

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-NATAL: ESTUDO DE
TERATOGENICIDADE DO INSETICIDA PIRIPROXIFENO EM RATOS WISTAR**

AMANDA SANTOS SARTORI

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-NATAL: ESTUDO DE
TERATOGENICIDADE DO INSETICIDA PIRIPROXIFENO EM RATOS WISTAR**

Autora: Amanda Santos Sartori

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal. Especialidade Farmacologia e Terapêutica Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello

PORTO ALEGRE

2018

Sartori, Amanda Santos Avaliação da toxicidade pré-natal: estudo de teratogenicidade do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar / Amanda Santos Sartori. -- 2018. 102 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Toxicologia. 2. Teratogenia. 3. Piriproxifeno. 4. Pesticida. 5. Microcefalia. I. Mello, João Roberto Braga de, orient. II. Título.

Amanda Santos Sartori

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-NATAL: ESTUDO DE TERATOGENICIDADE
DO INSETICIDA PIRIPROXIFENO EM RATOS WISTAR

Aprovada em

APROVADA POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Ângelo Luis Stapassoli Piato
Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Helena Maria Tannhauser Barros
Membro da Comissão

Dedico aos meus pais, Helena e Darcy, pelo exemplo de vida e dedicação, e ao meu marido, Eduardo, pela paciência e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Helena e Darcy, pelo amor incondicional, incentivo e exemplo de vida, e também ao meu marido, Eduardo, pela cumplicidade e apoio em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela confiança prestada, aprendizado e apoio em todos os momentos necessários.

Meus sinceros agradecimentos à Clarissa Boemler Hollenbach, pelos ensinamentos, pela amizade e pela imprescindível colaboração na realização deste trabalho.

À Laís Hartmann Jardim, pela importante ajuda na execução do experimento e por partilhar o conhecimento, o trabalho e as dificuldades que surgiam em nossos caminhos.

À Fernanda Bastos de Mello por transmitir valiosos ensinamentos em um dos momentos mais importantes e delicados do experimento.

Agradeço às colegas de laboratório, Luciana e Andrea, e a todos estagiários que contribuíram para que o trabalho fosse executado da melhor maneira possível, Rafaela, Lucas, Muriel, Andréia e Paula. Meu agradecimento especial à Priscila, que se mostrou sempre disponível e comprometida, transmitindo sua importante experiência no laboratório.

Meu agradecimento especial à Liliane, amiga e colega de trabalho, por sempre se mostrar disposta a ajudar e pela importante contribuição farmacêutica na realização desta pesquisa. Agradeço também à Renata, pela ajuda na formatação da dissertação.

Aos bioteristas do ICBS que, com carinho e dedicação, cuidaram diariamente dos animais, sempre em busca do melhor.

Aos professores e colaboradores do PPGCV e do Departamento de Farmacologia da UFRGS, pela atenção e auxílio em todos os momentos necessários.

RESUMO

O piriproxifeno é um pesticida análogo ao hormônio juvenil de insetos. A molécula age mimetizando o hormônio regulador de crescimento, impedindo que os insetos atinjam a maturidade ao interromper o desenvolvimento larval, o que resulta em sua morte. Recomendado pela Organização Mundial da Saúde para uso em água potável no controle da dengue, o piriproxifeno foi definido pelo Governo Brasileiro no ano de 2014, como uma das formas de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti*, após a detecção de populações de mosquitos resistentes aos inseticidas comumente utilizados no país. Contudo, o inseticida foi apontado como uma das possíveis causas da epidemia de microcefalia no Brasil ao final do ano de 2015. Considerando-se os escassos dados disponíveis sobre a toxicidade do piriproxifeno e a sua possível relação com o aumento da incidência de microcefalia em recém-nascidos, este estudo investigou a toxicidade reprodutiva do inseticida em ratos Wistar, avaliando seus efeitos no desenvolvimento fetal da progênie, bem como a presença de malformações externas e alterações esqueléticas nos animais expostos durante a fase da organogênese. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: 1P (piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹), 3P (piriproxifeno 300 mg.kg⁻¹), 5P (piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹) e CN (controle negativo). As fêmeas foram tratadas por gavagem, com auxílio de sonda orogástrica, do 6º ao 15º dia de gestação, conforme segmento II, recomendados pela Organization for Economic Cooperation and Development (2001) e Food and Drug Administration (1994). Durante a gestação, as progenitoras foram monitoradas quanto às alterações de massa corporal relativa, consumo de água e ração. No 21º dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas para avaliação reprodutiva, teratogênica e de variáveis sistêmicas. Os fetos foram avaliados quanto à embriotoxicidade e à presença de malformações externas e alterações esqueléticas. Os resultados demonstraram que a administração do piriproxifeno não provocou toxicidade materna sistêmica, uma vez que não foi evidenciada alteração no consumo de água e ração, nem no peso dos órgãos. Além disso, não foi detectada presença de diarreia, piloereção, tremores, hemorragia ou outras alterações sistêmicas. O inseticida também não causou perdas nos índices reprodutivos, como no número de fetos por progenitora e perdas pós-implantação. A administração do piriproxifeno pode ter determinado aumento na média da massa corporal dos fetos, na maior dose testada (500 mg.kg⁻¹), contudo, não demonstrou interferência nos demais índices fetais. Não foram detectadas alterações teratogênicas, nem malformações externas nos fetos avaliados, no entanto, pode-se perceber que os animais expostos ao inseticida apresentaram aumento significativo de alterações esqueléticas sugestivas de retardo de desenvolvimento, especialmente nas doses mais altas testadas (300 mg.kg⁻¹ e 500 mg.kg⁻¹). Diante dos resultados encontrados, conclui-se que a administração do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar possa interferir na gestação de fêmeas tratadas no período organogênico, no que se refere ao desenvolvimento fetal. Por fim, diante da situação complexa de risco para a saúde humana, mostra-se importante a execução de investigações adicionais por meio de estudos em outras espécies animais, juntamente com estudos epidemiológicos, de forma a contribuir com a adequada avaliação de risco para o uso do piriproxifeno em água potável.

Palavras chave: Desenvolvimento Fetal. Microcefalia. Pesticida. Piriproxifeno. Teratogenia. Toxicologia.

ABSTRACT

*Pyriproxyfen is a pesticide analogous to the juvenile hormone of insects. The molecule acts mimicking the growth regulating hormone, preventing the insects from reaching maturity by disrupting larval development, which results in their death. Recommended by the World Health Organization for use in drinking water for dengue control, pyriproxyfen was defined by the Brazilian Government in 2014 as one of the forms of focal control of larvae of the *Aedes aegypti* mosquito in the country, after the detection of populations of mosquitoes resistant to commonly used insecticides in the country. However, the insecticide was pointed out as one of the possible causes of the microcephaly epidemic in Brazil in the end of the year 2015. Considering the few data available on the toxicity of pyriproxyfen and its possible relation with the increase of the incidence of microcephaly in newborns, this study investigated the reproductive toxicity of the insecticide in Wistar rats, evaluating their effects on the fetal development of the progeny, as well as the presence of external malformations and skeletal changes in exposed animals during the organogenesis phase. The animals were divided in four experimental groups: 1P (pyriproxyfen 100 mg.kg⁻¹), 3P (pyriproxyfen 300 mg.kg⁻¹), 5P (pyriproxyfen 500 mg.kg⁻¹) and CN (negative control). The females were treated by gavage an orogastric tube, from the 6th to the 15th day of gestation, according to segment II, recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development (2001) and Food and Drug Administration (1994). During the gestation, the females were monitored for relative body mass, water and feed consumption. On the 21st day of gestation, the progenitors were euthanized for reproductive, teratogenic and systemic evaluation. Fetuses were evaluated for embryotoxicity and presence of external malformations and skeletal abnormalities. The results demonstrated that the administration of the insecticide pyriproxyfen can not induce systemic maternal toxicity, since there was no change in water and feed consumption or in the mass of the progenitor organs. In addition, diarrhea, piloerection, tremors, hemorrhage or other systemic alterations were not detected. The insecticide also did not cause losses in the reproductive indexes, such as number of fetuses per parent and losses after implantation. No external malformations were detected in the evaluated fetuses, however, it was observed that the animals exposed to the insecticide showed a significant increase in skeletal abnormalities suggestive of developmental delay and variations, especially in the highest doses tested (300 mg.kg⁻¹ and 500 mg.kg⁻¹). In view of the results found, it is concluded that the administration of the insecticide pyriproxyfen in Wistar rats can interfere in the gestation of females treated in the organogenic period, regarding fetal development. Finally, in view of the potential risk situation for human health, it is important to carry out additional studies by means of studies in other animal species, together with epidemiological studies, in order to contribute to risk assessment for the use of pyriproxyfen in drinking water.*

Key words: *Fetal development. Microcephaly. Pesticide. Pyriproxyfen. Teratogeny. Toxicology.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química do piroproxifeno.....	20
Figura 2 -	Ciclo reprodutivo de mamíferos.....	33
Figura 3 -	Ilustração apresentando o risco crescente do desenvolvimento de anomalias congênitas durante a organogênese na espécie humana.....	35
Figura 4 -	Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato...	36
Figura 5 -	Delineamento experimental.....	49
Figura 6 -	Bandeja identificada contendo duas ninhadas de progenitoras tratadas com 100 mg.kg ⁻¹ de piroproxifeno do 6° ao 15° dia de gestação.....	52
Figura 7 -	Bandeja aberta contendo filhotes de progenitoras tratadas com 100 mg.kg ⁻¹ de piroproxifeno do 6° ao 15° dia de gestação, corados com vermelho de alizarina com método de coloração adaptado por Taylor e Van Dyke (1985).....	53
Figura 8 -	Filhote de progenitora tratada com 100 mg.kg ⁻¹ de piroproxifeno, do 6° ao 15° dia de gestação, corado com vermelho de alizarina com método de coloração adaptado por Taylor e Van Dyke (1985), pronto para avaliação quanto à presença de alterações ósseas.....	54
Figura 9 -	Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com piroproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN), do 6° ao 15° dias de gestação, expressa pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22, respectivamente).....	57
Figura 10 -	Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com piroproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN), do 6° ao 15° dia de gestação, expresso pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22, respectivamente).....	59
Figura 11 -	Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com piroproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação, expresso pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22 respectivamente).....	60
Figura 12 -	Útero de progenitora tratada com 500 mg.kg ⁻¹ de piroproxifeno (5P), do 6° ao 15° dia de gestação, evidenciando perda pós-implantação indicada pela seta.....	63
Figura 13 -	Detalhe do útero de progenitora tratada com 500 mg.kg ⁻¹ de piroproxifeno (5P), do 6° ao 15° dia de gestação, evidenciando perda pós-implantação indicada pela seta.....	63

