



Brazilian Journal of OTORHINOLARYNGOLOGY

www.bjorl.org



ARTIGO ORIGINAL

Efeitos da exposição inalatória subcrônica a um inseticida organofosforado contendo diclorvos nas emissões otoacústicas de ratos Wistar[☆]

Aléxia dos Reis ^{ID}^a, Eduarda Oliveira Cunha ^{ID}^a, Marina Tuerlinckx Costa Valle ^{ID}^b,
Márcia Salgado Machado ^{ID}^c e Eliane Dallegrave ^{ID}^{d,*}

^a Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Porto Alegre, RS, Brasil

^b Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil

^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa Toxicológica, Departamento de Fonoaudiologia, Porto Alegre, RS, Brasil

^d Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Laboratório de Pesquisa Toxicológica, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Departamento de Fármaco-Ciências, Porto Alegre, RS, Brasil

Recebido em 6 de novembro de 2019; aceito em 21 de abril de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Pesticidas;
Audiologia;
Ratos;
Toxicologia

Resumo

Introdução: Considerando que estudos anteriores sugerem que pesticidas podem causar distúrbios auditivos em humanos, além da falta de estudos que comprovem os mecanismos específicos de lesão e a dificuldade em separar fatores etiológicos concomitantes dos danos auditivos, como ruído e vibração, é importante desenvolver estudos que usem modelos animais para elucidar os efeitos da exposição a substâncias isoladas de outras etiologias de danos auditivos.

Objetivo: Avaliar se a exposição a um inseticida organofosforado baseado em diclorvos pode induzir ototoxicidade.

Método: Foram divididos em 3 grupos 36 ratos Wistar machos (12 ratos/grupo): controle (exposto à água), controle positivo (tratado com cisplatina para induzir dano auditivo) e experimental (exposto ao inseticida). A amplitude das emissões otoacústicas por produto de distorção nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz foi avaliada antes e após a exposição, bem como sinais de toxicidade sistêmica, ganho de massa corporal e colinesterase plasmática. Os testes *Open Field* e *Plus Maze* foram feitos em 24 ratos: experimental (n=8), controle (n=8) e grupo controle positivo (n=8, introduziu novos ratos para induzir atividade ansiolítica) para avaliar a atividade locomotora e a ansiedade, respectivamente.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.04.005>

[☆] Como citar este artigo: Reis A, Cunha EO, Valle MT, Machado MS, Dallegrave E. Effects of subchronic inhalation exposure to an organophosphorus insecticide compound containing dichlorvos on wistar rats' otoacoustic emissions. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2022;88:28–35.

* Autor para correspondência.

E-mail: elianedal@ufcspa.edu.br (E. Dallegrave).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

Resultados: Não houve alteração significativa no ganho de massa corporal e colinesterase plasmática no grupo experimental; entretanto, os animais apresentaram piloereção transitória, depressão e dispneia durante a exposição. O comportamento não foi afetado em qualquer grupo. As frequências de 8 e 10 kHz foram significativamente afetadas bilateralmente no grupo exposto ao inseticida, o qual também mostrou uma diferença significativa do controle em 10 kHz na orelha direita e 8 e 10 kHz na orelha esquerda.

Conclusão: A exposição subcrônica inalatória de inseticida organofosforado baseado em diclorvos induziu ototoxicidade na função coclear de ratos sem toxicidade sistêmica relevante.

© 2020 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

De acordo com a literatura, a exposição a pesticidas pode causar alterações na audição humana.^{1–6} A lesão auditiva geralmente ocorre devido a vários fatores⁷ e, quando ocorre no âmbito ocupacional no setor primário da economia, pode estar relacionada principalmente a dois fatores: exposição a produtos químicos ototóxicos, como solventes e pesticidas, e também ruídos de máquinas agrícolas. A perda auditiva decorrente da exposição a medicamentos ototóxicos é semelhante à que ocorre em altos níveis de pressão sonora, é neurossensorial, bilateral, simétrica, irreversível em altas frequências e causa danos às células ciliadas da cóclea.⁸

Os agroquímicos pertencentes à classe dos organofosforados (OFs) são amplamente usados na agricultura como inseticidas. Entre eles, destaca-se o diclorvos (2,2-diclorovinil-dimetil fosfato – DDVP), usado em campanhas de saúde pública para controle de vetores e como recurso na medicina veterinária no combate aos ectoparasitas⁹ no setor primário da economia brasileira (agricultura). Os OFs atuam como inibidores da colinesterase e são responsáveis por muitos envenenamentos intencionais ou acidentais.¹⁰

Os OFs são importantes para controlar vetores, se considerarmos que o Brasil tem um grande número de casos relatados de dengue, chikungunya e zica. Atualmente o país pode ser considerado o mais afetado pelo mosquito *Aedes aegypti*.¹¹ Portanto, inseticidas, como os organofosforados, são amplamente usados na saúde pública para controle de vetores. O diclorvos, um OF, também é usado em desinfestações domésticas. Além disso, existe uma preocupação com o seu uso em ambientes internos que pode estar relacionada a fases críticas do desenvolvimento humano. As crianças podem ser expostas a pesticidas, pois tendem a explorar seu ambiente quando brincam, tocam superfícies como o chão,¹² e a ter um comportamento “mão à boca”, absorvem mais pesticidas do que os adultos.¹³

