, these structures were not identified in pigs. In addition, it has advantages over stapes surgery, such as easy vision and manipulation of the incudostapedial joint⁶. The disadvantage of using them as a model is the access difficulty to the middle ear as the temporal bone is covered with soft tissue. The pneumatized cell system is located inferiorly to the anterior tympanic cavity and not posteriorly – as in humans –, does not have a den, and, for viewing the side channel, it is necessary to remove part of the external auditory canal⁸.

An evaluation compared the development, organization, structure and function of a specific neuronal circuit in chickens (*Gallus gallus domesticus*) with

transgenic quails, focusing on two brain regions fundamental for the sound localization circuit in the auditory brainstem. The results demonstrated that there are structural and functional similarities between the neurons of the regions analyzed in transgenic quails and chickens; quails can be a great model²⁴.

Histological studies

The use of histological methods allows the evaluation of the pathophysiology of hearing loss. In this sense, one study analyzed cochlear lesion induced by experimental bacterial meningitis in rabbits, observing structures such as the organ of Corti, hair cells, support cells and stria vascularis, scala tympani, basilar membrane, scala media, spiral ligament and tectorial membrane through electronic microscopy²⁵.

Scanning electron microscopy was used in guinea pigs to evaluate the acute organophosphorus toxicity in the auditory system²⁶. The presence, in this animal, of three and a half turns of the cochlea, Hensen's cells, tectonic membrane, Reissner's membrane and organ of Corti was evidenced by the same method¹⁷. In rats, it was possible to demonstrate the presence of tectonic membrane, Reissner's membrane and organ of Corti¹. This analysis also allowed the electrophysiological, functional and ultrastructural characterization of the paca's inner ear¹².

Another possibility is the histological evaluation by optical microscopy, which evaluated the operation of the middle ear of genetic strains of 61 mice²⁷. The external, middle and inner ears of cats were also analyzed by this method⁹, as well as the cochlea of rabbits exposed to vibration²⁸. In addition, characteristics of the sheep's temporal bone allow the visualization, through optical microscopy, of cellular aspects, ear architecture, intracavitary spaces and anatomy.¹¹

One less-used analysis is time-lapse imaging. A study with zebrafish analyzed, using this imaging test, the death of ciliated cells in the lateral line induced by cisplatin²². It should be emphasized that this animal is considered a good model for an evaluation of hair cell loss¹⁹.

Studies on audiological evaluation

Distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) are widely cited in the literature in studies with animal models. Pre- and post-noise exposure analyses in rabbits have shown that DPOAE can be used to assess

and diagnose initial noise-induced hearing loss, even when the result of tonal audiometry is normal²².

DPOAE similarities between humans, rabbits, chinchillas and rats have been demonstrated²⁰, and this evaluation was used to determine if the application of buthionine sulfoximine by infusion directly into the cochlea improved the ototoxicity of carboplatin in the chinchilla cochlea²¹. The severity of ototoxicity caused by this drug was evaluated not only by DPOAE, but also by evoked potentials from the inferior colliculus and, anatomically, by cytochrome c oxidase²¹. In a research whose objective was to differentiate the inhibitory mechanisms related to tympanic tensor muscles and stapes in chinchillas, the analyses occurred through real-time DPOAE, which allowed the comparison of components of the medial olivocochlear system and of the middle ear muscle reflex¹⁸.

In an analysis, the carboplatin was applied in chinchillas' ears to verify if selective lesions in inner hair cells and in auditory nerve fibers would generate results of electrophysiological tests similar to those presented in cases of auditory neuropathy. The authors evaluated the animals by cochlear microphonic, DPOAE, summing potential, compound action potential and BAEP²².