Figura 14 -	Detalhe do útero de progenitora tratada com 300 mg.kg ⁻¹ de piriproxifeno (3P), do 6° ao 15° dia de gestação, evidenciando a presença de quatro perdas pós-implantação indicadas pelas setas.....	64
Figura 15 -	Fetos diafanizados tratados e do grupo controle submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985)	67
Figura 16 -	Fetos diafanizados, tratado e do grupo controle, submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985)	68
Figura 17 -	Feto de progenitora tratada com 500 mg.kg ⁻¹ de piriproxifeno (5P), do 6° ao 15° dia de gestação, submetido à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985), com ossificação incompleta do crânio.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN), do 6° ao 15° dias de gestação.....	58
Tabela 2 -	Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° de gestação.....	59
Tabela 3 -	Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação.....	61
Tabela 4 -	Massa relativa dos órgãos de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação.....	61
Tabela 5 -	Índices reprodutivos de progenitoras expostas a 100 mg.kg ⁻¹ de piriproxifeno (1P), 300 mg.kg ⁻¹ de piriproxifeno (3P), 500 mg.kg ⁻¹ de piriproxifeno (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN), do 6° ao 15° dia de gestação.....	62
Tabela 6 -	Índices fetais das progenitoras tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação.....	65
Tabela 7 -	Ocorrência de anormalidades nos ossos da cabeça dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100mg.kg ⁻¹ (1P), 300mg.kg ⁻¹ (3P), 500mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação.....	66
Tabela 8 -	Ocorrência de anormalidades nos ossos da região cervical, tórax, lombar e pelve dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ de (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação.....	70
Tabela 9 -	Ocorrência de anormalidades nos ossos dos membros torácicos e pélvicos dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg ⁻¹ (1P), 300 mg.kg ⁻¹ (3P), 500 mg.kg ⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg ⁻¹) (CN), do 6° ao 15° dia de gestação.....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Contexto histórico	16
3.2	Piriproxifeno	19
3.2.1	Mecanismo de ação do piriproxifeno	20
3.2.2	Usos do piriproxifeno	20
3.2.3	Toxicidade do piriproxifeno	22
3.3	Teratologia	30
3.3.1	Fatores causais.....	30
3.3.2	Períodos de sensibilidade aos teratógenos.....	33
3.3.3	Mecanismos de ação dos teratógenos.....	36
3.3.4	Interação materno-fetal	40
3.3.5	Microcefalia.....	41
3.4	Avaliação da toxicidade reprodutiva	43
3.4.1	Testes de toxicidade sobre a reprodução.....	43
4	MATERIAL E MÉTODO	47
4.1	Animais	47
4.2	Substância química	48
4.3	Delineamento experimental	48
4.4	Avaliação do ciclo estral, acasalamento e diagnóstico de gestação	49
4.5	Gestação	50
4.6	Variáveis avaliadas nas fêmeas durante a gestação	50
4.7	Eutanásia e celiotomia	51
4.7.1	Variável avaliada nas fêmeas durante a cesárea	51
4.7.2	Avaliação macroscópica dos fetos	52
4.7.3	Processo de coloração de fetos e diagnóstico de alterações ósseas.....	52
4.7.4	Variáveis avaliadas	54
4.8	Análise estatística	55
5	RESULTADOS	57
5.1	Avaliação de toxicidade materna	57
5.1.1	Massa corporal relativa.....	57
5.1.2	Consumo relativo de água	58
5.1.3	Consumo relativo de ração	60

5.1.4	Massa relativa dos órgãos.....	61
5.2	Avaliação da embriotoxicidade	64
5.2.1	Avaliação dos fetos.....	64
5.2.2	Alterações esqueléticas.....	65
6	DISCUSSÃO	72
6.1	Toxicidade materna.....	73
6.2	Toxicidade fetal.....	76
7	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por mosquitos estão entre as ameaças de saúde pública mais desafiadores em todo o mundo (ABAD-FRANCH *et al.*, 2015). Vetores urbanos são especialmente problemáticos porque podem transmitir patógenos para grandes populações de seres humanos, causando epidemias (INSTITUTE OF MEDICINE, 2008; WEAVER; REISEN, 2010).

A dengue é a doença viral transmitida por mosquitos que mais rapidamente difunde-se no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Mosquitos do gênero *Aedes* são os vetores da doença, sendo a espécie *aegypti* a mais importante na transmissão da doença. O *Aedes albopictus*, já presente nas Américas e com ampla dispersão nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (BRASIL, 2009b), é menos eficiente do que o *Aedes aegypti* na transmissão do vírus da dengue (LAMBRECHTS; SCOTT; GUBLER, 2010).

O controle da dengue na atualidade é uma atividade complexa, tendo em vista os diversos fatores externos ao setor de saúde, os quais são determinantes na manutenção e dispersão tanto da doença, quanto de seu vetor transmissor. Dentre esses fatores, destacam-se o surgimento de aglomerados urbanos, inadequadas condições de habitação, irregularidades no abastecimento de água, destinação imprópria de resíduos, o crescente trânsito de pessoas e cargas entre países, além das mudanças climáticas provocadas pelo aquecimento global (BRASIL, 2009b).

As estratégias de controle atuais do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (vetores da dengue, chikungunya e febre amarela) dependerão da capacidade das pessoas em detectar e eliminar os locais de reprodução de mosquitos dentro e em torno de residências (BRASIL, 2009b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Infelizmente, ambas as espécies procriam-se em pequenos recipientes de retenção de água que podem ser de difícil detecção, levando à baixa cobertura nos locais de reprodução em campanhas de controle, o que explica parcialmente o motivo pelo qual o desempenho de tais campanhas pode ser tão pobre (PADILLA-TORRES *et al.*, 2013). O principal recuo nas estratégias de controle de mosquitos é que criadouros são muitas vezes negligenciados e, portanto, não tratados adequadamente. O controle de mosquitos é crucial para a prevenção de infecção e desenvolvimento de doenças, particularmente quando vacinas ou drogas eficazes não estão disponíveis (ABAD-FRANCH *et al.*, 2015).

Inseticidas têm sido amplamente utilizados para o controle do vetor da dengue. Como resultado, vem sendo detectadas populações de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas em determinados países. Níveis significativos de resistência a organofosforados, piretróides,

carbamatos e organoclorados foram documentados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Diante da ocorrência de resistência, químicos alternativos têm sido requeridos de forma a melhorar o controle do *Aedes* (OHBA *et al.*, 2013).

O Ministério da Saúde estabeleceu o uso do piriproxifeno como uma das formas de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti* em 2009 e efetivamente começou a utilizá-lo no segundo semestre de 2014 (BRASIL, 2009b; REIS, 2016). O inseticida foi avaliado e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para utilização como larvicida de mosquito em água potável, especialmente para controle da dengue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; 2006b). No entanto, o uso da substância foi relacionado como uma das possíveis causas da epidemia de microcefalia ocorrida no Brasil ao final de 2015, sendo declarada Emergência em Saúde Pública pela OMS em fevereiro de 2016 (HEYMANN *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016c). À época, a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) publicou uma nota técnica questionando o Ministério da Saúde a respeito do modelo adotado para controle químico do vetor, o qual incluiu o uso do piriproxifeno, após o desenvolvimento de resistência de larvas do *Aedes* ao organofosforado temephós (REIS, 2016).

Como o piriproxifeno é um pesticida relativamente novo, poucos dados ambientais foram coletados até o momento, contudo, há um potencial de exposição direto através da água de bebida quando aplicado diretamente nos locais de armazenamento de água potável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O uso do piriproxifeno pode constituir uma situação potencialmente complexa de risco para a saúde humana, o que deve ser avaliado criteriosamente e, necessariamente, envolve investigações adicionais em torno de uma potencial contribuição do inseticida isolado, ou em combinação, com a exposição ao Zika vírus (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

Considerando-se os escassos dados disponíveis sobre a toxicidade do piriproxifeno e a sua possível relação com o desenvolvimento de microcefalia em recém-nascidos, evidencia-se a importância da realização de estudos de toxicidade reprodutiva com o uso do inseticida. Diante do relatado, optou-se por desenvolver o presente trabalho para avaliação da toxicidade pré-natal do piriproxifeno em ratos Wistar, com fins de detecção de possíveis malformações externas e alterações esqueléticas na progênie exposta durante a fase da organogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os potenciais riscos toxicológicos decorrentes do uso piroxicam, no que se refere à toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade, contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança de sua administração durante a fase da organogênese em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos da administração de três diferentes doses de piroxicam na toxicidade sistêmica de progenitoras tratadas do 6º ao 15º dia de gestação.
- b) Avaliar os efeitos do piroxicam sobre as possíveis alterações no desenvolvimento fetal da progênie exposta durante a fase de organogênese.
- c) Avaliar a toxicidade de três doses diferentes de piroxicam, de modo a constatar a possibilidade de alterações esqueléticas na progênie exposta do 6º ao 15º dia de gestação.
- d) Avaliar os efeitos do piroxicam quanto à possibilidade de produzir efeitos teratogênicos e malformações externas na progênie exposta durante a organogênese.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Contexto histórico

Até a década de 1940, acreditava-se que os embriões estavam desprotegidos de agentes ambientais, como fármacos, vírus e compostos químicos por suas membranas extraembrionárias ou fetais (âmnio e córion) e pelas paredes uterinas e abdominal das mães (MOORE; PERSAUD, 2016). Contudo, a primeira epidemia humana de malformações induzidas por um agente exógeno foi relatada por Gregg em 1941, quando associou a infecção do vírus da rubéola na Áustria com a ocorrência de defeitos congênitos graves, como catarata, defeitos cardíacos e surdez, se a infecção por rubéola ocorresse durante o período crítico de desenvolvimento dos olhos, coração e orelhas (ROGERS; KAVLOCK, 2012; MOORE; PERSAUD, 2016).