Devido à existência de vários agentes etiológicos que causam perda auditiva ocupacional, como ruído de máquinas e exposição a agentes químicos, há uma dificuldade na correlação dessa patologia auditiva. Além disso, mesmo aqueles que não trabalham diretamente com essas substâncias são expostos a elas e a perda auditiva pode ser multifatorial.⁷

O estudo em animais expostos somente a pesticidas, isentos de vieses como ruído e vibração, permite a caracterização da perda auditiva e o estudo de seus mecanismos. Na literatura, existem poucos estudos que avaliam

a ototoxicidade devido à exposição a agroquímicos em modelos animais e esses costumam usar vias não correlacionadas com a exposição ocupacional, como a injeção intraperitoneal.^{14–16} Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos ototóxicos baseados na função coclear da exposição subcrônica inalatória a um inseticida organofosforado à base de diclorvos (DBOI) em ratos através de emissões otoacústicas por produto de distorção.

Método

Agentes químicos

Uma formulação concentrada emulsificável comercialmente disponível (55%) de inseticida organofosforado com diclorvos como ingrediente ativo foi diluída em água destilada na concentração de 0,0015 mg/mL, correspondeu a 1/10 da CL50 de inalação do rato, que é de 15 mg/L¹⁷ (a CL50 refere-se à concentração que causa a morte de 50% dos animais expostos). O produto comercial foi escolhido de forma a usar as substâncias às quais a população, em geral, está de fato exposta.

Como controle positivo da ototoxicidade, foi usada a droga antineoplásica cisplatina. Os ratos foram tratados com 8 mg/kg por via intraperitoneal, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos. A cisplatina foi diluída em solução fisiológica (10 mL de solução/kg).

Animais experimentais

No presente estudo, foram usados 36 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) com 60 dias e peso aproximado de 300 ± 50 g. Os animais foram mantidos em condições controladas no biotério, ciclo claro/escuro de 12 h, receberam água e comida *ad libitum*, exceto durante a exposição.

Experimento

O protocolo experimental foi adaptado do teste de toxicidade subcrônica inalatória (exposição repetida), número 413, das diretrizes da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) para o teste de produtos químicos¹⁸ e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre sob o nº 321/15. Todos os procedimentos de atenção à saúde (segundo o Conselho Nacional de Controle

da Experimentação Animal [Concea]) foram seguidos a fim de evitar dor ou angústia nos animais. Apenas animais sem sinais de patologia auditiva externa (verificada por otoscopia feita por um veterinário) e emissões otoacústicas por produtos de distorção (EOAPD) presentes em todas as frequências testadas (4, 6, 8, 10 e 12 kHz) foram selecionados para o experimento.

As câmaras de exposição à inalação eram à prova de som, com volume de 56 litros, e foram acopladas a nebulizadores ultrassônicos (evitavam ruídos) como corrente de entrada e a um aspirador como sistema de exaustão. Havia 4 animais por câmara, considerando o volume estabelecido pela OCDE.

O tamanho da amostra foi baseado em estudos anteriores, usou a variabilidade nas respostas aos parâmetros auditivos avaliados em ratos expostos ao agente ototóxico cisplatina como controle positivo.¹⁹

Durante o período de adaptação (5 dias), os animais foram treinados para se habituar com os instrumentos de avaliação auditiva, bem como adaptação ao período na câmara de exposição, inicialmente por 1 h (dia 1), 2º dia por 2 h, 3º dia por 3 h e no 4º dia por 4 h (com uso apenas do fluxo de ar). No dia 5, o fluxo de ar foi usado com vapor de água por 4 horas.

Os ratos (n = 36) foram divididos aleatoriamente em três grupos: controle negativo, controle positivo (para dano auditivo – cisplatina) e experimental. O grupo de controle negativo consistiu em 12 ratos expostos à água (veículo para diluição da formulação) por inalação por 4 h, 5 vezes por semana, durante 6 semanas. O grupo de controle positivo incluiu 12 ratos tratados com 8 mg/kg de cisplatina por via intraperitoneal, uma vez ao dia, por 3 dias consecutivos (total de 24 mg/kg). O grupo experimental foi constituído por 12 ratos expostos a DBOI inalado, na concentração de 0,0015 mg/mL, por 4 h, 5 vezes por semana, por 6 semanas.

Avaliações

Sinais clínicos e massa corporal

Os animais foram avaliados em relação à massa corporal e sinais clínicos (depressão ou excitação; tremor; piloereção; dispneia) durante todo o período experimental (uma vez ao dia nos dias de exposição).