Another analysis with the application of carboplatin in chinchillas' ears aimed to investigate the effects of initial morphological damage on the cochlea and the auditory nerve in the central and peripheral auditory system. Cochlear microphonic and DPOAE were used for the evaluation of external ciliary cells, and the summing potentials, to evaluate the inner ciliary cells. The components of action potentials were measured to evaluate the function and integrity of the inner hair cells and the afferent synaptic fibers in the auditory nerve. The midbrain evoked potentials were measured in the inferior colliculus to evaluate the functioning of the central auditory system. The results indicated that the measures of thresholds and amplitudes failed to detect peripheral pathologies until relatively high damage was achieved²³.

DPOAE and tympanometry were used in rabbits in research on the effects of vibration on hearing. The protocol consisted of baseline audiometry, rest periods, exposure periods, rest periods²⁴. This exam was also chosen in a study on the acute toxicity of organophosphorus in the auditory system of guinea pigs, together with BAEP²⁵.

Still using rabbits, an experiment performed topical application of Papaverine directly to the internal auditory

artery and the cochleovestibular nerve, comparing cochlear blood flow and DPOAE between the control group and the treated group, showing the functional loss of cochlear activity²⁴.

In cats, the tests, found in the literature, to assess the researched cochlear function were composed of auditory evoked potentials and optically evoked action potentials recorded in the round window. The results demonstrated the effectiveness of pulsed infrared radiation stimulating auditory neurons without causing detectable injury, but a limitation on the effectiveness of the stimulation of spiral ganglion cells by pulsed infrared radiation may be the presence of a significant amount of bone in front of the optical fiber, which would cause light diffraction and scattering²⁶.

Brainstem auditory evoked potentials (BAEP) are also widely used in hearing research. Besides the advantage related to the functional assessment from the cochlea to the brainstem, it is a noninvasive test. In a study on dogs, the authors propose the test's wave latency values as a reference for comparison with Boxer dogs with different diseases, as well as for evaluation in dogs of different ages, in this case, without sedation²⁷. However, one of the examination's disadvantages is the possible use of sedation in case of need for chemical restraint, which, in another study, was done through intramuscular administration of morphine and acepromazine. This did not affect the interpretation of the evoked potential, although it caused prolongation in latencies of waves II, III and intervals I-III and IV, without interfering with their identifications²⁸.

Brainstem auditory evoked potentials (BAEP) were used in Rhesus monkeys in a research that investigated presbycusis¹⁵. There was a connection between age, threshold increase in ABR and decrease in cochlear histopathology of this primate. The animals studied were between 10 years and three months to 35 years and three months-old, equivalent to 30 to 105 human years. Anesthetic ketamine and medetomidine were used to perform the functional test, in order to provide the appropriate position of the animals for the exam; this is one of the test's disadvantages, as there is evidence that their administration may increase wave latency.

An important difference in BAEPs performed in pacas is that the animal's IV-wave is equivalent to the human's V-wave, the first being used as a parameter for the analysis of the electrophysiological threshold in the evaluation¹².

The function of the middle ear of genetic strains of 61 mice was evaluated through tympanometry, otoscopy and analysis of brainstem auditory responses. The combination of these evaluations allows not only the morphological analysis of the middle ear, but also the evaluation of inflammation²⁷.

An alternative experimental model for hearing evaluation is the *Caretta caretta* turtle. Auditory evoked potentials and behavioral methods were chosen for measuring audiograms of a captive adult female turtle completely submerged. It was evidenced that the audiograms collected through the behavioral testing and auditory evoked potentials are similar, being the auditory evoked potentials advantageous as they can be conducted in a few hours and with untrained animals²⁸. Another alternative model, the zebrafish, has already been evaluated by auditory evoked potentials to analyze the death of hair cells induced by the administration of aminoglycosides¹⁹.

There is also research in the literature using *Locusta migratoria* locusts for auditory analyses. These animals are characterized by the responses of the auditory receptor cells in pure tones and by having the tympanic auditory organ located in the first abdominal segment²⁹.

Besides these, rabbits were models in the testing of the effects of mannitol administered topically in the round window after the induction of episodes of repeated ischemia by compression of the internal auditory artery³¹.

