

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

Eduarda Oliveira Cunha



UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

AVALIAÇÃO DA OTOTOXICIDADE DA CIPERMETRINA EM RATOS WISTAR

**Porto Alegre
2018**

Eduarda Oliveira Cunha

Avaliação da Ototoxicidade da Cipermetrina em 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: Profa. Márcia Machado

**Porto Alegre
2018**

Catálogo na Publicação

Cunha, Eduarda Oliveira

Avaliação da Ototoxicidade da Cipermetrina em Ratos Wistar / Eduarda Oliveira Cunha. -- 2018.

34 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2018.

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

1. Ototoxicidade. 2. Cipermetrina. 3. Ratos. I. Título.

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

Agradecimentos

À Profª Drª. Eliane Dallegrave, minha orientadora, a quem admiro, pela confiança, amizade, apoio, incentivo e ensinamentos diários que não se limitaram a vida acadêmica, uma segunda mãe, uma professora que ensinou-me uma nova visão de pesquisa-ensino e paixão pelo que faz.

À Profª. Drª Marcia Salgado Machado, minha co-orientadora, mais uma mãe, que me acompanha desde a graduação, pelo amor, cuidado, parceria, carinho e incentivo. Por ser aquela que me levou a uma nova área, estimulando e me conhecendo para saber o quanto poderia me estimular a buscar novos horizontes. Por me mostrar o amor pela Audiologia.

À minha mãe e ao meu pai, Rosangela e Ricardo, pelo amor incondicional, apoiar e por me ensinarem que quando amamos o que fazemos não existem barreiras para crescer.

Ao meu irmão Ricardo Oliveira Cunha, por ser tão diferente de mim, mas me mostrar sempre o lado bom da vida, pelo amor, carinho e paciência nos momentos de estresse.

À colega de profissão e de mestrado, Alécia dos Reis, pela parceria e auxílio nos procedimentos do projeto.

As meninas, Su, Marina e Dany, por todo carinho, amizade, que se construiu ao final do meu projeto, mas que hoje se fortalece no grupo de pesquisa, e vai além da troca de experiências acadêmicas e conhecimento científico.

Ao Pedro Henrique, que entrou no final deste trabalho, mas ao meu lado, apoiou e me mostrou o meu melhor.

Aos alunos de iniciação científica, Mateus Belmonte Macedo e Dora Saul, por serem dedicados, mostrarem amor pelo conhecimento, curiosidade pelo novo, e por apoiarem para a concretização deste estudo e desenvolverem novos projetos e parcerias. Pela amizade criada entre nós, que ultrapassa a Universidade.

A todos os amigos que me apoiaram, acreditaram no meu potencial e deram força para que este trabalho tenha acontecido. Em especial, aos meus grandes amigos Camila Saito, Dhaminni Assis, por estarem do meu lado em todas situações.

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

A todos professores com quem tive a oportunidade de aprender.

À professor Ms. Maria Claudia Schardosim Cotta de Souza, pela ajuda estatística.

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

E, não menos importante, agradeço e dedico este trabalho aos animais que participaram do protocolo aqui descrito, por possibilitarem inovações e crescimento científico em prol de benefícios a vida das pessoas.

.

“Você olha pra suas fotos antigas e não consegue se enxergar. Você lembra de frases ditas e atitudes tomadas e as trata como se fossem de um outro alguém. Você aprende que não há amor que não acabe, doença que não se cure, não há estrada sem fim. O caminho, sim, é sem fim. Basta torcer para estar percorrendo o caminho certo. Basta perceber que o seu caminho é errado e esperar pelo próximo retorno. É uma estrada de duas mãos”.

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Ototoxicidade	07
2.2 Piretroides	09
2.3 Cipermetrina	11
2.4 Avaliação Auditiva em humanos expostos a agrotóxicos	13
2.5 Experimento com Modelo Animal	15
2.6 Protocolo de avaliação de toxicidade	17
2.7 Referências bibliográficas	18
3. OBJETIVOS	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	23
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	
6. ANEXOS	

Lista de abreviaturas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EOAPD: emissões otoacústicas produto de distorção

NPS: nível de pressão sonora

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PEATE: Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico

RESUMO

Introdução: Agrotóxicos são substâncias químicas reconhecidos como ototóxicos e podem causar alterações auditivas e vestibulares. A escassez de estudos que verifiquem e caracterizem os mecanismos específicos da ototoxicidade destas substâncias, bem como a dificuldade de separar outros fatores concomitantes, como o ruído dos equipamentos utilizados, justifica a necessidade de desenvolver um estudo em modelo animal. A literatura que aborda as alterações auditivas vinculadas com a exposição aos agrotóxicos possui diversos limitantes, por serem pesquisas observacionais em humanos com viés metodológico, ou quando em modelo animal, não há padrão de protocolo ou mimetização com a exposição humana. Dentre os estudos encontrados nas bases de dados, nenhum até o momento vinculou as alterações auditivas apenas à exposição a cipermetrina de forma isolada. **Objetivos:** Avaliar os efeitos da exposição subcrônica inalatória ao agrotóxico do tipo piretroide cipermetrina na função coclear de ratos Wistar. **Material e Métodos:** Estudo experimental aprovado pelo Comitê de Ética de Uso Animal UFCSPA sob parecer número 323/15. Foram utilizados 36 ratos Wistar machos de 60 dias, alocados em três grupos: Controle (12 ratos expostos inalatoriamente a água), Controle Positivo para lesão auditiva (12 ratos tratados com 8mg/kg de cisplatina via intraperitoneal, por 3 dias, 24h antes da eutanásia) e grupo Experimental (12 ratos expostos inalatoriamente a cipermetrina - 1/10 da concentração letal mediana = 1,667 mg/mL). A exposição inalatória foi realizada durante 4 horas, 5 vezes por semana, durante 6 semanas. Foram realizados testes de emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOAPD) antes e após o período de exposição (sem o uso de anestesia), nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz. Também foram avaliadas as variáveis de toxicidade sistêmica como massa corporal e sinais clínicos. **Resultados:** Foi observada redução ($p < 0,05$; teste Mann-Whitney) entre de amplitude média de EOAPD após o período de exposição em

relação a avaliação basal. Não houve alteração significativa no ganho de massa corporal nos animais expostos a cipermetrina, contudo, estes manifestaram sinais clínicos transitórios de piloereção, dispneia durante a exposição (entre 30 e 240 minutos e da 1ª à 4ª semana). O ganho relativo de massa corporal no período foi similar ($p>0,05$; teste t'Student) entre os grupos (Controle e Cipermetrina. Conclui-se que a exposição inalatória subcrônica a cipermetrina causa ototoxicidade em ratos Wistar.

Palavras-chave: Ototoxicidade; Cipermetrina; Ratos Wistar.

1 INTRODUÇÃO

O perfil audiométrico de indivíduos expostos a pesticidas, tem sido objeto de estudos de forma a caracterizar os efeitos nocivos desta exposição na audição humana (Teixeira et al., 2003; Fluente e McPherson 2006; Pacheco-Ferreira et al., 2008; Freitas et al., 2009; Körbes et al., 2010; Kós et al., 2013; Alcanrás et al., 2013). No entanto, esses estudos apresentam o viés da exposição ao ruído presente nesses locais, bem como, ao uso de agrotóxicos, sendo a perda auditiva frequentemente multifatorial, dificultando a relação nexa causal e o estudo de seus mecanismos (Albuquerque et al., 2009; Alcarás et al., 2013).

Em revisão, autores apresentam estudos em humanos e em animais e suas limitações, novamente trazidas, como os vieses confundidores nos estudos em humanos, já referidos aqui. Além disso, os modelos animais não apresentam protocolos e metodologias semelhantes que possam ser comparadas ou usadas como representações para a exposição humana (Gatto et al., 2014). Neste sentido, estudos em modelos animais permitem a caracterização da perda auditiva, bem como, de seus mecanismos. Entretanto, os poucos estudos em modelos animais encontrados, muitas vezes utilizam vias de exposição não correlacionáveis, como oral (adequada para exposição alimentar) e intraperitoneal (Gatto et al., 2014).

Dentre os estudos descritos na literatura, encontrados nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science, nenhum dos estudos em modelo animal expôs ao inseticida do tipo piretroide cipermetrina, e apenas alguns estudos observacionais em humanos expostos a combinação deste inseticida com outros, mas nunca isolado (Gatto et al., 2014).