Em 1960, foi registrado na Alemanha Ocidental um grande aumento de recém-nascidos com raras malformações nos membros por amelia (ausência de membros) ou graus variados de focomelia (redução dos ossos longos dos membros) em decorrência do uso do fármaco talidomida. Doenças cardíacas congênitas, anomalias oculares, intestinais e renais, e malformações auriculares externas e internas também estavam associadas. O fármaco foi utilizado em várias partes do mundo no combate à insônia, de forma a amenizar náuseas e vômitos típicos de gestação. Não apresentava nenhuma toxicidade aparente ou propriedades geradoras de dependência ao ser humano adulto ou a animais expostos a doses terapêuticas. A experiência chocante com o uso da talidomida levou à reavaliação do uso clínico amplamente difundido de outros medicamentos e à criação de entidades reguladoras de fármacos em muitos países, que desenvolveram requisitos para avaliação dos efeitos gerados durante a gestação (ROGERS; KALVLOCK, 2012; RANG *et al.*, 2016). Essas descobertas, feitas há mais de sete décadas, focalizaram a atenção do mundo para o papel dos fármacos e vírus como causas de defeitos congênitos humanos. Estima-se que de 7% a 10% dos defeitos congênitos resultem das ações prejudiciais de fármacos, vírus e toxinas ambientais (MOORE; PERSAUD, 2016).

Ao final do ano de 2015, a epidemia de microcefalia no Brasil acarretou em uma série de manifestações de severidade variável entre os recém-nascidos, incluindo malformações da cabeça, convulsões, problemas de deglutição, anormalidades auditivas e visuais, abortos espontâneos e nascimentos natimortos, sendo declarada Emergência em Saúde Pública pela OMS em fevereiro de 2016 (HEYMANN *et al.*, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). No pico da epidemia, em dezembro de 2015, foi registrado incremento de 135% nas

notificações de microcefalia ao Ministério da Saúde (PORTAL DA SAÚDE, 2017). Dentre as possíveis causas, começaram a ser investigadas a possível ligação com a infecção pelo Zika vírus (ZIKV) durante a gestação, a administração de vacinas tríplice vencidas contra sarampo, cachumba e rubéola em gestantes, além do uso do inseticida piriproxifeno para tratamento de água potável.

O Ministério da Saúde estabeleceu o uso do piriproxifeno como uma das formas de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti* em 2009 e efetivamente começou a utilizá-lo no segundo semestre de 2014 (BRASIL, 2009b; REIS, 2016). O inseticida é recomendado pela OMS para utilização como larvicida em água potável, especialmente no controle ao mosquito da dengue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; 2006b; 2010). No entanto, logo após o aumento da incidência de casos de microcefalia no País, no início de 2016, a ABRASCO publicou uma nota técnica questionando o Ministério da Saúde por desconsiderar fatores que poderiam ter influência sobre o problema e por minimizar o fato de que outras epidemias de dengue não resultaram em casos de malformações e microcefalia. A nota questionava o papel do modelo de controle químico do vetor adotado pelo Governo Brasileiro, o qual incluía o uso do inseticida piriproxifeno, após a detecção de resistência de larvas do *Aedes* ao organofosforado temephós (REIS, 2016). Como resposta, o Ministério da Saúde declarou nota informando que não havia estudos epidemiológicos correlacionado o uso do piriproxifeno com a ocorrência da microcefalia. No entanto, as suspeitas sobre a segurança do produto mantiveram-se e o fato culminou com a suspensão do seu uso no Estado do Rio Grande do Sul, em fevereiro do mesmo ano (EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO, 2016).

Concomitante ao ocorrido, a possível ligação entre a infecção pelo Zika vírus na gravidez e o aumento anormal de casos de microcefalia em recém-nascidos vem sendo objeto de ampla investigação científica e tem apresentado indícios de que realmente seja confirmada (CALVET *et al.*, 2016; CUGOLA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016; MLAKAR, *et al.*, 2016; NORONHA *et al.*, 2016; MATTAR *et al.*, 2017).

O ZIKV é um flavivírus transmitido por mosquitos e foi identificado pela primeira vez em macacos, no Uganda (país da África Oriental), em 1947, sendo posteriormente, encontrado também em humanos, em 1952. Entre os anos 1960 e 1980, foram identificadas infecções humanas na África e na Ásia. O primeiro grande surto da doença causado pela infecção por Zika foi notificada na Ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia), em 2007. No Brasil, o Ministério da Saúde notificou a associação entre a infecção pelo Zika vírus e a síndrome de *Guillain-Barré* no mês de julho de 2015 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Ao longo de 2016, estudos com uso de camundongos como modelos experimentais demonstraram que a infecção pelo Zika vírus causa restrição no crescimento intrauterino (MINER *et al.*, 2016), além de lesões e desenvolvimento anormal do cérebro dos filhotes, com a indução de morte de precursores neuronais, resultando em lesões compatíveis com microcefalia (CUGOLA *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016). Foram relatados ainda estudos com avaliação de fetos e crianças com microcefalia, que demonstraram a presença de RNA ZIKV na placenta, tecidos fetais e fluidos amnióticos, evidenciando a presença do vírus nos tecidos do cérebro, sugerindo estar relacionado com o desenvolvimento da microcefalia (CALVET *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2016; MLAKAR, *et al.*, 2016; NORONHA *et al.*, 2016; MATTAR *et al.*, 2017).

Achados semelhantes também foram encontrados em estudo utilizando macacos Rhesus adultos. Após infecção subcutânea, o vírus foi detectado no tecido nervoso periférico, múltiplos tecidos linfóides, articulações e no útero dos animais necropsiados. Notavelmente, o vírus persistiu nos tecidos neuronais, linfóides, articulares e musculares, bem como em tecidos reprodutivos masculinos e femininos. Os autores relatam que o tropismo e persistência do ZIKV nos nervos periféricos e no trato reprodutivo podem fornecer um mecanismo de subsequente neuropatogênese e ainda, de transmissão sexual (HIRSCH *et al.*, 2017).

Com base em uma revisão sistemática dos estudos disponíveis e em um consenso científico sobre a questão, a OMS concluiu que a infecção pelo Zika vírus durante a gravidez é uma causa de anormalidades cerebrais congênitas, incluindo a microcefalia. Adicionalmente, alertou a comunidade científica solicitando que intensos esforços continuassem no sentido de se investigar de forma rigorosa a ligação entre o Zika vírus e a ocorrência de vários distúrbios neurológicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

O Ministério da Saúde declarou no dia 11 de maio de 2017, o fim da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional em decorrência do Zika vírus e sua associação com a microcefalia e outras alterações neurológicas. A decisão, informada à OMS, ocorreu 18 meses após a decretação de emergência, em um momento de queda nos casos de Zika e microcefalia em todo o país (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

Entre os dias 08 de novembro de 2015 a 19 de julho de 2017, o Ministério da Saúde foi notificado de 14.258 casos suspeitos de alterações no crescimento e no desenvolvimento, possivelmente relacionadas à infecção pelo Zika vírus e outras etiologias infecciosas. Do total de casos, 6.248 (43,8%) foram descartados, 2.869 (20,1%) foram confirmados e 170 (1,2%) foram classificados como prováveis para relação com infecção congênita durante a gestação (BRASIL, 2017). Desde outubro de 2015, um total de 27 países e territórios nas Américas

relataram casos confirmados de Síndrome Congênita associada à infecção pelo Zika vírus (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Mesmo diante dos importantes indícios da ligação entre o Zika e a microcefalia, restam dúvidas quanto à possível relação com a exposição ao piriproxifeno, considerando-se que outros surtos de Zika vírus não foram relacionados a defeitos no nascimento.

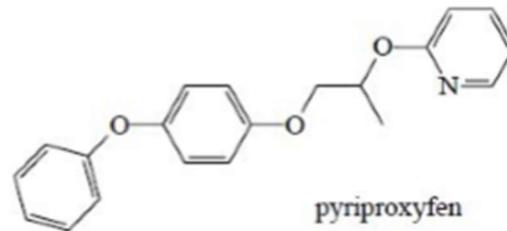
Estudo contemplou a avaliação da prevalência de Zika e a microcefalia no Brasil e na Colômbia. Considerando-se que o vírus foi disseminado pela América do Sul e América Central, havia a expectativa do subsequente aumento do número de casos de microcefalia, semelhante ao ocorrido no Brasil. No entanto, em análise aos dados disponíveis, os autores informam que não se pode confirmar a relação direta entre o Zika e a maior parte dos casos de microcefalia notificados na Colômbia, uma vez que, apesar do grande número de infecções por Zika, poucos casos de microcefalia associados ao vírus foram confirmados, o que ocorreu de forma semelhante em outros países das Américas. Além disso, apesar da elevada ocorrência em outras partes do Brasil, a região Nordeste, que apresenta população aproximada comparável à da Colômbia (50 milhões de habitantes), apresentou a maioria dos casos de microcefalia. Esta discrepância sugere a necessidade de análise de outras possíveis causas ou co-fatores, além do Zika, para ocorrência da epidemia no Brasil. O uso do piriproxifeno, apesar de ter sido insuficientemente pesquisado, tem sido amplamente divulgado como uma das possíveis causas da microcefalia, uma vez que não foi utilizado na Colômbia, diferentemente do Brasil (BAR-YAM; PARENS; MORALES, 2016).

Recente revisão da literatura relativa à segurança do uso do piriproxifeno por pesquisadores de vários países revelou escassos dados sobre o assunto, demonstrando grandes lacunas de conhecimento, o que impede a realização de avaliação de risco adequada do papel potencial do inseticida na indução da microcefalia (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

3.2 Piriproxifeno

O piriproxifeno possui como nome químico (2- [1-metil-2- (4-fenoxifenoxi) etoxi]piridina) (Figura 1) e foi primeiramente sintetizado e desenvolvido pela Sumitomo Chemical Co. Ltd. na década de 90 (SULLIVAN; GOH, 2008).

Figura 1- Estrutura química do piriproxifeno



Fonte: Swedish Toxicology Science Research Center (2016).

3.2.1 Mecanismo de ação do piriproxifeno

O piriproxifeno é um análogo sintético do hormônio juvenil, que promove a mudança de estádios nos insetos. A molécula age mimetizando esse hormônio regulador de crescimento, impedindo que os insetos atinjam a maturidade ao interromper o desenvolvimento larval, resultando em sua morte (SARTOR; SANTAREM, 2006).