Emissões otoacústicas por produto de distorção (EOAPD)

As emissões otoacústicas por produto de distorção foram feitas nos grupos controle e experimental antes (pré-exposição) e após (pós-exposição) o período de exposição (0 e 42 dias) e no controle positivo para induzir dano auditivo (cisplatina) imediatamente antes da 1ª administração e 24 horas após a 3ª administração nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz. Essa avaliação foi feita sem anestésico, apenas com habituação prévia dos animais aos instrumentos de avaliação auditiva. As EOAPD foram registradas com dois tons (f1 e f2) como estímulos acústicos (f1/f2, razão f2: f1 fixa em 1,22). Os tons f1 e f2 foram apresentados nos níveis de estímulo de 65 e 55db NPS (nível de pressão sonora). Os testes de EOAPD foram feitos com uma sonda auditiva para uso infantil, colocada no meatoacústico externo do rato e testada nas frequências de 4, 6, 8, 10 e 12 kHz sem uso de anestesia. As emissões otoacústicas por produtos de distorção foram feitas

nos grupos controle e experimental antes (pré-exposição) e após (pós-exposição) o período de exposição (0 e 42 dias) e no controle positivo antes da 1ª administração e 24 horas após a 3ª administração. Embora o critério de normalidade para as emissões otoacústicas frequentemente considerado seja de pelo menos 6 dB de razão sinal/ruído, nesta pesquisa as EOAPD foram analisadas pela amplitude da resposta antes e após a exposição, que foram comparadas entre os grupos (controle, controle positivo para dano auditivo e DBOI). Isso ocorreu, uma vez que os termos “normal” e “alterado” são mais adequados para emissões transitórias. Nesta pesquisa, as EOAPD (e a avaliação da amplitude da resposta pré e pós-exposição) tornaram-se uma opção melhor, pois mostraram uma redução na amplitude da resposta, mesmo que, de acordo com o critério de 6 dB, haja normalidade.

Testes comportamentais

Trinta dias após o início do experimento, oito ratos de cada grupo (grupo controle e experimental) foram selecionados aleatoriamente e, além disso, oito novos ratos foram incluídos em um grupo controle positivo (ansiolítico) (ratos extras selecionados além daqueles grupos pré-definidos) tratados com diazepam intraperitoneal (1 mg/kg) 30 minutos antes do teste comportamental (*Plus Maze*) para induzir atividade ansiolítica.

Teste *Open Field*

A arena do teste *Open Field* destina-se a quantificar a atividade locomotora espontânea geral. Para tanto, foi usada uma arena preta (60 × 60 × 30 cm) dividida em 16 quadrados. Os animais foram posicionados no canto posterior esquerdo e monitorados para analisar o perfil exploratório por cinco minutos. Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de deslocamentos (quando o animal coloca as quatro patas em qualquer um dos quadrados, quantificados como cruzamentos externos os quadrantes próximos às bordas da caixa e os quadrantes internos posicionados no centro do aparelho; esse parâmetro está associado à atividade locomotora); latência para deixar o primeiro quadrante (associado à ansiedade); número de elevações (o número de vezes em que o animal se levanta apoiado nas patas traseiras); tempo de limpeza (tempo gasto na limpeza). A cada troca de animais, a arena era limpa.^{20,21}

Plus Maze

Este teste é usado para avaliar a ansiedade. O equipamento usado é um labirinto de madeira, em forma de cruz, com um quadrado central (12 × 12 cm) e cada um dos quatro braços mede 50 cm de comprimento por 10 cm de largura. Os animais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para o braço fechado. Os comportamentos foram registrados durante os 5 minutos de exposição e os parâmetros avaliados foram: tempo de permanência nos braços abertos e fechados, número de entradas nos braços abertos e fechados, número de movimentos de inclinação da cabeça (quando o animal faz um movimento semelhante ao mergulho para observar a superfície) e o tempo gasto no centro do aparelho.^{22,23}

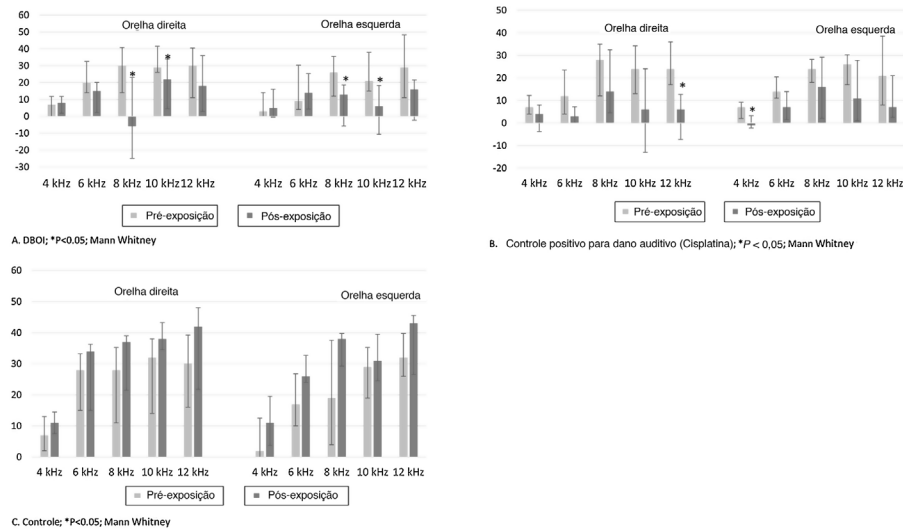


Figura 1 Medianas e intervalos interquartis de amplitudes de EOAPD pré e pós-exposição ao DBOI, cisplatina (controle positivo para dano auditivo) e água (controle).