Sendo assim, torna-se relevante o estudo da exposição a inseticidas da classe dos piretroides amplamente utilizados em diversos cultivos agrícolas, na produção animal e em campanhas de saúde pública no controle de vetores, bem como por empresas especializadas

na desinsetização comercial ou mesmo doméstica. Além disso, há ainda um risco de exposição não propriamente ocupacional, mas no contato direto com animais de estimação que recebem ectoparasiticidas e também o uso destes produtos no controle doméstico de insetos realizados por usuários.

Dentro da classe dos piretroides, inseticidas mais comumente utilizados no mundo, a cipermetrina, piretróide tipo II, considerado mais potente e tóxico, podendo bloquear a condução nervosa dos vertebrados via canal de sódio voltagem-dependente; bem como interferir no receptor GABA com supressão dos canais de cloro (Cantalamessa, 1997). A cipermetrina, emulsionável em água, é considerada mais tóxica pela via oral, sendo a toxicidade no ser humano dependente da apresentação do produto, duração e frequência da exposição, assim como da saúde do indivíduo. Apesar da via oral ser a forma de maior toxicidade, a via respiratória é considerada a forma mais frequente de exposição (Cantalamessa, 1997; ANVISA, 2015).

Por ser um agrotóxico considerado com menor toxicidade sistêmica que outros inseticidas, atualmente tendo seu uso disseminado em crescimento e substituindo o uso de outros inseticidas (Erdogan et al., 2006; Patel et al., 2006 e Sheikh et al., 2014), a cipermetrina foi escolhida como substância para avaliar os efeitos auditivos desse piretróide administrado subcronicamente, via respiratória por inalação, a ratos Wistar.

Apesar da Cipermetrina ser uma substância de menores riscos quando comparado a outras classes de pesticidas, são poucos os estudos que descrevem os mecanismos desta substância na saúde humana. Pesquisas com modelo animal demonstraram que a exposição a pesticidas da classe dos piretroides pode causar mudanças histopatológicas no encéfalo, além de alterações hematológicas (Sayim et al., 2005; Singh et al., 2012). Apesar da existência

destes estudos, quando pesquisados com relação a audição, não encontra-se dados relacionando apenas os piretroides a injurias auditivas ou vestibulares.

Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar a ototoxicidade secundária a exposição inalatória subcrônica a cipermetrina em ratos Wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo tem como proposta revisar a literatura pertinente ao assunto desta dissertação, referente aos agrotóxicos, em especial a classe piretróide, descrever o entendimento de ototoxicidade, relacionar a influência do piretróide na saúde humana e as avaliações em modelos animais, estabelecer os exames auditivos realizados e posteriormente os estudos da ação tóxica no sistema auditivo e vestibular, bem como caracterizar a toxicidade.

2.1 Ototoxicidade

As substâncias ototóxicas são todas aquelas que causam danos aos sistemas coclear e/ou vestibular, e que ocasionam uma reação tóxica desagradável à função auditiva (Almeira e Almeida, 1993).

Segundo estudos, ototoxicidade são alterações causadas por substâncias químicas, comprometendo a função auditiva e/ou vestibular. As alterações causadas por ototoxicidade podem se localizar em mais de um local. Sendo os principais locais de ação as células ciliadas na cóclea, o vestíbulo e a estria vascular (Brummett, 1993; Hyppolito e Oliveira, 2005).

Dentre as substâncias descritas que podem causar ototoxicidade, estão os antibióticos, antineoplásicos, diuréticos, anti-inflamatórios, antihipertensivos, agrotóxicos. (Hyppolito e Oliveira, 2005).

O quadro audiológico causado por ototoxicose é frequentemente caracterizado por uma perda neurosensorial de grau variado em uma ou mais frequências de 250 a 8000 Hz e/ou manifestações vestibulares, com lesão de células ciliadas internas, perda bilateral, simétrica e irreversível, semelhante a configuração da perda auditiva provocada por ruído (Lacerda et al., 2005). Essa perda auditiva pode ser de instalação rápida ou insidiosa e a

gravidade varia conforme a quantidade de absorção do agente, do tempo de exposição e a interação com o ototóxico (Kós e Kós, 1998).

Segundo referido em estudo, a ototoxicidade deve ser julgada como um problema de saúde pública, e dentre as substâncias referidas como ototóxicas estão os agrotóxicos. (Hoshino et al., 2008). Diversos agentes químicos ototóxicos, como os agrotóxicos, podem ser encontrados nos ambientes de trabalho e independente da presença ou ausência de ruído, estas substâncias podem causar uma perda auditiva ou alterações vestibulares. Apesar da literatura reconhecer mais de 200 substâncias como ototóxicas, muitas delas não são consideradas nocivas ao ser humano (Almeida e Almeida, 1993).

A exposição ocupacional a agrotóxicos e alterações auditivas ainda é pouco pesquisada. Normalmente nesses ambientes as alterações auditivas são encontradas e relacionadas a presença do ruído, sem o entendimento dos outros fatores que podem estar associados. Diversos estudos correlacionando perda auditiva com a exposição ao ruído têm sido vistos na literatura, no entanto, existem outros fatores de risco para a saúde auditiva que vêm sendo observados com frequência nos ambientes de trabalho. Ao se considerar perdas auditivas ocupacionais, é importante que se reconheça a potencialidade de outros agentes, como é o caso dos produtos químicos de efeito ototóxico, incluindo os agrotóxicos. (Almeida e Almeida, 1993; Kós e Kós, 1998; Lacerda et al., 2005; Hoshino et al., 2008).

Pesquisas verificaram que a exposição, principalmente crônica, aos agrotóxicos induz a modificações variadas no sistema vestibulococlear (Crawford. et al., 2008; Hoshino et al., 2008; Kós et al., 2013; Kós et al., 2014). Ao revisar a literatura, atenta-se para o fato de que os estudos sobre os efeitos auditivos da exposição aos inseticidas ainda são escassos (Teixeira et al., 2003; Crawford et al., 2008; Kós et al., 2013).

Autores (Teixeira et al., 2003; Crawford et al., 2008; Kós et al., 2013) referem a

importância de se realizar maiores estudos para uma melhor compreensão da associação entre a exposição a agrotóxicos e alterações no sistema auditivo, visto que nos estudos em humanos existe a dificuldade de ser reconhecido os efeitos isolados dos agrotóxicos, uma vez que as alterações auditivas podem ser causadas por inúmeros fatores, possibilitando que os efeitos ototóxicos desses agrotóxicos se tornem um aspecto a ser incorporado na evolução da legislação.

2.2 Piretroides

São definidos como agrotóxicos os produtos químicos ou biológicos utilizados para exterminar pragas ou patógenos que ataquem as culturas agrícolas. Atualmente, aproximadamente 3 milhões de toneladas de agrotóxicos são utilizados na agricultura em todo o mundo (Meyer et al., 2003).

Conforme dados de pesquisa, nos EUA, cerca de 1 bilhão de litros de agrotóxicos são aplicadas anualmente na produção agrícola, residências, escolas, parques e florestas (Araújo et al., 2007). No Brasil, o uso é tão extenso que faz com que o país ocupe o primeiro lugar no ranking mundial do consumo de agrotóxicos (Carneiro et al., 2015).

Os agrotóxicos organofosforados e sua repercussão na audição tem sido estudados, no entanto, os agrotóxicos do tipo piretroides são pouco referidos. Apesar disso, o uso de piretroides é amplamente difundido, sendo, nos últimos anos, o mais comum para controle de vetores (Soderlund et al., 2002; Velisek et al., 2007 e Vilela et al., 2010). Essa grande difusão do uso de piretroides se deve ao fato de muitos agrotóxicos terem seu uso proibido devido a alta toxicidade e/ou persistência no ambiente, tornando os piretroides uma alternativa as substâncias proibidas (Almeida e Magalhães, 1985).

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 agricultura (Velisek et al., 2007). Atualmente, como alternativa aos agrotóxicos que são em sua maioria muito tóxicos, os piretroides foram difundidos como alternativa de menor toxicidade sistêmica, baixo impacto ambiental quando comparados aos outros agrotóxicos, tais como organoclorados e organofosforados (Soderlund et al., 2002; Santos et al., 2007; Velisek et al., 2007 e Vilela et al., 2010).