O hormônio juvenil é secretado por glândulas endócrinas, a *corpora allata* (CA), e regula a metamorfose dos insetos (GOODMAN; GRANGER, 2005). As aplicações do piriproxifeno causam desbalanço dos níveis do hormônio juvenil no inseto, resultando em forte supressão da embriogênese, metamorfose, formação do adulto e esterilidade em vários insetos pragas (LIU, 2003; ABO-ELGHAR; FUJIYOSHI; MATSUMURA, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Apresenta atividade ovicida e larvicida (WISMER; MEANS, 2012).

3.2.2 Usos do piriproxifeno

O piriproxifeno tem sido utilizado contra uma série de artrópodes desde a sua introdução para o mercado agroquímico, no início da década de 1990 (SIHUINCHA *et al.*, 2005). Possui atividade inseticida contra moscas domésticas, baratas e mosquitos, apresentando inibição de mais de 95% do surgimento de mosquitos (SULLIVAN; GOH, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Trata-se de um larvicida altamente eficaz, com potencial para atuar como excelente intervenção contra a dengue e outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* (SIHUINCHA *et al.*, 2005). O inseticida possui baixa toxicidade para mamíferos e é recomendado pela OMS para o tratamento de água potável contra o mosquito (SULLIVAN;

GOH, 2008). No ano de 2006, foi um dos quatro inseticidas, juntamente com o temefos, o metopreno e a permetrina, além do larvicida bacteriano *Bacillus thuringiensis israelensis*, recomendados pela Organização Mundial da Saúde para ser adicionado à água de bebida, especialmente para o controle da dengue, na concentração de até 0,01 mg.l⁻¹ (0,01 ppm) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; 2006b). O *WHO Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES), organização internacional que executa avaliações de pesticidas para uso em saúde pública, listou compostos larvicidas, entre eles o piriproxifeno (diflubenzuron, metopreno, novaluron, pirimiphos metil, piriproxifeno, spinosad, temephós e *Bacillus thuringiensis israelensis*), para o controle de mosquitos em locais de armazenamento de água. O uso de pesticidas para controle de vetores em água potável deve seguir rigorosamente as indicações aprovadas pelas autoridades nacionais, o que deve estar claramente apresentado nas respectivas embalagens. As doenças transmitidas por vetores são causas importantes de morbidade e mortalidade; portanto, mostra-se importante alcançar equilíbrio adequado entre a ingestão de pesticidas a partir da água potável e o controle de insetos transmissores de doenças. Ressalta-se que todo esforço deve ser feito de forma a manter a exposição global e a concentração de qualquer larvicida não superior à recomendada pelo WHOPES e tão baixa quanto possível considerando-se a eficácia do produto. Contudo, o uso de larvicidas deve ser apenas uma parte de um amplo plano de gestão de resíduos e de armazenamento doméstico de água, o qual não se restringe exclusivamente à aplicação de inseticidas, mas abrange outras medidas de gestão ambiental e mudança de comportamento social (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

No Brasil, o Ministério da Saúde incluiu o piriproxifeno como uma das alternativas no controle focal de formas imaturas do mosquito *Aedes aegypti*, para prevenção e controle da dengue, em 2009. Os depósitos de água que oferecessem condições favoráveis à oviposição do vetor, sem possibilidade de controle mecânico (destruição, vedação ou destinação adequada), deveriam ser tratados com os larvicidas indicados. A aquisição de inseticidas para uso em saúde pública é de responsabilidade do Ministério da Saúde e está sustentada em uma política de gestão de insumos estratégicos, conforme determinação da Portaria Ministério da Saúde/Gabinete do Ministro nº 1.172, de 17 de junho de 2004 (BRASIL, 2004). A licitação feita pelo Fundo Rotatório da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) – Organização Mundial da Saúde, para aquisições de praguicidas (adulticidas e larvicidas) referente ao biênio 2013/2014, apontou como produto mais econômico o larvicida piriproxifeno (Sumilarv®), fabricado pela empresa Sumitomo Chemical Co. Ltd., sendo este, portanto, o larvicida adquirido para uso no País (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

O seu aspecto inovador é que pode ser carregado em doses eficazes pelo próprio mosquito para o local de desenvolvimento larval. A distribuição bem sucedida do produto pelos próprios mosquitos fêmeas supera o desafio de tratar cada local com acúmulo de água que possa produzir vetores (ABAD-FRANCH; ZAMORA-PEREA; LUZ, 2017).

Estudo avaliou a ação do piriproxifeno em habitat de larvas aquáticas, como uma alternativa promissora para controle de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na cidade de Manacapuru, com 60.000 habitantes, no Brasil Amazônico. Foram amostrados mosquitos juvenis mensalmente em 100 habitações da cidade, em quatro períodos, de fevereiro de 2014 a janeiro de 2016, sendo estimado o efeito de intervenção sobre a captura de mosquitos juvenis e a emergência de adultos. Após a disseminação do piriproxifeno, a captura juvenil reduziu 79 a 92% e a mortalidade juvenil aumentou de 2 a 7% para 80 a 90%, demonstrando que o piriproxifeno apresenta potencial para bloquear a transmissão de vírus por mosquitos em toda a cidade, mesmo em cenários adversos, segundo os autores. O estudo sinaliza novas vias para a prevenção de doenças transmitidas por mosquitos *Aedes*, como o controle de epidemias de Dengue, Zika e Chikungunya (ABAD-FRANCH; ZAMORA-PEREA; LUZ, 2017).

O piriproxifeno é também eficaz contra outros insetos com importância em saúde pública, como baratas e moscas, especialmente quando aplicado em locais de reprodução de moscas domésticas (SULLIVAN; GOH, 2008). O ativo é utilizado ainda em aplicações tópicas para o controle de pulgas e infestação por carrapatos em cães e gatos (MICHAEL, 2005). Há relatos que proteja gatos da recorrência de infestação por pulgas durante seis meses (MAYNARD; HOUFFSCHMITT; LEBREUX, 2001). No entanto, não age diretamente sobre pulgas e carrapatos adultos, uma vez que sua ação é de inibição do desenvolvimento larval e na maturação dos parasitas (MEOLA *et al.*, 2000), por tratar-se de um potente agonista do hormônio juvenil e disruptor endócrino (SULLIVAN; GOH, 2008). Na agricultura e horticultura, o piriproxifeno tem seu uso registrado para o controle de mosca branca, pulgões e lagartas (SULLIVAN; GOH, 2008).

No Brasil, além do uso como larvicida na água de bebida, o piriproxifeno é utilizado em formulações comerciais no controle de pulgas e carrapatos em cães e gatos, no ambiente doméstico e na agricultura, como agrotóxico.

3.2.3 Toxicidade do piriproxifeno

O grupo científico de especialistas internacionais administrado conjuntamente pela Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e pela OMS, responsável

por conduzir avaliações de risco de pesticidas para fins regulatórios (*Joint Meeting on Pesticides Residues* - JMPR) estabeleceu a ingestão diária aceitável (IDA) de 0-0,1 mg.kg⁻¹ de peso corporal para o piriproxifeno, com base em uma classificação geral da NOAEL (menor dose sem efeito toxicológico detectável) de 10 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, considerando-se o aumento do peso relativo do fígado e aumento da concentração total de colesterol no plasma de cães machos em dois estudos de toxicidade realizados durante 1 ano, utilizando um fator de segurança 100 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; 2011).

Ao se estabelecer diretrizes ou padrões locais de referência para o uso do piriproxifeno na água potável, as autoridades de saúde devem levar em consideração o potencial das maiores taxas de consumo de água na área ou região considerada. Contudo, exceder a IDA não resultará necessariamente em efeitos adversos. A concentração máxima recomendada é de 0,01 mg.l⁻¹, equivalente a menos do que 1% do limite superior da IDA atribuída à água potável ingerida por um adulto 60 kg (2 litros de água ao dia). Para uma criança de 10 kg, na ingestão de 1 litro de água, a exposição seria de 0,01 mg, em comparação com uma exposição de 1 mg no limite superior da IDA. Para uma criança de 5 kg alimentada com mamadeira na quantidade de 0,75 litros ao dia, a exposição seria de 0,0075 mg, em comparação com uma exposição de 0,5 mg no limite superior da IDA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; 2011).

Após revisão da literatura científica disponível sobre os dados toxicológicos do inseticida para avaliação da segurança do seu uso na água de bebida, a Organização Mundial da Saúde elaborou o documento *Pyriproxyfen on drinkind-water: use for vector control in drinking-water sources and container* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), o qual contempla as seguintes informações e resultados de estudos relativos ao piriproxifeno:

Após administração oral em ratos, o piriproxifeno é lentamente (tempo até o pico de concentração no plasma, 8 horas) e incompletamente absorvido (\leq 50 % da dose), mas é rapidamente eliminado, predominantemente nas fezes (90%), com apenas 4-11% na urina, após 48 horas. O metabolismo da substância é qualitativamente semelhante em ratos, camundongos, cabras em lactação e galinhas poedeiras.

Com base em estudos de toxicidade realizados em camundongos, ratos e cães, o fígado foi o principal alvo, com aumento do peso do órgão e alterações nas concentrações de lipídeos plasmáticos, em especial o colesterol, em doses iguais ou superiores a 120 mg.kg⁻¹ por dia em ratos. Há evidências que o inseticida possa causar modesta anemia em camundongos, ratos e cães em altas doses.

A toxicidade oral aguda do piriproxifeno apresenta valores de DL 50 (dose letal mediana - dose necessária para causar a morte 50% da população) superiores a 5000 mg.kg⁻¹ de peso em camundongos, ratos e cães, o que é considerada baixa. A toxicidade cutânea aguda também é considerada baixa, com DL 50 superior a 2000 mg.kg⁻¹ de peso corporal em camundongos e ratos. A NOAEL foi de 150 mg.kg⁻¹ por dia em camundongos, 23 mg.kg⁻¹ por dia em ratos e 100 mg.kg⁻¹ por dia em cães alimentados com piriproxifeno na dieta

durante 3 meses.

O piroproxifeno é moderadamente irritante para o olho, mas não para pele de coelhos.