Eutanásia

No fim do protocolo experimental (24 horas após a última exposição por inalação ou tratamento com cisplatina), a eutanásia foi feita com anestesia prévia com tiopental de sódio administrado por via intraperitoneal (40 mg /kg) associado à lidocaína (10 mg/mL). Sob anestesia, o rato recebeu uma incisão no abdômen e o sangue foi coletado da veia cava caudal e transferido para um tubo contendo EDTA, centrifugado e o plasma colocado em tubo Eppendorf e congelado até a análise. Os animais tiveram seus órgãos (fígado, rins, baço, coração e pulmões) removidos e inspecionados em relação a alterações macroscópicas. O plasma dos ratos foi usado para a determinação da atividade da colinesterase plasmática por um ensaio enzimático cinético.

Estatística

Os dados das EOAPD foram apresentados como mediana e intervalo interquartil e a comparação entre os grupos foi feita com os testes de Mann-Whitney (avaliação pós-exposição em relação à pré-exposição de cada grupo) e Kruskal-Wallis (comparação das variações entre os grupos), seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Os dados paramétricos foram apresentados como média e erro-padrão da média e as variáveis com distribuição normal foram avaliadas pelo teste *t* de Student (massa corporal relativa e atividade da colinesterase). Todos os testes consideraram um intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas foram feitas pelo Statistics Software Package (SPSS versão 25.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Resultados

A exposição ao DBOI reduziu significativamente as EOAPD pós-exposição ($p < 0,05$; teste de Mann-Whitney) em comparação com as medidas pré-exposição (fig. 1) nas frequências 8 e 10 kHz em ambas as orelhas ($p = 0,034$

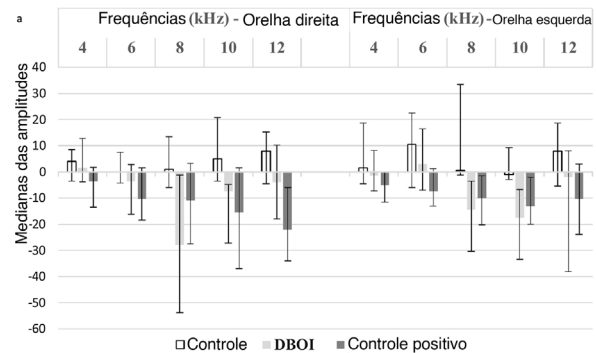


Figura 2 Variação das amplitudes (mediana e intervalos interquartis) entre o período pré- e pós-exposição para os grupos controle (água), controle positivo e DBOI.

e 0,045 na orelha direita e $p = 0,015$ e 0,013 na orelha esquerda, respectivamente). Além disso, o tratamento com cisplatina reduziu significativamente as EOAPD (fig. 1) nas frequências de 12 kHz ($p = 0,006$) na orelha direita e 4 kHz na orelha esquerda ($p = 0,032$). O grupo controle não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney) nas avaliações pós-exposição em relação à pré-exposição (fig. 1), confirmou-se a padronização do modelo experimental. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis) em relação à variação das medianas pós e pré-exposição (fig. 2).

De acordo com o valor de p apresentado na tabela 1, o grupo DBOI apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) do grupo controle na frequência de 8 kHz na orelha direita e nas frequências de 8 kHz e 10 kHz na orelha esquerda. Embora na frequência de 10 kHz na orelha direita a análise tenha demonstrado diferença entre os grupos ($p = 0,026$, Kruskal-Wallis), a comparação das médias não identificou quais grupos diferiram dos demais. O grupo cisplatina apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle na frequência de 8 kHz na orelha esquerda e em relação

Tabela 1 Testes de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn

Orelha	Frequência	Kruskal-Wallis	Post hoc de Dunn		
			Controle × DBOI	Controle × Cisplatina	Cisplatina × DBOI
Direita	4 kHz	$p = 0,109$			
	6 kHz	$p = 0,199$			
	8 kHz	$p = 0,045$	$p = 0,040$		
	10 kHz	$p = 0,026$	$p = 0,053$	$p = 0,063$	$p = 1,000$
	12 kHz	$p = 0,017$			$p = 0,014$
Esquerda	4 kHz	$p = 0,183$			
	6 kHz	$p = 0,146$			
	8 kHz	$p = 0,004$	$p = 0,005$	$p = 0,039$	
	10 kHz	$p = 0,014$	$p = 0,013$		
	12 Hz	$p = 0,136$			

ao grupo DBOI na frequência de 12 kHz na orelha direita (tabela 1).

O ganho de massa corporal relativo (média $\pm$ erro-padrão) no período foi semelhante ($p = 0,328$; teste *t* de Student) entre os grupos controle ($145,3 \pm 5,93\%$) e o DBOI ($154,1 \pm 5,91\%$). Entretanto, os animais de ambos os grupos apresentaram sinais clínicos transitórios, como piloereção e dispneia. Os sinais clínicos (fig. 3) foram mais evidentes no início da exposição (entre 30 e 240 minutos) e nas duas primeiras semanas, mas apenas os animais expostos ao DBOI apresentaram depressão transitória (evidenciada por sonolência e diminuição da resposta a estímulos) que durou até a quarta semana.