Os piretroides são divididos em dois grupos: tipo I e tipo II, baseada 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 do tipo I são aqueles sem grupo ciano em sua estrutura, e o tipo II são com um grupo ciano em sua estrutura, como a cipermetrina e deltametrina. Piretroides do tipo II são considerados mais potentes pela presença deste grupo ciano em sua molécula (Osti et al., 2007).

De acordo com os dados do Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS, 2015), das 20.911 exposições humanas registradas em 2014, 6,7% (1405) foram causadas por agrotóxicos de diferentes finalidades. Os piretroides, estavam envolvidos em 685 casos, relacionados ao uso veterinário (285 casos), agrícola (116 casos) e domiciliar (397 casos). Destes, 196 foram induzidos pela cipermetrina, sendo este princípio ativo considerado o piretroide mais frequentemente envolvido em casos de intoxicação.

As síndromes clínicas observadas nos intoxicados por piretroides são diferentes e estão relacionadas à estrutura química, na qual os piretroides tipo I causam Síndrome T (tremores), caracterizada por induzir, em ratos, tremores pelo corpo, agressividade, aumento da sensibilidade, hiperexcitabilidade e convulsões. Já os piretroides tipos II estão associados a ação no sistema nervoso central, 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 repetitivos (Velisek, et al., 2007).

A via de exposição mais referida nos acidente é a dérmica, porém apesar da inalatória ser menos incidente, a preocupação quando piretroides são utilizados em espaços fechados aumenta. O principal efeito adverso da exposição dermal é parestesia, devido à hiperatividade das fibras nervosas sensoriais cutâneas. Com a ingestão de piretroides por humanos, dentro de minutos podem ocorrer: dor de garganta, náusea, vômito e dores abdominais. Ainda podem causar úlceras orais, aumentando secreções e disfagia. Efeitos sistêmicos ocorrem entre 4 e 48 horas após exposição. Tonturas, dores de cabeça e fadiga são comuns, podendo chegar à coma e convulsões (Bradberry et al., 2005).

São poucos os estudos que referem o piretroide e suas consequências na audição humana. Um relato de caso demonstrou um caso de perda auditiva súbita nas frequências altas bilateralmente após a exposição aguda a um tipo de piretróide de uso doméstico. Contudo, houve regressão de perda auditiva posterior à desintoxicação através de tratamento medicamentoso (Stefani et al., 1996). Em pesquisa com trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos do tipo organofosforado e piretroide foi constatado que 57% dos sujeitos apresentaram perda auditiva neurosensorial nas frequências altas (Teixeira e Brandão, 1998).

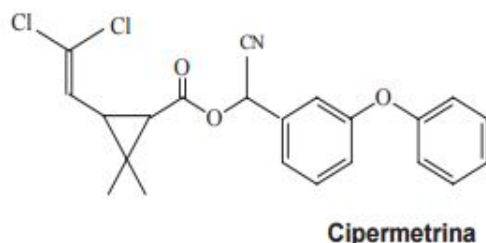
Outras pesquisas têm corroborado com esses achados, verificando a incidência de perda auditiva periférica relacionada à exposição a plantações pulverizadas com inseticidas dos tipos piretroide e organofosforado em agricultores da cidade de Nova York (Beckett et al., 2000).

2.3 Cipermetrina

A cipermetrina, nome químico: (RS)-á-cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;

1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate (Figura 1), é um inseticida, da classe dos piretroides tipo II, usualmente em fórmula líquida, para ser diluído com água para pulverizações (Pragas online, 2015). Sua formula estrutural pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1. Fórmula estrutural da Cipermetrina.



Fonte: Santos MAT., Areas MA, Reyes FGR. Piretroides: uma visão geral. Alimentos e Nutrição. 2007;18(3):339-349.

De acordo com a ANVISA (2015), 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 outras.

Os agrotóxicos, e dentre eles a cipermetrina, podem causar quadros de intoxicação aguda e crônica que poderão se manifestar de forma leve, moderada ou grave e pode ocorrer por três vias: inalação, ingestão e dérmica (Körbes et al., 2010).

Apesar da cipermetrina ser considerada uma substância de menos impacto que outros agrotóxicos e amplamente utilizada, ainda são poucas as informações referentes aos seus efeitos. Estudos têm demonstrado que a cipermetrina pode induzir alterações nas pituitárias, no fígado, nos ovários e redução na motilidade espermática e nos níveis plasmáticos de estradiol e testosterona (Singh et al., 2008). Em humanos, a substância causa reações

alérgicas, irritação do trato respiratório com tosse, dispnéia, espirros e dificuldade respiratória, considerado um dos principais sinais clínicos causado pelo envenenamento com este pesticida. A cipermetrina é considerada de baixa toxicidade sistêmica para mamíferos e pássaros. Esta característica ocorre, pois a metabolização e eliminação destes compostos é significativamente mais rápida em mamíferos e pássaros do que em peixes (Yilmaz et al., 2004; Begum, 2005). Como outros piretroides, a cipermetrina é rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal, após a administração oral e respiratória. A cipermetrina é uma substância altamente lipofílica, contudo, devido ao rápido metabolismo, a magnitude da toxicidade é amplamente diminuída. A toxicidade no ser humano depende muito da apresentação do produto, da duração e frequência da exposição, assim como da saúde do indivíduo (Cantalamezza, 1993; Santos et al., 2007).

2.4 Avaliação Auditiva em humanos expostos a agrotóxicos

Todas as pessoas que entram em contato com agrotóxicos ou produtos químicos em função de suas atividades laborais, através do meio ambiente, da utilização doméstica ou acidental são consideradas expostas a esses agentes. Em todas as situações poderão ser observadas, alterações subclínicas, clínicas e laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de intoxicação por agrotóxicos (Ministério da Saúde, 2006).

Em pesquisas com humanos os métodos mais frequentemente utilizados para a avaliação da ototoxicidade são a audiometria tonal, audiometria vocal, imitanciometria, pesquisa do declínio do reflexo acústico, pesquisa das Emissões Otoacústicas (EOA) e do Potencial Evocado Auditivo de Tronco Encefálico (PEATE) (Kós et al., 2013; Gatto et al., 2014). Além da avaliação da audição humana, alguns destes estudos aplicaram questionários que visavam entender as queixas auditivas e o vínculo dessas com a exposição a agrotóxicos.

Como já mencionado anteriormente, a configuração dessa perda auditiva provocada por substâncias químicas pode ser muito semelhante àquela relacionada ao ruído, dificultando a identificação da real causa da perda, visto que avaliação em pesquisas com humanos tem a questão multifatorial da causa envolvida (Teixeira e Brandão, 1998; Gatto et al., 2014).

O exame de Emissões Otoacústicas Evocadas mensura a integridade da orelha interna, detectando alterações auditivas de origem coclear, de forma objetiva, rápida e não invasivo (Pialarissi e Gattaz, 1997). É caracterizado pela liberação de energia sonora originada pelas células ciliadas na cóclea que se propaga pela orelha média até atingir o conduto auditivo externo e estão ausentes quando os limiares tonais estão acima de 20-30 dB (Pialarissi e Gattaz, 1997).

O teste pode ser realizado com emissão de estímulo e gravados através de um microfone colocado no canal auditivo externo de crianças (Azevedo, 2003). Existem três tipos, porém, os dois tipos de emissões otoacústicas evocadas mais comuns são: transientes e produto de distorção. Emissões otoacústicas transientes, são respostas a sinais acústicos de curta duração, clique ou tom burt, enquanto, por produto de distorção, são evocadas por dois tons puros de diferentes frequências (f_1 e f_2), apresentados simultaneamente. Eles representam a resposta não linear da orelha interna aos estímulos tonais e consistem de novas frequências diferentes daquelas inicialmente apresentadas (Pialarissi e Gattaz, 1997; Azevedo, 2003; Sousa et al., 2010).

Em humanos, a intensidade do estímulo desencadeante pode variar de 0 a 70 dB NPS e as frequências sonoras analisadas estão na faixa de 500 a 8.000 Hz (He, 1993; Schmiedt, 1993).

A orelha média deve estar limpa para que o equipamento acesse com acurácia o funcionamento da cóclea. As limitações estão relacionadas a presença de fluidos na orelha

média, pressão negativa associada com otite ou problemas que afetam o canal auditivo (Pialarissi e Gattaz, 1997; Azevedo, 2003; Sousa et al., 2010).