Não foi carcinogênico quando administrado na dieta, em doses até 420 mg.kg⁻¹ por dia em camundongos e em doses até 140 mg.kg⁻¹ por dia em ratos. Da mesma forma, não demonstrou nenhuma evidência de carcinogenicidade em estudo de 1 ano em cães, em doses até 1000 mg.kg⁻¹ por dia. JMPR concluiu que o piroproxifeno não representa risco cancerígeno para os seres humanos. Piroproxifeno não foi genotóxico em uma variedade de testes de mutagenicidade e citogenicidade *in vitro* e *in vivo*.

A toxicidade reprodutiva do piroproxifeno em ratos foi avaliada em estudo envolvendo o tratamento de machos e fêmeas antes e durante estágios iniciais da gestação (segmento I) e em outro, com tratamento durante o período pré-natal e lactação (segmento III). A NOAEL para toxicidade materna foi 100 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, no estudo do segmento III. A toxicidade reprodutiva foi observada apenas no estudo do segmento III, no qual houve aumento do número de partos de natimortos na geração F₀ e redução no número de implantações e na média de fetos vivos na geração F₁ na dose de 500 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia. O NOAEL de toxicidade reprodutiva foi de 300 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia. Não foi observada toxicidade reprodutiva no estudo do segmento I, com NOAEL de 1000 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, a dose mais elevada testada.

A toxicidade fetal do piroproxifeno tem sido estudada em ratos e coelhos. Em ratos, a NOAEL para toxicidade materna não foi identificada, já que foi observada redução do ganho de peso corporal com a mais baixa dose testada, 100 mg.kg⁻¹ por dia. O piroproxifeno causou leve toxicidade e não foi teratogênico.

Em estudo do segmento III em ratos, a geração F₁ foi submetida a uma série de testes de desenvolvimento de possível neurotoxicidade, incluindo índices físicos, testes de comportamento, motor e função sensorial, além da habilidade de aprendizagem. Embora tenha apresentado alguns efeitos no crescimento em doses maiores ou iguais a 300 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, não houve neurotoxicidade no desenvolvimento na dose de 500 mg.kg⁻¹ de peso corporal ao dia, a dose mais alta testada. Anomalias viscerais, como dilatação da pelve renal, foi encontrada em doses maiores ou iguais a 300 mg.kg⁻¹ de peso corporal ao dia. A NOAEL para o desenvolvimento de toxicidade foi 100 mg.kg⁻¹ de peso corporal ao dia, com base no retardo do desenvolvimento físico e anomalias viscerais em doses mais altas.

Em estudo sobre a toxicidade fetal em ratos, não foi observada evidência de retardo do crescimento ou de neurotoxicidade nas doses superiores ou iguais a 1000 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, a dose mais alta testada. Detectou-se aumento na frequência de variações esqueléticas (abertura do forame transversal na sétima vértebra cervical). A frequência de anomalias viscerais foi significativamente elevada na geração F₁, algumas semanas após o nascimento. A NOAEL para toxicidade fetal foi 300 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, com base em aumento da frequência de variações esqueléticas com anomalias viscerais na prole F₁ a 1000 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia.

Em um estudo sobre a toxicidade do desenvolvimento dos filhotes em coelhos, os sinais de toxicidade materna (aborto e parto prematuro) foram evidentes em doses superiores ou iguais a 300 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia e NOAEL de 100 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia. Não foi observada toxicidade fetal, sendo a NOAEL, 1000 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia, a maior dose testada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010, p. 2-5).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), encarregada de proteger a saúde humana e o meio ambiente, elaborou o documento *EPA-HQ-OPP-2011-1012 Pyriproxyfen. Human health risk assessment for the request to add uses on herb subgroup 19a, and the expansions of existing crop group uses to numerous crop subgroups* (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012), o qual apresenta dados toxicológicos e resultados de estudos com o uso do piriproxifeno:

Em estudo contemplando a avaliação do metabolismo em ratos, o piriproxifeno foi absorvido até 12%, em análise da estimativa de excreção urinária.

Com base em estudos com doses repetidas de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães, concluiu-se que o fígado e rins são os principais órgãos alvo, com leve anemia nos roedores. Adicionalmente, redução do peso corporal, do ganho de peso e/ou do consumo de alimentos foram achados comuns nos estudos avaliados.

Estudo de toxicidade subcrônica com administração oral de piriproxifeno, nas doses de 0, 100, 300 ou 1000 mg.kg⁻¹ por dia, durante 90 dias em cães, evidenciou a NOAEL de 100 mg.kg⁻¹ por dia e a LOAEL de 300 mg.kg⁻¹ por dia em machos e fêmeas, com base no aumento absoluto e relativo do peso do fígado e alargamento dos hepatócitos.

Não houve toxicidade sistêmica em estudo com administração dérmica do produto por 21 dias em ratos, contemplando doses de 100, 300 ou 1000 mg.kg⁻¹ por dia.

Em estudo de 28 dias de inalação, a LOAEL foi 1 mg.l⁻¹, com base na ocorrência de salivação em fêmeas e esporádica redução do ganho de peso em machos, o que não foi considerado biologicamente relevante.

Piriproxifeno possui baixa toxicidade aguda pelas vias de administração oral, dérmica, inalatória e ocular.

Estudo de imunotoxicidade demonstrou ausência de efeitos adversos no sistema imune com doses de 228, 449 ou 1139 mg.kg⁻¹ por dia na dieta por pelo menos 28 dias.

No que diz respeito à carcinogenicidade, o piriproxifeno foi classificado quimicamente como do “Grupo E” - sem evidência de carcinogenicidade para seres humanos, com base na ausência de carcinogenicidade em camundongos e ratos.

Recente revisão de estudos de neurotoxicidade aguda e subcrônica indica que o piriproxifeno não é um químico neurotóxico. Não foi observada neurotoxicidade em estudos agudos e crônicos até o limite da dose (2000 mg.kg⁻¹) e nenhuma indicação de toxicidade no sistema nervoso central ou periférico em outros estudos de toxicidade crônica e subcrônica. A salivação observada no estudo de inalação não foi detectada nos estudos de neurotoxicidade aguda ou subcrônica. Não houve alterações no peso do cérebro ou histopatologia relacionadas à exposição ao piriproxifeno.

Não há evidências de ocorrência de anomalias no sistema nervoso do feto em estudos de toxicidade pré-natal em ratos ou coelhos, com doses tóxicas maternas até 1000 mg.kg⁻¹ por dia e 300 mg.kg⁻¹ por dia, respectivamente.

Estudo de desenvolvimento pré-natal em ratos avaliou a administração de doses de 0, 100, 300 ou 1000 mg.kg⁻¹ por dia de piriproxifeno, por gavagem, e evidenciou que a NOAEL para a toxicidade materna foi 100 mg.kg⁻¹ por dia e a LOAEL 300 mg.kg⁻¹ por dia, com base na redução do peso corporal, do ganho de peso e do consumo de alimento, além do aumento do consumo de água. O NOAEL para o desenvolvimento dos filhotes foi 300 mg.kg⁻¹ por dia

e a LOAEL 1000 mg.kg⁻¹ por dia, considerando-se o aumento da incidência de variações esqueléticas no dia 21 da gestação e inespecíficas variações viscerais após 56º dia de nascimento.

Outro estudo de desenvolvimento pré-natal obteve resultados semelhantes quanto à toxicidade materna, com administração via oral, por gavagem, de doses de 0, 30, 100, 300 ou 500 mg.kg⁻¹ por dia, em ratos, obtendo-se NOAEL de 100 mg.kg⁻¹ por dia e a LOAEL, 300 mg.kg⁻¹ por dia, com base em sinais clínicos, redução do ganho de peso e do consumo de alimento. A toxicidade do desenvolvimento apresentou NOAEL de 100 mg.kg⁻¹ por dia e LOAEL, 300 mg.kg⁻¹ por dia, com base na redução do peso corporal e aumento da incidência de dilatação da pelve renal.

Relatou-se ainda mais um estudo de desenvolvimento pré-natal, com a administração via oral, por gavagem, de doses de 0, 100, 300, 500 ou 1000 mg.kg⁻¹ por dia, em ratos, que apresentou também para toxicidade materna, NOAEL de 100 mg.kg⁻¹ por dia e LOAEL de 300 mg.kg⁻¹ por dia, com base em sinais clínicos, redução do ganho de peso, aumento do consumo de água (em ambos os sexos) e do consumo de alimentos, além de alterações no peso dos órgãos. Para a toxicidade do desenvolvimento dos filhotes, obteve-se NOAEL de 1000 mg.kg⁻¹ por dia, a dose mais alta testada (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012, p. 10-34)

Por ser tratar de um disruptor endócrino, a Environmental Protection Agency (2015) elaborou documento *Endocrine Screening Program (EDSP): weight of evidence analysis of potencial interaction with estrogen, androgen and thyroid pathways - chemical: pyriproxifen*, de forma a avaliar sua capacidade em perturbar o sistema endócrino humano:

Em estudo de desenvolvimento puberal masculino, demonstrou-se evidência de anti-androgenicidade com diminuição nos níveis séricos de testosterona e diminuição no peso dos órgãos e tecidos sensíveis a andrógenos (testículos, epidídimos, vesículas seminais e próstata). Não foram observadas alterações histopatológicas nos testículos ou epidídimos. No entanto, as alterações nos níveis hormonais e no peso dos tecidos foram observadas em uma dose que também causou aumento nas enzimas hepáticas, peso do fígado e hipertrofia hepatocelular.

Outro estudo realizado de forma a avaliar os efeitos do piriproxifeno nos níveis de testosterona em ratos machos púberes, demonstrou que, com as mesmas doses que o ensaio puberal masculino, houve a diminuição nos níveis de testosterona. No entanto, neste estudo, as doses administradas resultaram em toxicidade evidente (superior a 10% de redução no peso corporal). Estas doses também resultaram na indução de enzimas hepáticas (CYP2B, CYP3A, CYP4A e UGT), peso do fígado e hipertrofia hepatocelular. Os dados disponíveis sugerem que o potencial efeito anti-androgênico no sistema reprodutor masculino observado pode ser secundário ao aumento do metabolismo da testosterona pelo fígado.

Não houve evidências da potencial interação do piriproxifeno com o estrogênio.