Ao analisar os comportamentos no teste *Open Field*, os animais expostos ao com DBOI não diferiram do controle em nenhuma das características analisadas (latência para se mover do primeiro quadrante ($p = 0,765$; teste T de amostras independentes), cruzamento externo ($p = 0,299$; teste T de amostras independentes), cruzamentos internos ($p = 0,569$; teste T de amostras independentes), elevação nas patas traseiras ($p = 0,370$; teste T de amostras independentes), limpeza ($p = 0,145$; teste T de amostras independentes). Esses resultados explicam que a atividade locomotora espontânea foi normal e que o tratamento não causou danos aos animais.

O teste *Plus Maze* (fig. 4) mostra que os animais tratados com controle positivo (Diazepam) passaram mais tempo no braço aberto ($p < 0,001$ Anova one-way, *post-hoc* de Bonferroni). Os animais tratados com controle positivo ficaram menos tempo no braço fechado, mas os animais tratados com DBOI não diferiram do controle positivo ($p < 0,01$ Anova one-way, *post-hoc* de Bonferroni). O tempo gasto no centro do aparelho não mostrou diferença entre os grupos ($p = 0,112$; Anova one-way, *post hoc* de Bonferroni). A inclinação da cabeça demonstra novamente a ação ansiolítica do controle positivo ($p < 0,05$; Anova one-way, *post hoc* de Bonferroni) e nenhuma diferença entre os grupos DBOI e controle positivo ($p > 0,05$; Anova one-way, *post hoc* de Bonferroni).

Os valores da colinesterase plasmática foram semelhantes (média $\pm$ erro-padrão: controle = $5958,0 \pm 145,0$ U/L; DBOI = $5886,0 \pm 112,9$ U/L, respectivamente, $p = 0,735$; teste *t* de Student). Não foram encontradas alterações

macroscópicas nos órgãos dos animais usados no protocolo experimental.

Discussão

O presente estudo demonstrou a ototoxicidade induzida pela exposição subcrônica inalatória do produto organofosforado DBOI em ratos, que foi comparável ao dano coclear induzido por cisplatina. O protocolo de avaliação da ototoxicidade usado neste estudo foi consistente, se considerarmos que todos os grupos controle (positivos e negativos) demonstraram os comportamentos esperados. A escolha dos ratos como modelo experimental para o teste de EOAPD do protocolo é consistente com dados da literature, na qual se verificou que a EOAPD foi a avaliação auditiva mais frequentemente usada nos estudos analisados que usaram modelos animais, como ratos.²⁴

O uso de um modelo animal no presente estudo permitiu identificar o desfecho investigado (ototoxicidade resultante da exposição a pesticidas por inalação), controlar possíveis vieses (exposição concomitante ao ruído). Além disso, a via de inalação em uma câmara acusticamente isolada, com uma frequência de exposição alternada que imita o dia útil (5: 2 dias), nos permitiu considerar que os efeitos observados aqui em ratos podem ser comparáveis aos relatados na literatura que envolveram agricultores.^{3,4,6}

Além disso, estudos que avaliaram a função coclear por emissões otoacústicas frequentemente usavam anestésicos, o que foi relatado como uma causa provável de alterações nas respostas das EOAPD.²⁵⁻²⁷ No presente estudo, foi possível fazer as avaliações sem anestesia, devido à aclimação prévia dos animais aos instrumentos usados nas avaliações auditivas. Além disso, o achado de ototoxicidade secundária após a exposição dos ratos ao DBOI corrobora estudos anteriores que avaliaram a audição de indivíduos que tiveram contato com pesticidas.^{6,28} No entanto, estudos em humanos podem apresentar algum viés, devido à dificuldade de isolar completamente o ruído e outros fatores de confusão inerentes à história clínica, como exposição a vibrações, ocorrência de doenças congênitas como toxoplasmose, herpes e rubéola ou até presbiacusia, já que os danos à audição podem ser multifatoriais.⁷