2.5 Experimento com Modelo Animal

O uso de animais em pesquisa científico é datado antes de Cristo, e estudos no Brasil tem como espécies mais utilizadas o rato (pelo porte e quantidade); o coelho (pela docilidade e facilidade de manuseio) e o cão (pelo porte e constituição anatômica) (Miziara et al., 2012). Animais têm sido constantemente usados como modelos experimentais de avaliação auditiva na medicina, em especial ratos, devido à facilidade de manejo, a similaridade com a orelha humana, e em relação aos agrotóxicos, permitem a caracterização da perda auditiva, assim como, de seus mecanismos especificadamente e sua aplicabilidade no ser humano.

O rato tem sido utilizado como modelo para experimento por exibir características anatômicas e patológicas semelhantes com a orelha humana, como cóclea projetada no interior da orelha e ossículos da cadeia definidos (Albuquerque et al., 2009).

Atualmente, são poucos os trabalhos com uso de modelo animal na área da fonoaudiologia, bem como, poucos são os estudos sobre a relação entre a exposição a agrotóxicos e a audição. Muitos dos trabalhos envolvendo a audição e agrotóxicos têm o viés multifatorial do modelo de exposição no ser humano, e as pesquisas com exposição a agrotóxicos utilizando modelo animal geralmente utilizam a via intraperitoneal (Körbes et al., 2010; Finkler et al., 2012). No entanto, a via intraperitoneal não é uma via pela qual o ser humano está exposto. Os indivíduos geralmente estão expostos, de forma dérmica e/ou inalatória, nesse sentido é necessário que os métodos de pesquisa viabilizem esse tipo de via para a avaliação dos efeitos tóxicos, mimetizando a exposição desses indivíduos.

Estudo com outra substância agrotóxica em cobaias, como os organofosforados, demonstrou alterações morfológicas cocleares, com lesões nas células ciliadas externas concomitantemente à presença de emissões otoacústicas (Körbes et al., 2010). Assim, foi evidenciado que a intoxicação aguda pelo organofosforado não causou alteração funcional da cóclea, tendo em vista que as 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 (Körbes et al., 2010).

A anatomia topográfica da orelha média de ratos albinos foi descrita em pesquisa, revelando detalhes estruturais, dentre as quais, as estruturas se mostraram semelhantes às do humano, com algumas diferenciações, como presença de ossículos mais finos (Albuquerque et al., 2009). Outro estudo cita a facilidade do acesso à orelha média do rato causando mínima morbidade e mortalidade dos animais. Quando comparada com a cobaia, as estruturas anatômicas da orelha média do rato são mais similares a do humano. A cóclea do rato é projetada no interior da orelha e os ossículos estão claramente definidos e podem ser removidos separadamente como no humano, e a exceção é a localização mais superficial e do nervo facial do rato quando comparado ao da cobaia e ao humano (Pinilla et al., 2001).

Em revisão de literatura Reis et al., (2017) evidenciam o rato como o melhor animal para ser utilizado em estudos de audiologia, descrevendo e comparando em seu estudo diferentes espécies que são descritas em modelos experimentais de audição. Este trabalho colabora no entendimento dos benefícios e dificuldades na pesquisa com cada modelo.

Embora as otoemissões acústicas evocadas transientes sejam realizadas em ratos, as por produto de distorção (EOAPD) tem maiores benefícios, as emissões otoacústicas transientes fazem uma avaliação global da cóclea enquanto as emissões otoacústicas por produto de distorção avaliam por frequência. A maioria das pesquisas com ratos e EOAPD

tem utilizado o mesmo instrumento o qual é usado em estudos com seres humanos (Jimenez et al., 1999; Parham e Kim, 2001). Desta forma, as medidas de EOAPD são limitadas as frequências primárias abaixo de 20kHz, supondo-se que a cóclea do rato tem 7 milímetros de comprimento e tem um limite superior de frequência de 12kHz, a referência de medidas de EOAPD exclui a região basal de cerca de 2,5mm (Jimenez et al., 1999).

2.6 Protocolo de avaliação de toxicidade

De acordo com o protocolo da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2009) de exposição inalatória subcrônica sugere grupos de seis animais, no entanto, quando revisamos na literatura, os estudos envolvendo audição e ratos, a maioria utiliza até doze animais por grupo, permitindo com que os critérios de exclusão não reduzam o número de animais a níveis em que as diferenças entre os grupos possam ser evidenciadas (Freitas et al., 2009).

A exposição subcrônica por método inalatório é uma forma de mimetizar as exposições laborais nas quais os indivíduos que lidam com agrotóxicos enfrentam de confusão por meio de condições controladas de laboratório.

Não foram encontrados na literatura estudos expondo animais por meio inalatório a cipermetrina isolada que visem avaliar audição. Desta forma, observa-se a necessidade de maiores estudos, mimetizando esta exposição na qual o ser humano pode estar comprometendo sua saúde, principalmente aqueles que não se utilizam de equipamentos protetores.

2.7 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; 75(1):43-49.
- Alcarás PAS, Larcercda ABM, Marques JM. Study of Evoked Otoacoustic Emissions and suppression effect on workers exposed to pesticides and noise. *CoDAS.* 2013; 25(6):527-533.
- Almeida CIR, Almeida RR, Duprat AC. Ototoxicidade. *Folha Médica.* 1993; 106(3):79-84.
- Almeida WJ, Magalhães CM, Junger CM. Agrotóxicos. *Cad. Saúde Pública* [Internet]. 1985; 1(2):220-249.
- ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. Índice Monográfico – C10 Cipermetrina. [Acesso em: 2015 de setembro 2017]; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/629dd00047458760914ad53fbc4c6735/C10++Cipermetrina.pdf?MOD=AJPERES>.
- Araújo AJ, Lima JS, Moreira JC, Jacob SC, Soares MO, Monteiro MCM, Amaral AM, Kubota A, Meyer A, Cosenza CAN, Neves C, Markowitz S. Multiple exposure to pesticides and impacts on health: a cross-section study of 102 rural workers, Nova Friburgo, Rio de Janeiro State, Brazil. *Cien Saude Colet.* 2007; 12(1):115-30.
- Azevedo MFD. Emissões Otoacústicas. In: FIGUEIREDO, M.S. (Org.). Conhecimentos essenciais para entender bem Emissões Otoacústicas e BERA. São José dos Campos: Pulso, 2003, p. 35-83.
- Beckett W, Chamberlain D, Hallman EA. Hearing conservation for farmers: source apportionment of occupational and environment factors contributing to hearing loss. *Journal of Occupational and Environmental Medicine.* 2000; 42:806-813.
- Begum, G. In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. *Pesticide Biochemical and Physiology.* 2005; 82:185-196.
- Bradberry SM, Cage SA, Proudfoot, Vale JA. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews.* 2005; 24(2):93-106.
- Brummett RE. Ototoxicity of vancomycin and analogues. In *Otolaryngologic Clinics of North America.* 1993; 26(5):821-828.
- Cantalamesa F. Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin, and cypermethrin in neonatal and adult rats. *Arch Toxicol.* 1993; 67(7):510-513.
- Carneiro FF, Augusto LGS, Rigotto RM, Friedrich K, Búrgio AC, Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde ed., Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul. Relatório Anual de Atendimento - 2014. Disponível em: <http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/201302.pdf>. Acesso em 12 de dezembro de 2017.
- Crawford JM, Hoppin JA, Alavanja MCRA, Blair A, Sandler DP, Kamel F. Hearing Loss among Licensed Pesticide Applicators. *J. Occup. Environ. Med.* 2008; 50(7):817-826.
- Erdogan S, Zeren EH, Emre M, Aydin O, Gumurdulu D. Pulmonary effects of deltamethrin inhalation: an experimental study in rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006; 63(2):318-323.
- Finkler AD et al. Otoproteção em cobaias expostas a agrotóxico e ginkgobiloba. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 2012; 78(3):122-128. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942012000300020

&lng=en&nrm=iso>.