Other features

In the literature, there are auditory studies using alternative models. Birds, such as quails, are often used, since they have advantages such as small size, great egg production and early sexual maturity, being possible to develop transgenic lines of quails in the laboratory³⁴.

Birds and chickens are cited as a study model for the evaluation of ciliary cells, being the birds previously characterized as to the time of regeneration, identification of such precursor cells and cellular processes³⁵.

Zebrafish have been widely used as a model in biological research because of their tolerance to temperature variations, ease of reproduction, identification of genes through mutations, and excellent embryology. The embryos are large and transparent and can be seen through the chorion during the first twenty-four hours post-fertilization²¹.

In a descriptive analysis of the ovine ear anatomy, which, among its purposes, was to identify a suitable

animal for experimentation and training in otologic surgery, advantages were reported, such as docile behavior, and no need to keep the animal confined in the laboratory. Thus, in long observational periods, the sheep could be kept in farms, other than in the laboratory, increasing the animals' comfort and reducing the susceptibility to infection by diseases. In addition, sheep are widely available due to the economic activities related to meat consumption and wool use³⁶.

The easy manipulation of the guinea pig, by reason of its small size and for being a docile animal, has also been highlighted in the literature³. Animals such as cats, dogs and monkeys – in addition to having a different body size from humans – can be difficult to handle in the laboratory, because they are aggressive and susceptible to diseases, can be costly, be less available, and, for being pets, can cause a negative psychosocial effect and meet objection from animal rights agencies¹⁸.

DISCUSSION

Table 3 shows the advantages and disadvantages of using animal models in audiological assessments, by species.

In relation to the anatomical characteristics of mammals as animal models, there are several advantages regarding their use in audiological evaluations, mainly with reference to anatomical similarities to humans, especially monkeys, although some structures are different or absent. However, in some cases, these animal models require sedation for the tests, bring a negative psychosocial reflex and are more expensive.

Economically, small animals are more advantageous because of the smaller volume of food ingested and less space required in the laboratory to maintain animal comfort. Animal size does not seem to be a completely dependent factor in the manipulation of the model, since sheep – although they have a significantly larger size than rats – are easily manipulated in audiological studies, unlike reports related to the possible difficulty in manipulating rats.

As for the anatomical differences between humans and animals, the difference with rats, whose tympanic membrane is semi-occluded, was highlighted. It should be noted that these animals, because of this characteristic, have a greater tendency to otitis media, being a good model for mimicking this pathology. However, in studies whose objective is impaired by the occurrence of otitis, other models should be considered.