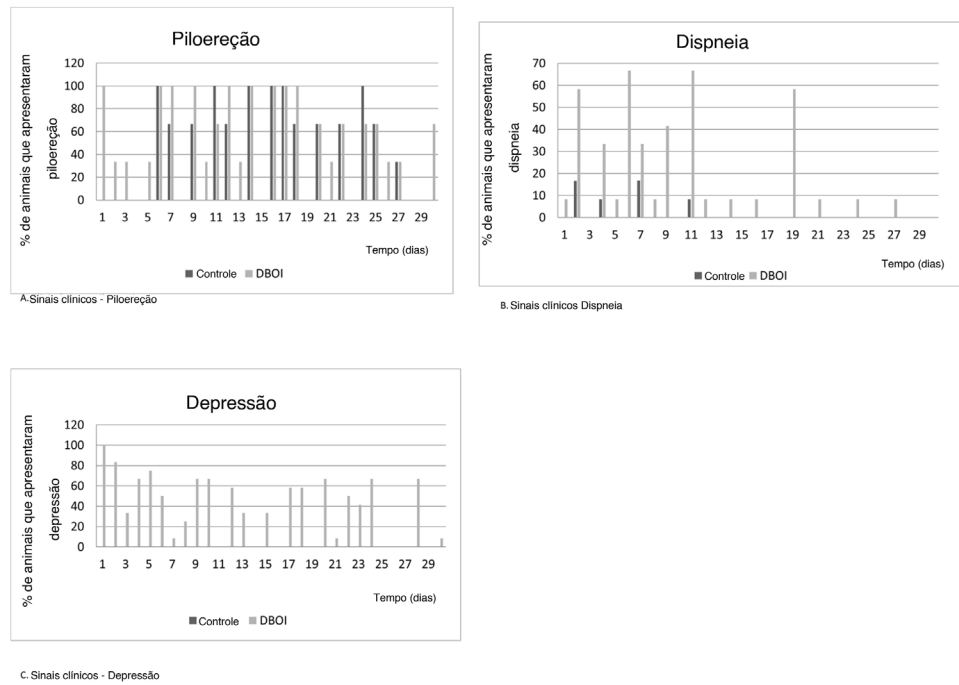


Figura 3 Sinais clínicos.

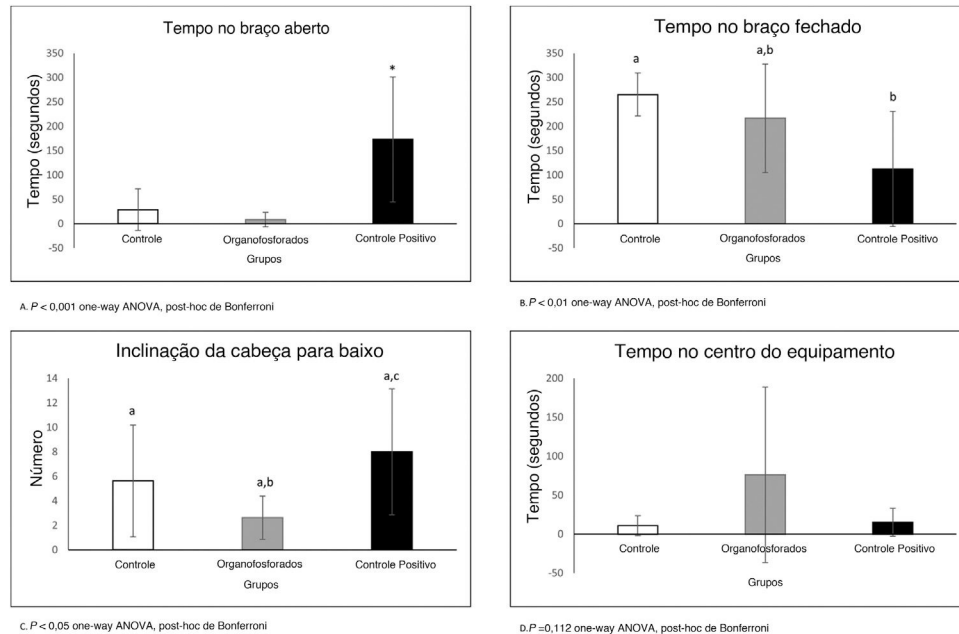


Figura 4 Teste Plus Maze.

Os resultados pós-exposição indicaram que, embora o diclorvos tenha sido um inibidor irreversível da colinesterase, a concentração da enzima no grupo experimental foi semelhante à do grupo controle. Esse fato sugere que níveis de exposição ao DBOI que não causam inibição enzimática significativa têm efeito ototóxico. Embora estudos tenham sugerido a associação entre dano auditivo e exposição a pesticidas,^{1,2,5,6,15,16} a norma regulatória atual no Brasil²⁹ (NR7) não especifica exames auditivos de referência e sequenciais para trabalhadores expostos a agentes

químicos e a exposição a pesticidas é avaliada por testes como o nível de colinesterase. Entretanto, nossos resultados indicam que – mesmo sem alteração nos níveis de colinesterase – houve ototoxicidade devido à exposição ao DBOI.

Em relação aos efeitos do tratamento subcrônico inalatório com DBOI nos testes de comportamento *Open Field* e *Plus Maze*, nesta pesquisa demonstramos que o DBOI administrado em ratos Wistar não foi uma droga ansiogênica e não teve impacto na atividade locomotora. No

entanto, com outra via de administração (oral), Silva et al. (2017) obtiveram resultados diferentes em seu estudo,³⁰ no qual ratos Wistar foram tratados com clorpirifós (0,01; 0,1; 1; e 10 mg/kg/dia) nos dias gestacionais (14-20). O comportamento da prole masculina foi avaliado nos dias 21 e 70 pós-natal pelo teste *Plus Maze* elevado e *Open Field*. Os resultados demonstraram que a exposição a 0,1; 1; ou 10 mg/kg/dia de clorpirifós podia induzir um comportamento ansiogênico, mas esse sinal foi revertido no dia pós-natal 70.

Os poucos sinais clínicos manifestados pelos animais indicaram que a toxicidade sobre a função coclear, após a exposição ao DBOI, estava presente em um nível no qual os ratos não exibiam toxicidade sistêmica relevante – como no sistema nervoso central (baseado em testes de comportamento) – mas apenas transitório. Os sinais clínicos foram mais frequentes nas primeiras horas de exposição, bem como nas primeiras semanas de exposição, sem aparecimento nas últimas duas semanas, o que sugere uma possível tolerância progressiva à mesma concentração da substância. Além disso, as alterações transitórias foram reforçadas por resultados semelhantes entre os grupos quanto ao desenvolvimento do peso.

A diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o controle positivo para lesão era esperada, uma vez que a ototoxicidade da cisplatina está bem estabelecida na literatura.^{19,31–36} Além disso, a redução da amplitude das EOAPD entre o grupo experimental e o grupo controle indicou que a exposição à substância OF realmente pode danificar a função coclear dos animais. A alteração dos valores da função coclear antes e após a exposição ao DBOI corrobora a literatura anterior, na qual foram verificadas alterações na morfologia coclear de porquinhos da Índia devido à exposição a uma substância OF (0,3 mg/kg/dia ou 3 mg/kg/dia durante sete dias consecutivos, por via intraperitoneal), com alteração na citoarquitetura das células ciliadas externas.¹⁶ Essa hipótese é reforçada pela literatura anterior.^{37,38} Ela indicou que a exposição a inseticidas pode interagir ao nível coclear.

Embora o teste de EOAPD não avalie a perda auditiva em si, a atividade das células ciliadas externas pode ser referida aqui. Destacamos que a bilateralidade dos danos em 8 e 10 kHz no grupo experimental é uma das características da perda auditiva neurosensorial secundária à exposição a substâncias ototóxicas. Além disso, as frequências afetadas em animais expostos ao DBOI são consideradas altas, o que também se assemelha à perda auditiva induzida por agente tóxico. Por outro lado, a ocorrência de perdas nas altas frequências de 8 e 10 kHz bilateralmente, mas não em 12 kHz, é intrigante e nenhum resultado semelhante foi encontrado na literatura consultada. Isso pode ser justificado pelo fato de que geralmente os estudos com EOAPD^{1,39} não consideram a frequência de 12 kHz e isso pode ocorrer devido à limitação do equipamento utilizado.

O mecanismo da perda auditiva após a exposição aos organofosforados ainda não foi totalmente elucidado.² A ototoxicidade secundária a algumas substâncias, como gentamicina e cisplatina, tem sido relacionada a possíveis alterações nas funções antioxidantes nas células sensoriais do órgão de Corti, especialmente nas células ciliadas externas, devido à peroxidação lipídica.⁴⁰

Este estudo tem potenciais limitações. Embora o teste de potencial evocado auditivo do tronco encefálico (PEATE) seja um melhor indicador da função coclear e presença de deficiência auditiva do que as EOAPD, o teste PEATE não foi feito, uma vez que o equipamento estava em um edifício inacessível aos animais. As EOAPD puderam ser feitas, uma vez que o equipamento é portátil e pode ser levado até o local onde os animais estavam alojados. Além disso, o equipamento da instituição não tinha a função de triagem do PEATE (PEATE-a). A segunda limitação é a falta de pesquisas anteriores analisando frequências como 10 kHz e 12 kHz, o que dificulta a comparação de nossos resultados com outros achados (como a diferença estatística em 8 kHz e 10 kHz no grupo DBOI, mas não a 12 kHz). Outra limitação é que a avaliação das EOAPD sem a mensuração de enzimas antioxidantes no sistema auditivo não permite afirmar que a ototoxicidade relacionada ao DBOI poderia ser causada por disfunção nas enzimas antioxidantes; entretanto, sugere que isso possa estar relacionado, pois a diminuição ou ausência de EOAPD pode indicar danos na função das células ciliadas. Para esclarecer completamente esse mecanismo, serão necessários novos estudos de pesquisa funcional, associados a métodos que avaliem as enzimas antioxidantes e a morfologia das células ciliadas, como microscopia eletrônica de varredura ou até microscopia de fluorescência.

Conclusão

O DBOI, inseticida organofosforado à base de diclorvos, causou ototoxicidade nos animais avaliados, comparável ao dano induzido pela cisplatina nas EOAPD, sem efeitos sistêmicos significativos, com perda nas frequências de 8 e 10 kHz bilateralmente.

Financiamento

O presente estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Código Financeiro 001.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A Thiago Andrei Wenzel pelos esforços e contribuições na revisão deste artigo.

Referências

1. Alcarás PAS, Larcera ABM, Marques JM. Study of Evoked Otoacoustic Emissions and suppression effect on workers exposed to pesticides and noise. *CoDAS*. 2013;25:527–33.
2. Dundar MA, Derin S, Aricigil M, Eryilmaz MA. Sudden bilateral hearing loss after organophosphate inhalation. *Turk J Emerg Med*. 2016;16:171–2.
3. Hoshino ACH, Pacheco-Ferreira H, Taguchi CK, Tomita S, de Fátima Miranda M. Ototoxicity study in workers exposed to organophosphate. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74:912–8.