- Fluente A, McPherson B. Organic solvents and hearing loss: the challenge for audiology. *Int J Audiol.* 2006; 45(7):367-381.
- Freitas MR, Silva VC, Brito GAC, Carvalho JJV, Gomes JRM, Ribeiro RA. Avaliação da sensibilidade das emissões otoacústicas produtos de distorção e dos potenciais auditivos evocados de tronco encefálico na ototoxicidade por cisplatina em ratos. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 2009; 75(4):476-484.
- Gatto MP., Fioretti M., Fabrizi G., Gherardi M., Strafella E., Santarelli I. Effects of potential neurotoxic pesticides on hearing loss: A Review. *Neurotoxicology.* 2014 May; (42):24-32.
- He NJ, Schmiedt RA. Fine structure of the 2F1-F2 acoustic distortion product: changes with primary level. *Journal of the Acoustical Society of America.* 1993; 94(5):2659-2669.
- Hoshino, ACH. et al. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2008; 74(6):912-918.
- Hyppolito MA, Oliveira JAA. Ototoxicidade, otoproteção e autodefesa das células ciliadas da cóclea. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2005; 38(3/4):279-289.
- Jimenez AM(1), Stagner BB, Martin GK. Age-related loss of distortion product otoacoustic emissions in four mouse strains. *Hear Res.* 1999; 138(1-2):91-105.
- Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico: revisão de literatura. *Rev. soc. bras. fonoaudiol.* 2010 ; 15(1):146-152. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-80342010000100024&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-80342010000100024>.
- Kós AO, Kós MI. Etiologia das Perdas Auditivas e suas características audiológicas. *Fundamentos em Fonoaudiologia – Audiologia.* Rio de Janeiro. 1998, p. 131-135.
- Kós MI, Hoshino AC, Asmus CI, Mendonça R, Meyer A. Efeitos da exposição a agrotóxicos sobre o sistema auditivo periférico e central: uma revisão sistemática. *Cad. Saúde Pública.* 2013; 29(8):1491-1506. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2013000800003&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00007013>.
- Kós MI, Miranda MF, Guimarães RM, Meyer A. Avaliação do sistema auditivo em agricultores expostos à agrotóxicos. *Rev. CEFAC.* 2014; 16(3):941-948. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-18462014000300941&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0216201420212>
- Lacerda A, Leroux T, Morata T. Efeitos ototóxicos da exposição ao monóxido de carbono: Uma revisão. *Pró-Fono Revista de Atualização Científica.* 2005; 17(3): 403-412.
- Meyer A, Chrisman J, Moreira JC, Koifman S. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research.* 2003; 93(3):264-271.
- Ministério da Saúde [Internet]. 2006. Protocolo de Atenção à Saúde dos Trabalhadores Expostos a Agrotóxicos. [Acesso em: 15 de Setembro 2015]; Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_atencao_saude_trab_exp_agrotoxicos.pdf
- Miziara ID, Magalhães ATM, Santos MA, Gomes EF, Oliveira RA. Ética da pesquisa em modelos animais. *Braz. j. otorhinolaryngol.* 2012; 78(2):128-131. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942012000200020&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-86942012000200020>.

- Osti, SC, Varoli FMF, Matushima ER, Bernardi MM. Comparative studies of delthametrin acute toxicity in exotic and brasilian fish. *Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology*. 2007; 2(2):101-106.
- Parham K, Sun XM, Kim DO. *Handbook of Mouse Auditory Research – From Behavior to Molecular Biology*. Florida: CRC Press; 2001. Noninvasive Assessment of Auditory Function in Mice: Auditory Brainstem. Response and Distortion Product Otoacoustic Emissions; p. 37-58.
- 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*. 2006; 607(2):176-83.
- Pialarissi PR, Gattaz G. EmissõesOtoacústicas: Conceito Básicos e AplicaçõesClínicas. *Arquivos da FundaçãoOtorrinolaringologia*. 1997;1(1).
- 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):515-517.
- Pragas Online: Cipermetrina. [Acessado em 10 de Setembro de 2015]; Disponível em: <http://www.pragas.com.br/produtos/monografias/cipermetrina.php>
- Reis A, Dalmolin SP, Dallegrave E. Modelos animais para avaliação auditiva: revisão de literatura. *Rev. CEFAC [Internet]*. 19 de dezembro 2017]; 19(3):417-428. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-18462017000300417&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/1982-021620171932117>.
- Santos M, Areas M, Reyes F. Piretroides – uma visão geral, *Alim. Nutr*. 2007; 18(3):339-349.
- Sayim F, Yavaşoğlu NUK, Uyanikgil Y, Aktuğ H, Yavaşoğlu A, Turgut M. Neurotoxic Effects of cypermethrin in Wistar rats: a haematological, biochemical and histopathological study. *J Health Sci*. 2005; 51(3):300-307.
- Sheikh N, Javed S, Asmatullah A, 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.
- Singh PB, Singh V. Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17 β and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere*. 2008; 72:422-431.
- Soderlund, DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 2002; 171:3-59.
- Sousa LCA, Piza MRT, Alvarenga KF, Cósér PL. *Eletrofisiologia da audição e emissões otoacústicas*. 2. ed. Ribeirão Preto: Novo Conceito; 2010.
- Stefani E, Matusuyama C, Melo RR. Ototoxicidade por inseticida doméstico: relato de caso. *Anais do 33º Congresso Brasileiro de Otorrinolaringologia e 4º Congresso Norte Nordeste de Otorrinolaringologia*. Recife, 1996.
- Teixeira CF, Brandão MFA. Efeitos dos agrotóxicos no sistema auditivo dos trabalhadores rurais. *CadernoInformativo de Prevenção de Acidentes*. 1998; 19:46-52.
- Teixeira CF, Augusto LGS, Morata CT. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. *Rev. SaúdePublica*. 2003; 37(4):417-423.
- Velisek J, Jurcikova J, Dobsikova R, Svobodova Z, Piacková V, Machova J, Novotny L. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *ScienciDirect. Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2007; 23:297-301.
- Vilela RAG, Malagoli ME, Morrone LC. Gerenciamento participativo em saúde do

trabalhador: uma experiência na atividade de controle de vetores. Saude Soc.2010; 19(4):969-980.

Yilmaz M, Gul A, Erbasli K. Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticulata*, Pallas, 1 59). Chemosphere. 2004; 56:381-385.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

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

Objetivos específicos

- Verificar as resoístas das EOAPD nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz em ratos Wistar.
- Detectar possíveis mudanças na amplitude das EOAPD nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz em ratos Wistar após a exposição a cipermetrina.
- Avaliar as estruturas do sistema auditivo (bula timpânica, órgão de corti e cóclea) em ratos Wistar expostos a cipermetrina.
- Avaliar o desenvolvimento ponderal de ratos Wistar durante o período de exposição.
- Descrever sinais clínicos decorrentes da exposição a cipermetrina em ratos Wistar.
- Avaliar a massa relativa dos órgãos de ratos Wistar expostos a cipermetrina.

4 ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Cover Letter

Porto Alegre (Brazil), September, 2018

I am pleased to submit an original research article entitled “Ototoxicity of Cypermethrin in Wistar rats” by Eduarda Oliveira Cunha, Aléxia Reis, Mateus Belmonte Macedo, Márcia Salgado Machado and Eliane Dallegrave for consideration for publication in the Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology. In this manuscript, we show that a widely pesticide, the cypermethrin caused ototoxicity in Wistar rats.

We believe that this manuscript is appropriate for publication by Brazilian Journal Of Otorhinolaryngology because it evaluate a specific toxicity of pyrethroid pesticide, which has a lack of studies in the literature, specially in the Hearing literature. Our manuscript presents a new protocol to evaluate ototoxicity in animal models without anesthesia bias.

This manuscript has not been published and is not under consideration for publication elsewhere. We have no conflicts of interest to disclose.