Table 3. Advantages and disadvantages of the use of animal models, by species

Species	Advantages	Disadvantages
Chinchilla	Easy access for surgery of middle ear structures ²⁵ . Ear structure similar to human's ² .	This animal's anatomy makes it difficult to access the auditory canal ² .
Rabbit	Similarity of DPOAE emission characteristics between humans, rabbits and rats ²⁶ .	There might be a lower availability of the animal.
Dog	Anatomical advantages due to similarities to humans.	High cost and lower availability; negative psychosocial effect ²⁵ . Use of sedation in case of chemical containment ²⁷ .
Zebrafish	Tolerance to variations in temperature; ease of reproduction; identification of genes through mutations and excellent embryology ²¹ . Easy access to hair cells; presence of otolithic vestibular organs similar to mammals ¹⁸ .	Absence of an auditory organ per se ¹⁸ . Some fish data cannot be applied to mammals ²² .
Cat	Anatomical advantages due to similarities to humans.	High cost and lower availability; negative psychosocial effect ²⁵ .
Rhesus Monkey (<i>Macaca mulatta</i>)	Similarities between monkeys and humans regarding progressive auditory damage, which increases in severity with aging ¹⁸ .	High cost and lower availability; negative psychosocial effect ²⁵ . Use of anesthesia.
Mouse	Wide availability of tests to assess hearing damage.	There is a relationship between age and resistance of the tympanic membrane, which may lead to alteration of the middle ear response ²⁷ .
Sheep	Its characteristics allow visualization through the histological analysis of cellular aspects, ear architecture, intracavitary spaces and anatomy ²¹ ; docile behavior; can be maintained in farms, increasing animal comfort and reducing susceptibility to disease infection; wide availability; access paths in surgery are preserved ¹⁸ . Similarity of size between sheep and human structures.	There might be a lower availability of the animal.
Rat	Presence of tectorial membrane, Reissner's membrane, organ of Corti and cochlea ^{1,17} .	It is not so easy to manipulate; frequently have otitis media; fragile junction of the tympanic bulla ¹⁷ .
Guinea Pig	Full bulas, incus and malleus fused, three and a half cochlear turns, Hensen's cells, tectorial Membrane, Reissner's membrane and organ of Corti; manipulation for surgical experiments that involve oval window, tympanic membrane and stapes; microsection given their temporal bones' robustness and size ¹⁷ . Easy manipulation, docile, temporal bone anatomy similar to humans ² .	Few studies on the vestibulocochlear nerve are described in the literature ⁸ .
Paca	Favorable anatomo-physiological characteristics ¹² .	There might be a lower availability of the animal.
Quail	Small size, large egg production and early sexual maturity ²⁴ .	Difficulty of access to inner ear structures.
Locust (<i>Locusta migratoria</i>)	Easy manipulation, due to its size and anatomical characteristics.	Few studies using this model; few techniques when compared to other animal models.
Turtle (<i>Caretta caretta</i>)	Advantageous auditory evoked potentials as it can be conducted in a few hours and with untrained animals ²⁸ .	There might be a lower availability of the animal.
Pig	Temporal bone is in the same position as in humans, and tympanic membrane, middle ear and ossicular chain also have similarities in structural dimensions; easy vision and manipulation of the incudostapedial joint ⁸ .	Temporal line, spina suprameatum, external ear canal and mastoid cells were not identified in this animal; difficulty accessing the middle ear ⁸ .

With respect to the difference between the number of turns in rats and guinea pigs, the authors of the study analyzed suggest that, in research using drugs that influence the cochlea, it would be better to use guinea pigs, since it is the model with a larger number of turns¹². This study does not justify such an assertion, but there may be a relationship between the greater number of turns and a larger basilar membrane size, which would generate a larger spectrum of frequencies and more hair cells.

Despite the absence of an auditory organ and some results that are not applicable in mammalian animal models, zebrafish are widely cited in auditory evaluation analyses, mainly in the assessment of hair cells in the lateral line of this animal model, demonstrating that anatomical characteristics, reproducibility and habitat are relevant for their choice in different assessment methods.

As an option to the animal models already established in the literature and commonly used, the occurrence of alternative models was verified. Some animals have anatomical similarities, others have been chosen for practicality, size, reproducibility and even for the possibility of transgenic reproduction.

The *Rede de Métodos Alternativos ao Uso de Animais*² (RENAMA) highlights the application of the 3R principles: reduction: the use of the smallest possible number of animals to obtain the necessary information to the experiment; refinement: the pain, suffering or stress of the animal used in the experiment should be minimized; and replacement: when the required level of information is acquired without the use of live vertebrate animals.

In accordance with the normative resolutions of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal⁶ (CONCEA), it is essential to aim for the possibility of alternatives to the use of animals. If they do not exist, the best techniques proposed should be considered, in order to refine the study and reduce the number of animals used.

With regard to anatomy, isolated attributes may not be decisive for the determination of the animal model used; the advantages and disadvantages of the animals' auditory system characteristics should be evaluated for the appropriate choice.

In order to achieve the objectives proposed in the research, the ideal is that there is a balance between the auditory evaluation method, its feasibility in relation to access to equipment, the presence of a trained professional to evaluate the animal model, and a

considerable number of advantages in anatomical and structural terms and greater possibility of generalization for the human auditory system.