4. Kós MI, Miranda MF, Guimarães RM, Meyer A. Evaluation of the auditory system of farm workers exposed to pesticides. *Rev CEFAC*. 2014;16:941–8.
5. 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;29:1491–506.
6. Teixeira CF, Augusto LGS, Morata TC. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. *Rev Saúde Pública*. 2003;37:417–23.
7. 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;71:216–23.
8. Morata TC, Little MB. Suggested guidelines for studying the combined effects of occupational exposure to noise and chemicals on hearing. *Noise Health*. 2002;4:73–87.
9. Souza JP, Nogueira GM, Mataqueiro MI, Queiroz-Neto A. Atividade colinésterásica cerebral e comportamento de ratos após exposição perinatal ao diclorvós. *Cienc Rural*. 2006;36:501–8.
10. Filho ADA, Souza SD. Anticolinésterásicos. In: Filho ADA, Campolina D, Dias MB, editors. *Toxicologia na prática clínica*. 2nd edition. Folium: Belo Horizonte; 2013. p. 89–95.
11. Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Caccone A, Evans B, Schama R, Martins AJ, et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11:e0005653.
12. Eskenazi B, Bradman A, Castorina R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect*. 1999;107:409–19.
13. Landrigan PJ, Claudio L, Markowitz SB, Berkowitz GS, Brenner BL, Romero H, et al. Pesticides and inner-city children: exposures, risks, and prevention. *Environ Health Perspect*. 1999;107:431–7.
14. Finkler AD, Silveira AF, Munaro G, Zanrosso CD. Otoproteção em cobaias expostas a agrotóxico e ginkgo biloba. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78:122–8.
15. Körbes D, Silveira AF, Hyppolito MA, Munaro G. Ototoxicidade por organofosforados: descrição dos aspectos ultraestruturais do sistema vestibulococlear de cobaias. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76:238–44.
16. Körbes D. Toxicidade de agrotóxico organofosforado no sistema auditivo periférico de cobaias: estudo anatômico e funcional. [dissertation] Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 2009.
17. Tela IA, Sagir MS. Effects of Dichlorvos Inhalation on the Kidney in Adult Wistar Rats. *J. Harmoniz. Res. Med. and Hlth. Sci*. 2016;3:180–7.
18. OECD. Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. 2009.
19. De Freitas MR, Figueiredo AA, Brito GAC, Leitao RFC, Carvalho Junior JV, Gomes Junior RM, et al. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009;75:745–52.
20. Ploeger GE, Spruijt BM, Cools AR. Effects of haloperidol on the acquisition of a spatial learning task. *Physiol Behav*. 1992;52:979–83.
21. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci*. 2005;23:93–9.
22. Almeida RN. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 154–60.
23. Knapp DJ, Breese GR. Models of Chronic Alcohol Exposure and Dependence. In: Kobeissy FH, editor. *Psychiatric Disorders: Methods and Protocols*, 829. Methods in Molecular Biology; 2012. p. 205–30.
24. Reis A, Dalmolin SP, Dallegre E. Animal models for hearing evaluations: a literature review. *Rev. CEFAC*. 2017;19:417–28.
25. Cederholm JM, Froud KE, Wong AC, Ko M, Ryan AF, Housley GD. Differential actions of isoflurane and ketamine-based anaesthetics on cochlear function in the mouse. *Hear Res*. 2012;292:71–9.
26. Doğan M, Yaşar M, Gökahmetoğlu G, Güneri E, Özcan I. Assessment of hearing via otoacoustic emission in patients that underwent spinal anesthesia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:1224–8.
27. Hatzopoulos S, Petrucci J, Laurell G, Finesso M, Martini A. 2002. Evaluation of anesthesia effects in a rat animal model using otoacoustic emission protocols. *Hear Res*. 2002;170:12–21.
28. Delecrde CR, Freitas TD, Frizzo ACF, Cardoso ACV. A prevalência do zumbido em trabalhadores expostos a ruído e organofosforados. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2012;16:328–34.
29. 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).
30. Silva JG, Boareto AC, Schreiber AK, Redivo DD, Gambeta E, Vergara F, et al. Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring rats exposed during pregnancy. *Neurosci Lett*. 2017;641:94–100.
31. Bhavsar AP, Gunaretnam EP, Li Y, Hasbullah JS, Carleton BC, Ross CJ. Pharmacogenetic variants in TPMT alter cellular responses to cisplatin in inner ear cell lines. *PLoS One*. 2017;12:e0175711.
32. 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;18:753–8.
33. Jadali A, Ying YM, Kwan KY. Activation of CHK1 in Supporting Cells Indirectly Promotes Hair Cell Survival. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:137.
34. 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.
35. 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;20:103–4.
36. Mota LAA, Melo MSI, Santos MHP, Albuquerque KMG, Tavares CL. Ototoxicidade da cisplatina: série de casos. *Rev Assoc Med Bras*. 2007;53:370–3.
37. Teixeira CF, Augusto LGS, Morata TC. Occupational exposure to insecticides and their effects on the auditory system. *Noise Health*. 2002;4:31–9.
38. Cunha EO, Reis AD, Macedo MB, Machado MS, Dallegre E. Ototoxicity of cypermethrin in Wistar rats. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020;86:587–92.
39. Ashok Murthy V, Visweswara Reddy YJ. Audiological assessment in organophosphorus compound poisoning. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;66:22–5.
40. Hyppolito M, Oliveira JA. Ototoxicidade, otoproteção e auto-defesa das células ciliadas da cóclea. *Medicina (Ribeirão Preto Online)*. 2005;38:279–89.