Em estudo de desenvolvimento puberal masculino em roedores, observaram-se alterações histológicas na tireoide, as quais consistiram em área coloidal reduzida e aumento da altura das células foliculares. Não foram observados efeitos relacionados ao tratamento no peso da tireoide ou nos níveis séricos de tiroxina (T4) ou do hormônio estimulante da tireoide (TSH) no ensaio puberal masculino ou feminino, em doses de até 1000 mg.kg⁻¹ ao dia, e não foram constatadas alterações histológicas na tiróide no ensaio puberal feminino.

Além disso, um aumento de 14% no peso da hipófise foi observado no ensaio feminino, mas não no ensaio masculino.

Outro estudo conduzido nos mesmos níveis de dose que os ensaios de desenvolvimento puberal, foi realizado de forma a investigar os potenciais efeitos do piriproxifeno na função da tireoide e do fígado em ratos machos púberes. Neste estudo, os níveis de T4 foram diminuídos em 25%, na dose de 1000 mg.kg⁻¹ ao dia.

Em estudo crônico em cães, as fêmeas apresentaram aumento não linear de 82 e 63% no peso da tireoide nas doses média e alta, mas não foram observadas alterações semelhantes nos machos. No entanto, esses efeitos foram considerados secundários à indução de enzimas hepáticas (CYP2B, CYP3A, CYP4A e UGT), aumento do peso do fígado e hipertrofia hepatocelular (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2015, p. 9-12).

Em resumo, os estudos citados pela Environmental Protection Agency (2015) não demonstraram indicações conclusivas de interação com o estrogênio, por outro lado, apresentaram evidências de interação com andrógenos e com a tireoide (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

A Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) emitiu o documento sobre o piriproxifeno *Conclusion on pesticide peer review: peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pyriproxyfen* (EUROPEAN FOOD SAFE AUTHORITY, 2009), em que informou que a toxicidade do desenvolvimento foi estudada nos ratos e coelhos e, em ambas as espécies, não foram observados efeitos teratogênicos nos animais avaliados. Adicionalmente, a Agência Europeia das Substâncias Químicas (ECHA) relatou que não foram evidenciadas alterações estruturais irreversíveis ou teratogênicas nos estudos de toxicidade do desenvolvimento realizados em ratos e coelhos, no documento intitulado *Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market - pyriproxyfen product-type 18 (insecticides, acaricides and products to control other arthropods)* (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY, 2012).

Swedish Toxicology Science Research Center (2016) relata que não há informações disponíveis sobre o metabolismo ou a capacidade do piriproxifeno em atravessar a placenta em humanos. Informações relativas à toxicidade humana são muito escassas e há apenas um relato de caso relacionado ao potencial de toxicidade reprodutiva, em que a exposição pré-natal ao piriproxifeno foi supostamente associada ao desenvolvimento de rara anomalia congênita, a extrofia de bexiga. No relato citado, foi descrita a exposição doméstica a um pesticida comercial e sua possível relação com a ocorrência de extrofia da bexiga (malformação congênita) em um recém-nascido. A gestante utilizou intensamente um *spray* de pesticida doméstico contendo piretróides (cifenotrina 0,5% e tetrametrina 0,31%) e piriproxifeno (0,01%), durante as primeiras 12 semanas de gestação, de forma a eliminar infestações de baratas em sua residência.

Foram descritos pela paciente sinais de intoxicação como, episódios recorrentes de cefaleia, desconforto geral, rinite, espirro, dispneia, dor de garganta, conjuntivite e tosse, coincidentes com a exposição ao pesticida. A gestante, dona de casa, e o marido, fumigador de frutas, haviam relatado previamente sintomas gastrointestinais associados à utilização de pesticidas ocupacionais. Detectou-se a presença de piretróides e piriproxifeno em amostra de urina da criança obtida aos 4 meses de idade. Não foram identificados outros fatores de risco para a ocorrência da malformação (MARTIN *et al.*, 2009).

Os efeitos do piriproxifeno sobre o neurodesenvolvimento de embrião do peixe *Zebrafish*, como um modelo de vertebrados, foram avaliados em estudo. Embriões foram tratados com veículo (etanol ou dimetilsulfóxido) e concentrações diferentes do piriproxifeno (0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,35; 1; 10 ou 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), as quais se aproximam da concentração máxima recomendada para tratamento da água potável (0,01 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ou 0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pela Organização Mundial da Saúde. Os resultados demonstraram que o piriproxifeno penetrou no córion e no tecido embrionário efetivamente em todas as concentrações testadas. No entanto, não acarretou em anomalias do desenvolvimento, como malformações do cérebro, nem quaisquer alterações significativas no número de células-tronco observadas no sistema nervoso central em desenvolvimento, embora tenha ocasionado letalidade em doses superiores a 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (DZIECIOLOWSKA *et al.*, 2017).

Estudo para avaliação da toxicidade do piriproxifeno em dieta crônica de 6 meses em ratos *Sprague-Dawley*, nas concentrações de 0, 80, 400, 2000 ou 10000 ppm, revelou redução do ganho de peso na ingesta de 10000 ppm durante o período de tratamento, acompanhado da redução do consumo alimentar e aumento do consumo hídrico durante o estágio inicial. Quanto ao peso dos órgãos, foi observado aumento do fígado (em machos alimentados com 2000 e 10000 ppm, e fêmeas com 10000 ppm), dos rins (em ambos os sexos alimentados com 10000 ppm) e tireoide (em fêmeas alimentadas com 10000 ppm) e redução na pituitária (em fêmeas alimentadas com 2000 e 10000 ppm). A avaliação histopatológica revelou hipertrofia dos hepatócitos em ambos os sexos alimentados com 10000 ppm. Conclui-se que níveis inferiores a 400 ppm (24 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para machos e 27,5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para fêmeas) não causaram efeitos em ambos os sexos (KOYAMA *et al.*, 1989).

Fêmeas da lagarta *Spodoptera litura* recém emergidas foram tratadas com diferentes concentrações de piriproxifeno, 20, 60 ou 100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, de forma a avaliar seus efeitos na reprodução. A análise da fecundidade demonstrou que as taxas de postura e período de oviposição foram progressivamente reduzidos com o aumento da dosagem de piriproxifeno. Os resultados sugerem que a aplicação tópica do produto em fêmeas recém emergidas pode

controlar de forma eficiente a reprodução da *Spodoptera litura*, representando uma alternativa na utilização de inseticidas para o controle desta importante praga agrícola (XU *et al.*, 2015).

O impacto da exposição oral ao piriproxifeno, durante 6 semanas, em formas larvais de abelhas (*Apis mellifera* L.) foi avaliado em estudo. O piriproxifeno foi testado em duas diferentes concentrações subletais, 23 ou 57 ng, as quais haviam sido previamente testadas em experimentos anteriores. As abelhas tratadas emergiram antes do que o grupo controle e a concentração mais elevada do inseticida conduziu a significativas taxas de adultos mal formados (asas danificadas ou atrofiadas). Além disso, as abelhas jovens tratadas foram mais frequentemente rejeitadas pelo restante da colônia, induzindo a um menor período de vida. Os resultados demonstram que as abelhas expostas ao piriproxifeno apresentaram menor interação social, com menos cuidados com a prole e contato com as demais abelhas ou alimentos, em comparação com as controle. Como conclusão, o estudo constatou especialmente mudanças na integração social (aceitação pelas demais abelhas e performance no comportamento social), o que pode, potencialmente, afetar o crescimento da população e o balanço da colônia (FOURRIER *et al.*, 2015).

Estudo avaliou os efeitos do piriproxifeno em concentrações de 0,1; 0,5 ou 1% na fecundidade e reprodução de rainhas da formiga-faraó (*Monomorium pharaonis*). Verificou-se que as rainhas expostas à concentração de 1% suspenderam a produção de ovos na oitava semana. Após a oitava semana, os ovários das rainhas pertencentes às colônias tratadas apresentavam-se menores do que nas colônias não tratadas e o número dos ovários foi significativamente menor em todas as rainhas das colônias tratadas. Rainhas tratadas com as mais elevadas concentrações de piriproxifeno tenderam a ter oócitos significativamente menores do que as rainhas não tratadas. A avaliação histológica dos ovários revelou que o piriproxifeno causou vacuolização nos ovários, desenvolvimento de pequenos ovos, espessamento da túnica própria e o subdesenvolvimento do epitélio folicular e das células que contribuem para o desenvolvimento do oócito. A exposição ao piriproxifeno reduziu a produção de ovos e induziu a alterações morfológicas no ovário de rainhas, sendo que os efeitos aumentaram com a elevação da concentração de piriproxifeno (TAY; LEE, 2014).

O efeito do inseticida piriproxifeno no desenvolvimento do ovário foi avaliado no caranguejo *Gecarcoidea natalis*. Os grupos experimentais foram alimentados com isca contendo 0,5% de piriproxifeno, o que afetou o desenvolvimento inicial e a histologia dos ovários. O grupo experimental apresentou ovários mais maduros e o diâmetro dos oócitos mais largos, comparados com os caranguejos dos grupos controle. O piriproxifeno pode ter estimulado o desenvolvimento precoce do ovário e induzido à síntese de proteína da gema,

mimetizando a enzima metil farnesoato e assim causando a desregulação endócrina. Diante dos resultados, os autores recomendam que o piriproxifeno não seja usado no controle de insetos invasores em ambientes onde o caranguejo *Gecarcoidea natalis* e outras espécies estejam presentes (LINTON *et al.*, 2009).

3.3 Teratologia

A teratologia pode ser definida como a ciência que estuda os defeitos induzidos durante o desenvolvimento, entre a concepção e o nascimento, ou os efeitos adversos do ambiente nos organismos em desenvolvimento, ou seja, em células germinativas, fetos e indivíduos imaturos no período pós-natal (ROGERS; KAVLOCK, 2001; BERNARDI; SPINOSA, 2017).

O termo teratogênese designa as malformações induzidas por agentes patológicos, químicos ou ambientais durante o período de desenvolvimento dos órgãos, podendo ser de natureza estrutural e/ou funcional, portanto, podem manifestar-se por um defeito físico ou bioquímico (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

As malformações são alterações estruturais permanentes que podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento ou a função de um organismo e referem-se à formação anormal ou defeituosa de tecidos e anomalias bioquímicas. Já as variações são divergências estruturais na formação de um ser que não afetam sua sobrevivência ou saúde. Tanto as malformações quanto às variações podem ser causadas pela ação direta de um agente químico (substância química) ou física (radiações) no produto da concepção ou, secundariamente, pela ação no organismo materno. Nesse sentido, deve-se considerar que existe uma unidade materno-fetal cuja interação é bilateral (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

3.3.1 Fatores causais

Um agente teratogênico é definido como qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de deficiência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência (DICKE, 1989).