It was found, in the literature, a great availability of alternatives for conducting auditory evaluations, such as DPOAE, auditory evoked potentials, scanning electron microscopy (SEM) and cytochrome c.

In relation to the methods of hearing evaluation, DPOAE and BAEP were the most used, showing themselves to be important research tools. These tests, being objective and non-invasive methods, allow the characterization of hearing damage more reliably than behavioral techniques, especially in research with animal models. However, they are limited to the possible use of sedation or anesthesia, which may interfere with wave latency.

Histologically, cellular morphology characterization may facilitate the analysis of the pathophysiology of hearing loss. However, the choice of the animal model interferes with the type of evaluation to be performed. The counting of hair cells in alternative animal models, such as fish, has been performed by methods such as time-lapse imaging, a technique less widespread than optical or electron microscopy, common in mammalian and avian studies.

Variations in studies may be justified by the research objective, as well as by the animal model chosen and the access to equipment. Therefore, it is essential to know the characteristics of the auditory system of the chosen model, its advantages, disadvantages and limitations in experimental practice. Considering all these aspects, the determination of the number of animals should be as small as possible, respecting, in particular, the standards proposed by RENAMA.

CONCLUSION

The choice of the experimental animal to evaluate the auditory system depends on anatomical, physiological, economic, spatial, psychosocial factors and the evaluation's objective. Rodents are still the most commonly used animal models, and the most frequently cited hearing evaluations are distortion product otoacoustic emissions and brainstem auditory evoked potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for fellowship support.

REFERENCES

1. Albuquerque AAS. Estudo comparativo da estrutura da orelha interna de ratos e cobaias através da microscopia eletrônica de varredura [monografia]. Jaboticabal (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
2. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2014. Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA). [acesso em 17 de maio 2016]. Disponível em: <http://renama.org.br/>
3. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Normativas do CONCEA. Para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica. Lei, decreto, portarias, resoluções normativas, orientações técnicas. [acesso em 20 de março 2016]. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238343.pdf
4. König HE, Liebich HG. Órgão Vestibulococlear. In: König HE, Liebich HG. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. 4ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2011. p. 613-28
5. König HE, Liebich HG. Orelha. In: König HE, Liebich HG. Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido. 6ª ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2016. p. 601-14.
6. Sula MM, Njaa BL, Payton ME. Histologic Characterization of the Cat Middle Ear. In: *Sickness and in Health*. Vet Pathol. 2014;51(5):951-67.
7. Carrasco ML, Cristóbal Maass OJ, Dentone SL, Miranda GG, Kakuljan PM. Estudio morfológico del oído medio e interno de la Chinchilla laniger. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. 2008;68(3):263-74.
8. Garcia LB, Andrade JSC, Testa JRG. Anatomical study of the pigs temporal bone by microdissection. Acta Cir. Bras. 2014;29(3):77-80.
9. Vasconcelos CAC. Aspectos descritivos e quantitativos da anatomia macroscópica e microscópica do nervo vestibulo-coclear de cobaias. [Dissertação]. Ribeirão Preto (SP) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2006.
10. Bluestone CD, Swartz JD. Human evolutionary history: Consequences for the pathogenesis of otitis media. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;143(6):739-44.
11. Soares HB. O estudo histológico do osso temporal do ovino- uma contribuição para a caracterização da ovelha como modelo animal para treinamento e investigação experimental em otologia [Dissertação]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, 2004.
12. Silva IA. Caracterização eletrofisiológica, funcional e ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura da orelha interna da Cuniculus paca: um novo modelo experimental [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade Federal de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012.
13. Rauschecker JP, Tian B. Mechanisms and streams for processing of "what" and "where" in auditory cortex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(22):11800-6.
14. Kaas JH, Hackett TA. Subdivisions of auditory cortex and processing streams in primates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(22):11793-9.
15. Engle JR, Tinling S, Recanzone GH. Age-Related Hearing Loss in Rhesus Monkeys Is Correlated with Cochlear Histopathologies. Snyder J, ed. PLoS ONE. 2013;8(2):e55092.
16. Lavinsky L, Goycoolea M. In search of a teaching, training and experimental model for otological surgery. In: Tos M, Thompson J, editors. Otitis Media Today. Copenhagen (Dinamarca): Kugler Publications; 1997. p. 341-8.
17. Albuquerque AAS, Rossato M, De Oliveira JAA, Hyppolito MA. Conhecimento da anatomia da orelha de cobaias e ratos e sua aplicação na pesquisa otológica básica. Rev Bras Otorrinolaringol. 2009;75(1):43-9.
18. Wolter NE, Harrison RV, James AL. Separating the contributions of olivocochlear and middle ear muscle reflexes in modulation of distortion product otoacoustic emission levels. Audiol Neurotol. 2014;19(1):41-8.
19. Uribe PM, Sun H, Wang K, Asuncion JD, Wang Q, Chen CW et al. Aminoglycoside-Induced Hair Cell Death of Inner Ear Organs Causes Functional Deficits in Adult Zebrafish (Danio rerio). PLoS One. 2013;8(3):e58755.
20. Brignull HR, Raible DW, Stone JS. Feathers and Fins: Non-mammalian models for hair cell regeneration. Brain Res. 2009;1277:12-23.
21. Dammski AP, Müller BR, Gaya C, Regonato D. Zebrafish - Manual de criação em Biotério. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2011. [acesso em: 20 de dezembro 2016] Disponível em: <http://www.aulas.agrarias.ufpr.br/Trabalhos/ZEBRAFISH%20-%20MANUAL%20DE%20CRIAC%3%87%C3%83O%20EM%20BIOT%3%89RIO.pdf%20-1.pdf>