Thank you for your consideration! Sincerely,

Eliane Dallegrave, PhD

Adjunct Professor, Department of Pharmacosciences

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Postal/Mail Address: Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil -

CEP 90050-170

Email address: elianedal@ufcspa.edu.br

Telephone Number: +55 51 99914-7500/ +55 (51) 3303-9000

1.TITLE PAGE

Ototoxicity of Cypermethrin in Wistar Rats

Eduarda Oliveira Cunha¹, Aléxia dos Reis², Mateus Belmonte Macedo³, Márcia Salgado Machado⁴, Eliane Dallegraves⁵

1. Master's Degreeon Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
2. Master's Degreeon Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
3. Bachelor's Degreeon Speech Therapy, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
4. PhD, Adjunct Professor, Departmentof Speech Therapy, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
5. PhD, Adjunct Professor, DepartmentofPharmacosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Corresponding Author:

Eliane Dallegrave, PhD

Adjunct Professor, Department of Pharmacosciences

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Postal/Mail Adress: Rua Sarmento Leite, 245 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - CEP 90050-170

Email Adress: elianedal@ufcspa.edu.br

Telephone Number: +55 51 99914-7500/ +55 (51) 3303-9000

Ototoxicity of Cypermethrin in Wistar rats

Abstract

Introduction: This study presents the effect of cypermethrin on the cochlear function in Wistar rats post subchronic inhalation exposure. Worldwide several pesticides are described as causing health disorders. Cypermethrin is currently one of the most commonly used, however, little is known about its harmful effects, specially related to hearing. Human studies have associated pesticides with hearing disorders, but they present limited conclusions due to the multi factors that the population are exposed, such as noise. **Methods:** This is the first study that mimetize human exposure to cypermethrin. It is a subchronic inhalation animal study (6 weeks, 4 hours/day), using 36 male Wistar aged 60 day. Rats were randomly assigned into 3 groups: Control (12 rats exposed to inhalation of water); Positive Control for auditory lesion (12 rats administrated with 24mg/kg intraperitoneal cisplatin); Experimental (12 rats exposed to inhalation of cypermethrin – 1.667mg/mL). Animals were evaluated by distortion product otoacoustic emissions pre and post exposure. **Results:** The frequencies of 8, 10 and 12 kHz in both ears (right $p= 0.003; 0.004; 0.008$ and left $0.003; 0.016; 0.005$ respectively) and at frequencies 4 and 6 in the right ear ($p= 0.007$ and 0.015 , respectively) in the animals exposed to cypermethrin presented significant reduction. **Conclusion:** Subchronic inhalation exposure to cypermethrin provided ototoxicity in rats without systemic toxicity.

Key Words: Ototoxicity. Cypermethrin. Rats.

INTRODUCTION

Cypermethrin

(*RS*)- α -cyano-3-phenoxybenzyl(1*RS*,3*RS*;1*RS*,3*SR*)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) is a synthetic pyrethroid substance for agricultural, animal production, public health campaigns for vector control, as well as for domestic use¹⁻². This substance shows a high photostability, a non-persistence in the environment and less toxicity for human use, which makes it widely applicable. Recently, cypermethrin has become one of the dominant pesticides, replacing carbamate and organophosphates that are considered more toxic³.

According to the World Health Organization (WHO), there are more than 18.2 per 100,000 cases of acute pesticide poisoning in agricultural workers per year, and probably the subacute cases are worse, but there are difficulties to document these data. Furthermore, not all the pesticides effects are known. In fact, there is a concern, that different chemical substances may cause hearing damage, such as the pesticides⁴.

Human studies indicate that exposure to pesticides may cause damage to the auditory system^{5-11, 20}. However, these researches have limitations and there is a lack of studies evaluating ototoxicity due to exposure to pesticides. In animal models, they use different modalities of administration of the substance. Often the modality of exposure is not correlated with occupational exposure and used anesthesia to auditory evaluation⁵. Moreover, most of the researches that related pesticides with hearing loss are case reports or human studies, who are exposed to noise machinery and to other factors that also can cause hearing damage^{5,19}.

An experimental study with organophosphates in guinea pigs¹² has shown cochlear morphological changes, with lesions in the outer hair cells concomitantly with the presence of otoacoustic emissions¹². However, it is still unclear the relation of pesticides with hearing damage because of the multifactors that human are exposed. Therefore, our study in animal models exposed only to cypermethrin, free from the bias of noise, allows a characterization of the implications of a pesticide in the auditory system. Thus, this study aimed to evaluate the ototoxic effects of subchronic inhalation exposure to cypermethrin in Wistar rats through distortion product otoacoustic emissions.

METHODS

This was an experimental study based on subchronic inhalation toxicity test, number 413, from the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals¹⁴. All procedures involving animals were approved by the UFCSPA Ethics Committee on Animal Use under n° 323/15.

Animals

Thirty six male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 60 days were used in the experiments (body weight approximately 300 ± 50 g). The animals were kept under controlled conditions of the bioterium, 12 h light/dark cycle, receiving water and food ad libitum, except during exposure. Only animals with no signs of external ear pathology and distortion product otoacoustic emissions (DPOAE) present in all tested frequencies (4, 6, 8, 10 and 12 kHz) were selected for the experiment. The rats were randomly assigned to three groups: control (n=12), positive control (n= 12) and experimental (n=12). All animals were exposed to the same background noise level who was kept below 60 dB at all time.

Substances

The commercially available formulation of Cypermethrin (type II pyrethroid) was dissolved in distilled water at the concentration of 1,667 mg/mL (1/10 of rat inhalation LC₅₀).

Cisplatin, an anti-neoplastic medicine, was used as a positive control for ototoxicity, totaling 24mg/kg, each animal received 8 mg/kg intraperitoneally, per day, diluted in 10 ml/kg of saline solution.

Distortion product otoacoustic emissions

DPOAEs were recorded using the OtoreadClinical®, Interacoustics®. Two tones (f1 and f2) were used as acoustic stimuli (f1 \ f2, f2:f1 ratio fixed at 1,22). The f1 and f2 tones were presented at a stimulus level of 65 and 55db SPL (Sound Pressure Level). DPOAE tests were performed with an infant size hearing probe placed into the external ear canal of the rat and tested at frequencies of 4, 6, 8, 10 and 12 without use of anesthesia. Distortion product otoacoustic emissions were performed in the control and experimental groups before (pre-exposure) and after (post-exposure) the exposure period (0 and

42 days), and in the positive control previously the 1st administration and 24 hours after the 3rd administration.

Exposures

In our protocol of inhalation exposure, we used chambers of 56 liters. The chambers were joined to ultrasonic nebulizers (avoiding noise) as an inlet stream, and to exhaust system. This system was created avoiding noise exposure by an enclosure for acoustic insulation.

The animals were adapted to our protocol during a period (5 days). They were trained to habituation, firstly with the probe used in the auditory evaluation and with the sound that occurs during the DPOAE, as well as adaptation in the exposure chamber, initially for 1h (day 1), the 2nd day for 2h, the third day for 3h and on the 4th day for 4h (using only air flow). On day 5 air flow was used with water vapor during 4 hours.

The control group was exposed to water (vehicle for dilution of the formulation) inhalation for 4h, 5 times a week, for 6 weeks. The experimental group was exposed to cypermethrin inhalation at a concentration of 1,667mg/mL, for 4h, 5 times a week, for 6 weeks. This protocol was created and used by our group in inhalation exposition of pesticides.

The positive control group of 12 rats treated with 8mg/kg cisplatin intraperitoneally, once daily, for 3 consecutive days (totaling 24mg/kg)¹³.

Statistics Analyses

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package (SPSS version 21.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Numeric variables were specified as median (25th percentile–75th percentile). The Mann–Whitney U test was used to compare the groups (post-exposure assessment in relation to the pre-exposure of each group) and Kruskal Wallis (comparison of the variations post minus pre evaluation between groups). Parametric data were presented as mean and standard error of the mean and those variables that had normal distribution were evaluated by t'Student (relative body mass, relative organ mass). The statistical significance value was regarded as $p < 0.05$.

RESULTS

The effect of cypermethrin upon DPOAEs was found to be essentially the same across this frequency range of 4, 6, 8, 10 and 12kHz.

Exposure to cypermethrin demonstrated significantly reduction of DPOAE ($p < 0.05$, Mann-Whitney test) compared to pre-exposure measurements (Table 1) at frequencies 8, 10 and 12kHz in both ears (right $p = 0.003$; 0.004; 0.008 and left 0.003; 0.016; 0.005, respectively) and at frequencies 4 and 6 in the right ear ($p = 0.007$ and 0.015, respectively).