Segundo Moore e Persuad (2016), as causas dos defeitos congênitos são divididas em três categorias amplas: fatores genéticos, como anormalidades cromossômicas; fatores ambientais, como fármacos/drogas e vírus; e herança multifatorial, com fatores genéticos e ambientais agindo em conjunto. Numericamente, os fatores genéticos constituem as causas mais importantes de defeitos congênitos.

Embora o embrião esteja bem protegido no útero, muitos agentes ambientais (teratógenos) podem causar alterações do desenvolvimento após exposição materna. Entre os fatores ambientais, pode-se citar os fármacos/drogas, como por exemplo, álcool, carbamazepina, cocaína, tetraciclina, varfarina; as infecções, como o vírus da hepatite B, vírus herpes simples, vírus da rubéola, vírus da varicela e o protozoário *Toxoplasma gondii*; e ainda, altos níveis de radiação ionizante (ROGERS; KALVLOCK, 2012; MOORE; PERSAUD, 2016).

Outros agentes externos apresentam grande periculosidade para o conceito devido à facilidade de serem introduzidos no organismo materno e à maneira diversa e múltipla com que podem entrar em contato com a gestante, tais como os agroquímicos, os contaminantes ambientais e os aditivos alimentares. Entretanto, mostra-se importante considerar que, dentre a imensa gama de substâncias químicas conhecidas, apenas poucas dezenas são comprovadamente teratógenas para o homem (LEMONICA, 2008).

Segundo Moore e Persaud (2016), ao considerar a possível teratogenicidade de um medicamento ou composto químico, três princípios importantes devem ser seguidos: a dose do agente químico, o genótipo (constituição genética do embrião) e os períodos críticos de desenvolvimento do conceito.

As manifestações do desenvolvimento anormal aumentam à medida que se incrementa a dose do agente, variando desde nenhum efeito, passando por danos funcionais e malformações, até a morte do conceito (SCHÜLER-FACCINI; SCHVARTZMAN; CECCHIN, 2001). Em 1972, Durham e Williams já haviam relatado que a teratogênese causada por pesticidas estava relacionada à dosagem da exposição. Entretanto, infelizmente, devido, em parte, ao período limitado de susceptibilidade ou ao longo intervalo de tempo entre a exposição e os efeitos gerados, os dados para estas relações nem sempre estão disponíveis. Dessa forma, percebe-se que há uma escassez de informações para basear a estimativa de níveis seguros para o homem.

Devido ao alto potencial recuperador dos embriões mamíferos aos mecanismos homeostáticos celulares e às defesas metabólicas maternas, a toxicidade para o desenvolvimento de mamíferos tem sido, em geral, considerada um fenômeno com limiar de dose. A pressuposição de um limiar significa que há um limite de exposição materna abaixo do qual não ocorre resposta adversa porque algum sistema de reparo ou defesa, não bem elucidado, é capaz de evitar os efeitos adversos decorrentes da exposição (ROGERS; KALVLOCK, 2012).

Existem também substâncias dotadas de baixo poder embriotóxico, que podem afetar a mãe causando-lhe a morte, sem qualquer efeito para o conceito, ou ainda, substâncias altamente embriotóxicas que, com mínima elevação da dose teratogênica, levam à letalidade do conceito (LEMONICA, 2008). Além disso, tem sido amplamente discutido se a toxicidade

embrionária/fetal pode ser secundária à toxicidade materna, o que leva à dificuldade na avaliação de risco quanto à toxicidade de drogas ou produtos químicos (CHAHOU *et al.*, 1999b).

A relação risco/benefício deve sempre prevalecer na decisão de se expor gestantes a dadas substâncias. Para a tomada de decisão sobre uma terapia medicamentosa é sempre aconselhável consultar a literatura especializada, o que poderá ser feito diretamente às fontes de consulta ou por meio dos centros de informação em medicamentos, tanto nas bases nacionais como internacionais (ANDRADE *et al.*, 2017).

No entanto, os riscos de teratogenicidade humana são desconhecidos por 90% dos tratamentos medicamentosos aprovados para comercialização nos Estados Unidos desde 1980 (ADAM; POLIFKA; FRIEDMAN, 2011). Uma das razões deste desconhecimento deve-se ao fato de que as gestantes são muitas vezes excluídas dos ensaios clínicos pré-comercialização, contudo, o uso de medicamentos por mulheres na idade reprodutiva e durante a gestação pode ser necessário, especialmente em casos de epilepsia, diabetes, hipertensão arterial grave e depressão severa. Considera-se que a medicação não deva ser descontinuada durante a gestação se os benefícios do seu uso superam os riscos; em contrapartida, medicações desnecessárias devem ser evitadas (VAN GELDER; DE JONG-VAN DEN BER; ROELEVELD, 2014; VAN GELDER *et al.*, 2014).

A utilização indiscriminada de medicamentos e a dificuldade de conciliação de prescrições para mulheres que necessitam de tratamento durante a gestação impulsionou a Agência Reguladora de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos, *Food and Drug Administration* (FDA), a categorizar os riscos no uso de medicamentos, no ano de 1979. A classificação é seguida pelo Brasil e abrange cinco categorias:

- a) Categoria A: fármacos para os quais não foram constatados riscos para o feto em ensaios clínicos cientificamente desenhados e controlados;
- b) Categoria B: fármacos para os quais os estudos com animais de laboratório não demonstraram risco fetal ou indicaram algum risco, mas que não foram comprovados em humanos em estudos devidamente controlados;
- c) Categoria C: fármacos para os quais os estudos em animais de laboratório revelaram efeitos adversos ao feto, mas não existem estudos adequados disponíveis em humanos;
- d) Categoria D: fármacos para os quais a experiência de uso durante a gravidez mostrou associação com o aparecimento de malformações, mas que a relação risco/benefício pode ser avaliada;

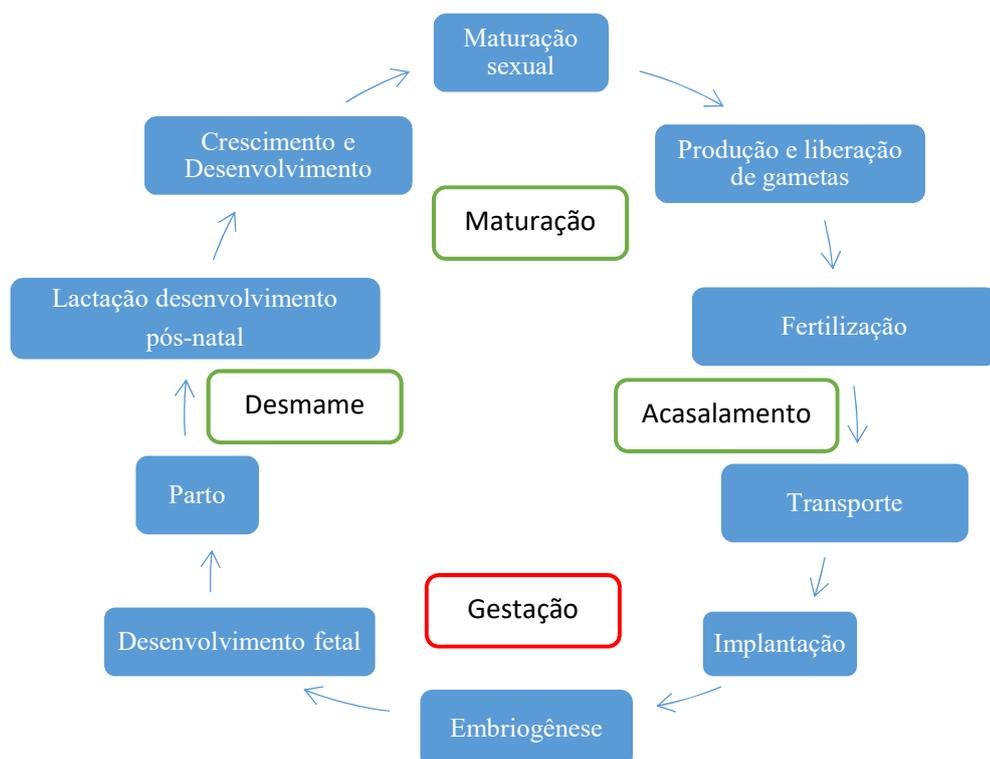
- e) Categoria X: fármacos associados com anormalidades fetais em estudos com animais e em humanos e/ou cuja relação risco/benefício contraindica seu uso na gravidez (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1979; ANDRADE *et al.*, 2017).

Apesar da classificação acima, entende-se que a avaliação se mostra imprecisa, o que, aliada à escassez de dados de segurança, torna difícil a análise da relação risco/benefício no uso de medicamentos na gravidez e lactação. Em resposta a décadas de críticas, o FDA está implementando uma nova regra de rotulagem de forma a aprimorar a avaliação da relação risco/benefício de drogas utilizadas em gestantes e lactantes, o que fornecerá informações mais detalhadas. As novas regras incluirão três categorias principais (resumo de risco, considerações clínicas e dados) e eliminarão o sistema de categorização de risco de letras (A, B, C, D, X) (RAMOZ; PATEL-SHORI, 2014).

3.3.2 Períodos de sensibilidade aos teratógenos

No ciclo reprodutivo de mamíferos, pode-se verificar que a cada fase estão relacionados vários eventos e cada uma das diferentes fases pode ser modificada pela exposição a agentes químicos (LEMONICA, 2008) (Figura 2).

Figura 2 - Ciclo reprodutivo de mamíferos



Fonte: adaptado de Lemônica (2001).