22. Ou HC, Raible DW, Rubel EW. Cisplatin induced hair cell loss in zebrafish (*Danio rerio*) lateral line. *Hear Res.* 2007;233(1-2):46-53.
23. Monroe JD, Rajadinasaran G, Smith ME. Sensory hair cell death and regeneration in fishes. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2015;9:131.
24. Seidl AH, Sanchez JT, Schecterson L, Tabor KM, Wang Y, Kashima DT et al., Transgenic Quail as a Model for Research in the Avian Nervous System – A Comparative Study of the Auditory Brainstem. *J Comp Neurol.* 2013;521(1):5-23.
25. Osborne MP, Comis SD, Tarlow MJ, Stephen J. The cochlear lesion in experimental bacterial meningitis of the rabbit. *Int J Exp Pathol.* 1995;76(5):317-30.
26. Kórbes D. Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias: estudo anatômico e funcional [dissertação]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
27. Zheng QY, Tong YCI, Alagramam KN, Yu H. Tympanometry Assessment of 61 Inbred Strains of Mice. *Hear Res.* 2007;231(1-2):23-31.
28. Moussavi Najarkola SA, Khavanin A, Mirzaei R, Salehnia M, Muhammadnejad A. Cochlear Damages Caused by Vibration Exposure. *Iranian Red Crescent Medical Journal.* 2013;15(9):771-4.
29. Moussavi-Najarkola SA, Khavanin A, Mirzaei R, Salehnia M, Muhammadnejad A, Akbari M. Temporary and permanent level shifts in distortion product otoacoustic emissions following noise exposure in an animal model. *Int J Occup Environ Med.* 2012;3(3):145-52.
30. Martin GK, Stagner BB, Chung YS, Lonsbury-Martin BL. Characterizing distortion-product otoacoustic emission components across four species. *J Acoust Soc Am.* 2011;129(5):3090-103.
31. Henderson D, Hu BH, McFadden SL, Zheng XY, Ding D. The role of glutathione in carboplatin ototoxicity in the chinchilla. *Noise Health.* 2000;3(9):1-10.
32. El-Badry MM, McFadden SL. Evaluation of Inner Hair Cell and Nerve Fiber Loss as Sufficient Pathologies Underlying Auditory Neuropathy. *Hear Res.* 2009;255(1-2):84-90.
33. El-Badry MM, McFadden SL. Electrophysiological Correlates of Progressive Sensorineural Pathology in Carboplatin-Treated Chinchillas. *Brain research.* 2007;1134(1):122-130.
34. Morawski K, Telischi FF, Merchant F, Namyslowski G, Lisowska G, Lonsbury-Martin BL. Preventing Internal Auditory Artery Vasospasm Using Topical Papaverine: An Animal Study. *Otol Neurotol.* 2003b;24(6):918-26.
35. Rajguru SM, Matic AI, Robinson AM, Fishman AJ, Moreno LE, Bradley A, et al., Optical cochlear implants: evaluation of surgical approach and laser parameters in cats. *Hear Res.* 2010;269(1-2):102-11.
36. Palumbo MIP, Resende LAL, Pantoja JCF, Mayhew IG, Borges AS. Brainstem auditory-evoked potential in Boxer dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 2014a;34(10):1007-10.
37. Palumbo MIP, Ramos MC, Outada NC, Resende LAL, Pantoja JCF, Borges AS. A sedação sobre os potenciais evocados auditivos em cães. *Cien. Rural.* 2014b;44(5):891-6.
38. Martin KJ, Sarah CA, Joseph CG, Anton DT, Gordon BB, David AM. Underwater hearing in the loggerhead turtle (*Caretta caretta*): a comparison of behavioral and auditory evoked potential audiograms. *J Exp Biol.* 2012;215(Pt 17):3001-9.
39. Golisch T, Schütze H, Benda J, Herz AV. Energy Integration Describes Sound-Intensity Coding in an Insect Auditory System. *J Neurosci.* 2002;22(23):10434-48.
40. Morawski K, Telischi FF, Merchant F, Ably LW, Lisowska G, Namyslowski G. Role of Mannitol in Reducing Postischemic Changes in Distortion-Product Otoacoustic Emissions (DPOAEs): A Rabbit Model. *Laryngoscope.* 2003a Sep;113(9):1615-22.