TABLE 1 - Median and interquartile ranges of DPOAE amplitudes pre- and post subchronic inhalation exposure to cypermethrin (experimental group)

Ear	Frequency (KHz)	Pre-exposure Median (quartile25: quartile75)	Post-exposure Median (quartile25: quartile75)	P value (Mann Whitney)
Right	4	9.50 (3.50:17.25)	-2.50 (-9.25:1.00)	0.007*
Right	6	27.50 (6.50:38.50)	0.50 (-10.75:10.25)	0.015*
Right	8	31.50 (16.75:46.25)	-2.00 (-25.00:14.75)	0.003*
Right	10	27.50 (2.00:42.25)	0.00 (-6.50:6.75)	0.004*
Right	12	10.00 (7.00:44.00)	0.50 (-11.50:5.25)	0.008*
Left	4	6.50 (4.50:14.00)	4.00 (- 2.75:9.00)	0.146
Left	6	8.00 (00.00:23.00)	1.00 (-3.75:3.75)	0.077
Left	8	9.50 (7.00:33.25)	17.00 (-25.00:-1.75)	0.003*
Left	10	10.50 (5.00:29.50)	-0.50 (-14.50:7.25)	0.016*
Left	12	29.00 (10.75:34.00)	6.00 (2.50:9.00)	0.005*

* $p < 0.05$ (Mann Whitney)

The same significantly reduced DPOAE was found in the cisplatin group (Table 2) at frequencies 12 kHz ($p = 0.006$) in the right ear and 4 kHz in the left ear ($p = 0.032$). The control group showed no significant difference ($p > 0.05$; Mann Whitney test) in post-exposure measurements (Table 3), confirming the standardization of the experimental model.

TABLE 2 - Median and interquartile ranges of DPOAE amplitudes pre- and post-treatment with cisplatin (positive control)

Ear	Frequency (KHz)	Pre-exposure Median (quartile25: quartile75)	Post-exposure Median (quartile25: quartile75)	P value (Mann Whitney)
Right	4	7.00 (4.00:12.25)	4.00 (-2.50:8.00)	0.116
Right	6	11.50 (3.50:23.50)	3.00 (0.00:7.25)	0.131
Right	8	28.00 (11.50:35.00)	18.00 (7.00:33.50)	0.195
Right	10	24.00 (12.50:34.25)	7.50 (3.25:28.00)	0.050
Right	12	24.00 (17.25:36.00)	7.00 (1.25:22.25)	0.006*
Left	4	6.50 (2.25:9.25)	-0.50 (-2.25:3.25)	0.032*
Left	6	14.00 (10.75: 20.50)	7.00 (1.50:14.00)	0.136
Left	8	23.50 (18.00:28.25)	16.00 (2.00:29.25)	0.195
Left	10	25.50 (16.75:30.25)	12.00 (5.50:29.50)	0.147
Left	12	20.50 (8.00:38.50)	8.00 (4.00:26.00)	0.239

* p< 0.05 (Mann Whitney)

TABLE 3 - Median and interquartile ranges of DPOAE amplitudes pre and post subchronic inhalation exposure to water (control)

Ear	Frequency (KHz)	Pre-exposure Median (quartile25: quartile75)	Post-exposure Median (quartile25: quartile75)	P value (Mann Whitney)
Right	4	6.50 (2.25:13.00)	10.50(7.50:14.50)	0.255
Right	6	27.50(15.25:33.25)	33.50(15.00:36.25)	0.646
Right	8	28.00(10.50:35.25)	36.50(21.50:39.00)	0.505
Right	10	32.00(14.00:38.00)	38.00(34.50:43.25)	0.308
Right	12	29.50(16.25:39.25)	42.00(21.75:48.00)	0.195
Left	4	2.00(0.00:12.50)	11.00(3.75:19.50)	0.266
Left	6	16.50(09.75:26.75)	26.00(24.00:32.75)	0.209
Left	8	19.00(4.25:37.50)	38.00(29.25:39.75)	0.153
Left	10	29.00(19.00:35.25)	30.50(24.50:39.50)	0.724
Left	12	31.50(25.50:39.75)	42.50(26.50:45.50)	0.213

* $p < 0.05$ (Mann Whitney)

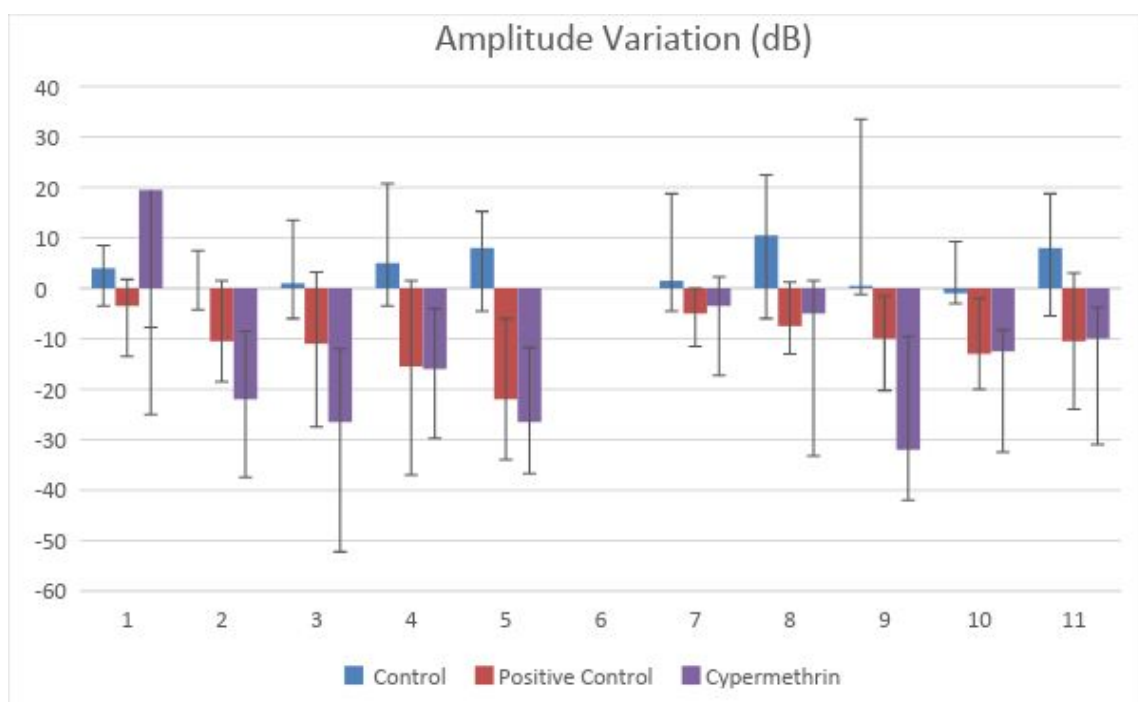
The groups showed statistical difference ($p < 0.05$; Kruskal Wallis) in relation to the variation of the medians post-exposure minus pre-exposure (Figure 1).

There was significant differences among groups in the right ear at frequency of 4, 6, 8 kHz (cypermethrin versus control) and in the 12kHz (cypermethrin and cisplatin was different from control group; $p < 0.005$; Kruskal Wallis). In the left ear, there was significant difference among groups at the frequencies of 8 and 10 kHz (cypermethrin and cisplatin was different from control group; $p < 0.005$ Kruskal Wallis). In all cases, the changes observed in the animals exposed to cypermethrin were similar to cisplatin group, considering an ototoxic substance.

FIGURE1 – Amplitude variation of DPOAE post minus pre subchronic inhalation exposure to cypermethrin or water and post cisplatin treatment.

The relative gain of body mass (mean $\pm$ standard error) in the period was similar ($p = 0.270$; t'Student test) between the control ($145.33 \pm 5.91\%$) and cypermethrin ($156.00 \pm 6.75\%$).

Therefore, most of the animals demonstrated transient clinical signs such as piloerection, dyspnea and pruritus. The clinical signs were more evident at the beginning of the exposure (between 30 and 240 minutes) and in the first two weeks.



We do not found macroscopic alterations in the organs of the animals used in the experimental protocol.

DISCUSSION

In our study, we evidenced ototoxicity by subchronic inhalation exposure to cypermethrin in Wistar rats. The results of cypermethrin exposure demonstrated reduction in amplitude on DPOAE.

Cypermethrin is considered lower toxic than other pesticides, even though it is know as a neurotoxic substance, which can also affect auditory system¹⁴⁻¹⁷.

Studies have demonstrated the neurologic impact of cypermethrin in animal models. Rats have shown tremors, seizures, writhing, and salivation as well as burrowing behavior by cypermethrin exposure in low doses⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

In human population, cypermerthrin is more associated with acute poison and allergic or respiratory effects¹⁹.

Researchers have pointed out the hearing impact of human exposed to pesticides, although, most of these studies were done with agricultural workers who are mostly exposed to more than one type of pesticide and to other causes of hearing impact^{5, 20}. Moreover, some studies have reported association between organophosphate exposure and reduction of the hearing but no one of these have single substance exposure such as cypermethrin^{5-7, 9}.