4. Considerações finais

A exposição subcrônica inalatória ao diclorvós causou ototoxicidade em ratos Wistar comparável a alteração na função coclear induzida por cisplatina, sem efeitos sistêmicos significativos. Os sinais clínicos manifestados (dispneia, piloereção) caracterizaram toxicidade transitória, sem toxicidade sistêmica relevante, informação corroborada pelos resultados de colinesterase plasmática e desenvolvimento ponderal similares entre os grupos controle e experimental e de massa relativa dos órgãos sem alterações, bem como histologia pulmonar levemente alterada.

Além de apresentar resultados consistentes, o presente estudo conseguiu reforçar a importância do rato como modelo adequado para avaliação auditiva fundamentado na função coclear e ainda estabelecer um protocolo de avaliação dessa por meio de emissões otoacústicas nesses animais sem a utilização de anestesia, o que pode respaldar novos trabalhos na área audiológica que não apresentem o viés de alteração dos resultados devido à utilização desse tipo de substância.

Nossos resultados indicam que novas normativas referentes à saúde auditiva do trabalhador exposto a agrotóxicos – como a obrigatoriedade de realização de audiometrias periódicas ou triagem por meio de emissões otoacústicas - devem ser discutidas pelos órgãos competentes, uma vez que tais substâncias demonstraram poder ototóxico. Portanto, nosso trabalho em modelo animal, com interesse em possível aplicação dos dados em humanos, atingiu impacto na pesquisa e na saúde pública.

5. Anexos

Anexo 1- Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFCSPA)

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 diclorvós 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:**

44

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