The literature suggests that pesticides exposure can damage the auditory system, however, in human studies different factors may influence the outcome⁵. In addition, some studies do not have exposure modality and duration defined^{9, 20}. No one of these articles described in the literature have performed an inhalation exposure as our study have done to evaluate cochlear function^{5,9}.

In this study, we have used the DPOAE to evaluate the impact in cochlear function. DPOAE is widely used as a screening method to evaluate newborns in many countries²². In some studies, used DPOAE as a screening to ototoxic substances, because it allow us evaluate the high frequencies, as know as the first frequencies that most of the substances considered ototoxic affected. We demonstrated that, this test can be performed without anesthesia once rats are trained^{8-9, 23}. Then, the decrease of amplitude by cypermethrin exposure observed in our study can be directly correlated.

To the best of our knowledge, this is the first time that the exposure to cypermethrin was evaluated without anesthesia. On the contrary of previous studies that have used pesticides⁴⁻¹² considered more toxic than cypermethrin, we mimetized the human exposure. Some anesthetics may interfere in the results of studies, changing the latency and amplitude of the waves.²¹ In this study, it was possible to evaluate the animals without anesthesia, due to the previous acclimatization to the instruments.

Moreover, ototoxicity is described as a reversible or irreversible damage of inner ear functions due to the exposure of chemical substances²³⁻²⁴. The ototoxicity caused by cypermethrin could impact in the quality of life of agricultural workers who are daily exposed to it. As a result of ototoxicity in humans, Cypermethrin is referred in literature as a low systemic toxic agent, and it could be observed in our study that no systemic alterations were observed.

In this paper we have assessed the effects on cochlear function of subchronic inhalation to cypermethrin in Wistar rats, and developed an animal protocol that eliminated the confounders that are associated to hearing loss in human research. Furthermore, our findings were consistent, since all control groups (positive control and control) answered as the literature refers. The animals manifested few clinical signs, which indicates that ototoxicity associated to cypermethrin exposure was presented even without systemic toxicity.

There were limitations to this study based on the difficulty to explain the mechanism of damage on cochlear function, as well as in the inner cells. We believe that cypermethrin can damage other structures and for future studies, we suggest the histopathological analysis of inner cells as well as evaluation of the central auditory system.

Ototoxicity should be considered during the diagnostic of hearing loss, especially in agricultural workers or who could be exposed to pesticides. These individuals are exposed to multi factors and a vulnerable population to hearing loss. In clinical practice, we may consider the association of experimental and human studies due to the importance of the understanding the mechanism of the substances that our patients are exposed, as well as the effects of it in audiologic clinic. Most of studies about ototoxicity in PubMed are related to use of medicines, such as cisplatin and antibiotics⁴.

Even though, this is an experimental study, due to the absence of literature associating use of drugs and exposure to chemical substances with a hearing effects. It is necessary to correlate clinical studies with experimental studies.

CONCLUSION

This study provides evidences that subchronic inhalation exposure to cypermethrin at low concentrations induced ototoxicity. In addition, no significant systemic effects were found.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for financial support and Mateus Belmonte Macedo and Dora Saul as students who helped us with technical support.

REFERENCES

1. Pragas Online: Cipermetrina. [Acessado em 10 de Setembro de 2015]; Disponível em: <http://www.pragas.com.br/produtos/monografias/cipermetrina.php>
2. Chareonviriyaphap, T., Bangs, M. J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V., & Ngoen-Klan, R. (2013). Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases. Thailand. *Parasites & Vectors*. 2013. (6); 280. <http://doi.org/10.1186/1756-3305-6-280>
3. Miyamoto J., Kaneko H., Tsuji R., Okuno Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks to human health should be assessed. *Toxicol. Lett.* 1995. 82-83, 933-940.
4. Campo P, Morata TC, Hong O. Chemical exposure and hearing loss. *Disease-a-month : DM*. 2013;59(4):119-138. doi:10.1016/j.disamonth.2013.01.003.
5. Gatto MP., Fioretti M., Fabrizi G., Gherardi M., Strafella E., Santarelli I. Effects of potential neurotoxic pesticides on hearing loss: A Review. *Neurotoxicology*. 2014 May; (42):24-32.
6. Teixeira CF, Augusto LGS, Morata TC. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. *Rev. Saúde Pública*. 2003 Aug;37(4):417-423.
7. 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.
8. Alcarás PAS, Larcera ABM, Marques JM. Study of Evoked Otoacoustic Emissions and suppression effect on workers exposed to pesticides and noise. *CoDAS*. 2013;25(6):527-533.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Korbes D. et al . Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz. j. otorhinolaryngol*. 2010; 76(2): 238-244.
13. Freitas MRD. et al. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz. j. otorhinolaryngol*. (Impr.), São Paulo , v. 75, n. 5, p. 745-752, Oct. 2009 .

14. 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.* 2006;607(2):176-83.s. 2006;607(2):176-83.
15. Sheikh N, Javed S, Asmatullah A, 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):843-9.
16. Sayim F, Yavaşoğlu NUK, Uyanikgil Y, Aktuğ H, Yavaşoğlu A, Turgut M. Neurotoxic Effects of cypermethrin in Wistar rats: a haematological, biochemical and histopathological study. *J Health Sci.* 2005;51(3):300-7.
17. Singh AK, Tiwari MN, Prakash O, Singh MP. A current review of cypermethrin induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr Neuropharmacol.* 2012;10(1):64-71.
18. Klaassen CD, Amdur MO, & Doull. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.* (5 ed.). 1996. Toronto: McGraw-Hill Companies, Inc.
19. Aggarwal P, Jamshed N, Ekka M & Imran A. Suicidal poisoning with cypermethrin: A clinical dilemma in the emergency department. *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock.* 2015; 8(2), 123–125. <http://doi.org/10.4103/0974-2700.145424>
20. Muthaiah VPK, Ding D, Salvi R, Roth JA. Carbaryl-induced Ototoxicity in rats
21. Palumbo MIP, Ramos MC, Outeda NC, Rese de LAL, Pantoja JTC, Borges AS, The sedation on the auditory brainstem responses in dogs. 2014; 44(5) : 891-896
22. Cavalcante JMS, Isaac ML. Analysis of otoacoustic emissions in neonates at term and preterm. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology.* 2013; 79 (5) : 582-588
23. MZ Hatzopoulos S, Petruccelli J, Laurell G, Finesso M, Martini A. Evaluation of Esfahanian anesthesia effects in a rat animal model using otoacoustic emission protocols. *Hear Res.* 2002 Aug;170(1-2):12-21. Hatzopoulos S, Petruccelli J, Laurell G, Finesso M, Martini A. Evaluation of anesthesia effects in a rat animal model using otoacoustic emission protocols. *Hear Res.* 2002 Aug;170(1-2):12-21.
24. Brummett RE. Ototoxicity of vancomycin and analogues. In *Otolaryngologic Clinics of North America.* 1993; 26(5), p.821-828.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados evidenciaram que a cipermetrina é uma substância química potencialmente ototóxica, revelando a necessidade de novas normativas referentes à saúde auditiva do trabalhador exposto a agrotóxicos – em especial aqueles que são vistos como substâncias menos nocivas que outras já reconhecidas como danosas ao sistema auditivo e vestibular. O acompanhamento desses indivíduos expostos se faz necessário, nesse sentido torna-se importante, uma vez que o impacto do dano auditivo tem repercussões na qualidade de vida deste. Atentar para os exames auditivos nesses indivíduos, que contemplem também as EOAPD, pois através destas, se pode diagnosticar previamente problemas nas células ciliadas externas, mesmo sem comprometimento na audiometria tonal. O grupo que realizou esta pesquisa desenvolveu um protocolo de avaliação de funcionamento das células ciliadas externas sem o uso de anestésicos, comumente utilizados nestas avaliações, facilitando o entendimento dos efeitos diretos das substâncias analisadas, sem o possível viés da anestesia. A cipermetrina, apesar de ser uma substância considerada menos tóxica, na qual esperávamos menor impacto nas respostas das EOAPD, se mostrou como uma substância que reduz a amplitude de resposta das EOAPD de forma significativa, sendo necessário mais estudos sobre o mecanismo desta substância em todo sistema auditivo e vestibular.

6 ANEXOS