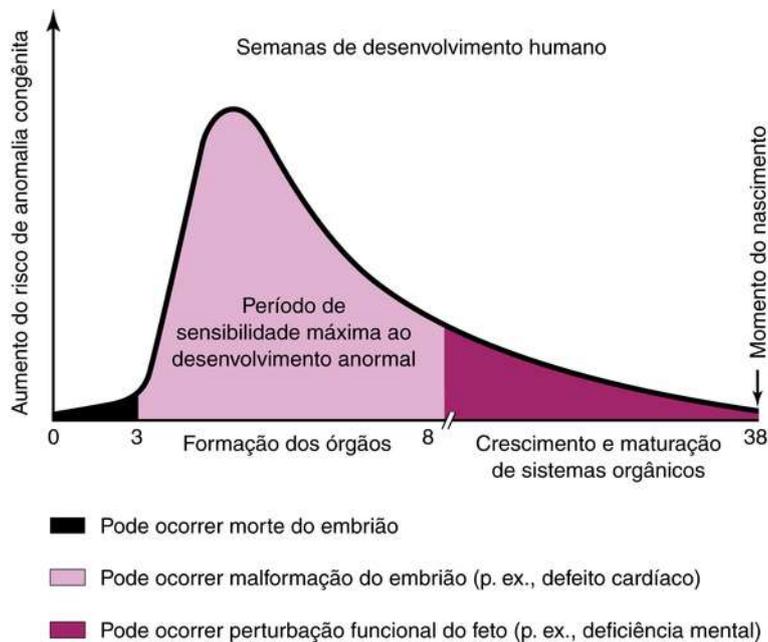
O desenvolvimento é geralmente dividido entre os períodos pré-natal (antes do parto) e pós-natal (após o parto). O desenvolvimento a partir da fecundação de um oócito até o parto é dividido em dois períodos principais, o embrionário e o fetal (RANG *et al.*, 2016). O desenvolvimento embrionário e fetal consiste em um desenrolar contínuo de mudanças e variações completas, sendo marcado por fases durante as quais se desenvolvem processos similares nas diferentes espécies de vertebrados, incluindo o homem (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

O período pré-implantação é relativamente curto, dura cerca de 24 horas, no qual o zigoto sofre clivagem ao caminhar no corno uterino, dando origem à mórula e, posteriormente, ao blastocisto. As interferências produzidas por agentes tóxicos neste período levam preferencialmente à embriofetalidade (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

O período de implantação é aquele de fixação do blastocisto no útero, que deve estar preparado para recebê-lo (BERNARDI; SPINOSA, 2017). Neste período, dependendo do número de células atingidas pelo agente teratogênico, ocorre a reposição das células atingidas por células normais e como produto final da exposição um indivíduo normal ou, se atingido em grande número de células, a embriofetalidade (LEMONICA, 2008), o que não exclui a possibilidade da ocorrência de teratogênese (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

Após implantado, o embrião inicia o período organogênético, o qual é marcado por uma série de processos definidos sequencialmente, que abrangem desde a proliferação, diferenciação e migração celular até a organogênese propriamente dita, que consiste na formação de órgãos rudimentares e está compreendida entre o 21º e o 56º dia de gestação na espécie humana e do 6º ao 15º dia no rato (ROGERS; KALVLOCK, 2012; BERNARDI; SPINOSA, 2017). Os medicamentos, quando administrados às gestantes neste período, podem levar à teratogênese, se a lesão for compatível com a vida do animal, ou à morte do feto, caso não o seja (BERNARDI; SPINOSA, 2017). A organogênese é o período em que a maioria das estruturas corporais é estabelecida e é nesta fase que os teratogênicos podem induzir defeitos congênitos importantes (Figura 3) (ROGERS; KALVLOCK, 2012; MOORE; PERSAUD, 2016).

Figura 3 - Ilustração apresentando o risco crescente do desenvolvimento de anomalias congênitas durante a organogênese na espécie humana



Fonte: Moore e Persuad (2016).

Quanto maior for o período crítico de um determinado sistema, tanto mais suscetível este será aos efeitos de um determinado agente. Por este motivo, nos testes de teratogênese, são estudadas as anomalias ósseas dos animais, já que o período de organogênese do esqueleto é bastante longo (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

Na organogênese, as anomalias observadas são ditas maiores, enquanto no período que se segue, de desenvolvimento fetal, são ditas menores, pois os órgãos já estão formados, sendo caracterizado sobretudo pela diferenciação, pelo crescimento e pela maturação fisiológica dos tecidos (ROGERS; KALVLOCK, 2012; BERNARDI; SPINOSA, 2017).

O período fetal é caracterizado pela diferenciação histológica e funcional dos diferentes órgãos e aparelhos, além de um notável crescimento ponderal do concepto. Agentes teratogênicos administrados à mãe, neste período da gestação, não levam ao aparecimento de malformações, mas podem interferir com processos de proliferação celular, que resultam em alterações funcionais de importantes sistemas, tais como sistema nervoso central, sistema imunitário ou sistema endócrino, além de causar retardo geral de desenvolvimento e possível redução da fertilidade (LEMONICA, 2008; ROGERS; KALVLOCK, 2012). Por regra, a exposição a medicamentos neste período pode produzir redução no peso corporal, distúrbios funcionais e carcinogênese. O feto é bem mais resistente aos efeitos letais do que o embrião, porém apresenta

grande suscetibilidade a agentes carconogênicos devido à alta replicação celular, à ontogenia de enzimas de biotransformação e à baixa imunocompetência (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico específico em que se encontra mais suscetível ao agente e quanto maior for este período, maior também será a suscetibilidade (BERNARDI; SPINOSA, 2017). Os períodos críticos do desenvolvimento do rato estão ilustrados na Figura 4.

Figura 4 - Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato

Dias de Gestação		Dias de Lactação
1-5	6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21	1 – 21 pós-natal
Período de Implante	Período de Organogênese	Período de Desenvolvimento Fetal
		Período Neonatal
Não suscetível à teratogênese.	Olho	
Divisão do zigoto	Cérebro	Maturação e diferenciação do cérebro
Implantação	Coração e arcos aórticos	
Formação do blastocisto	Esqueleto axial	
	Palato	
	Sistema urogenital	
Morte pré-natal	Anomalias maiores	Anomalias morfológicas menores e funcionais
		Maturação de receptores Diferenciação sexual do cérebro Formação de sistemas enzimáticos

Fonte: adaptado de Bernardi (2006).

3.3.3 Mecanismos de ação dos teratógenos

Atualmente, estão descritos determinados mecanismos de ação pelos quais os fármacos podem se agir como agentes teratogênicos, são eles: antagonismo do folato, rompimento das células da crista neural, desreguladores endócrinos dos hormônios sexuais, estresse oxidativo,

rompimento vascular e afinidade de teratógenos por receptores ou enzimas específicas (VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

O folato, termo genérico para vitamina B solúvel em água, está presente em certos alimentos naturais (frutas, vegetais verdes folhosos, feijão e fígado), como poliglutamato. A forma sintética, ácido fólico (um ácido monoglutâmico), é utilizada na fortificação alimentar e em preparações vitamínicas. O folato é convertido por meio de duas reações de redução: a primeira converte o folato em sua forma bioativa, o hidrofolato (THF), transformação realizada pela di-hidrofolato redutase (DHFR); e a segunda converte o THF em 5-metiltetrahydrofolato monoglutamato (5-MTHF). Dentro da célula, atua como uma coenzima essencial em muitas reações bioquímicas por mediar a troca de carbono em, por exemplo, síntese de purina e pirimidina e reações de metilação de DNA. Essas reações são essenciais para o crescimento e desenvolvimento fetal e requerem incremento de folato durante a gravidez. Os fármacos que atuam por antagonismo do folato consistem em inibidores competitivos da enzima DHFR e incluem metotrexato, triamtereno e trimetoprim, os quais bloqueiam a conversão de ácido fólico para THF por ligação irreversível à enzima (CARMICHAEL; YANG; SHAM, 2010; VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

Outro mecanismo trata-se do rompimento das células da crista neural. A crista neural é constituída por uma grande quantidade de células pluripotentes que se originam da fusão da placa neural com o tecido ectodérmico não neural. As células da crista neural podem ser divididas em duas populações principais: a crista neural cranial e tronco. Durante a neurulação, as células da crista neural se separam das pregas neurais e migram para o embrião para dar origem a numerosas estruturas, incluindo ossos, cartilagens, nervos e músculos. A crista neural cardíaca é uma subpopulação da crista neural cranial, que migra para o tecido cardíaco e pode ainda mediar a formação de septos e outros derivados da faringe, tais como o timo, a tireoide e as glândulas paratireoides. Defeitos na formação das glândulas da faringe, esôfago, tireoide, defeitos ósseos e malformações cranianas e cardiovasculares são geralmente atribuídos ao rompimento da crista neural. Agem por este mecanismo teratogênico todos os derivados retinóicos, tais como tretinoína, isotretinoína e o etretinato (VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

Já os desreguladores endócrinos são substâncias químicas presentes no meio ambiente, que podem interferir no sistema endócrino de humanos e animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução (BILA; DEZOTTI, 2007). Conforme a Environmental Protection Agency (1997), os desreguladores endócrinos são agentes exógenos que interferem com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo,

responsável pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos.

Mediante o amplo conceito e a influência de outros mecanismos teratogênicos subjacentes, torna-se difícil detectar e comprovar de forma experimental, em humanos, a dose e os efeitos diretos destes desreguladores, mas diversos estudos epidemiológicos e experimentais com animais apontam para associação dessas substâncias com várias anomalias ligadas, principalmente, aos fetos masculinos e na formação da genitália externa (BILA; DEZOTTI, 2007; VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017). Os ftalatos presentes nos revestimentos de fármacos como omeprazol, os hormônios sintéticos, os anticoncepcionais hormonais e os fármacos destinados ao tratamento de infertilidade estão entre os principais representantes desse grupo e aparecem relacionados a anomalias de genitália externa, hipospádia e criptorquidia (VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

Alguns efeitos citados na literatura, tais como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos, problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos, além de alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, têm sido associados à exposição de espécies de animais aos desreguladores endócrinos. Em alguns casos esses efeitos podem conduzir ao declínio da população. Em seres humanos, já foi relatada redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e de próstata, além de endometriose (BILA; DEZOTTI, 2007).

O estresse oxidativo é outro mecanismo de ação pelo qual os fármacos podem se comportar como agentes teratogênicos. A instalação do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA *et al.*, 2010). As espécies reativas de oxigênio circulantes promovem ligação covalente ou irreversível com macromoléculas de DNA, proteínas e lipídios, conduzindo à inativação de muitas enzimas e morte celular. Além de ser prejudicial para as macromoléculas, o estresse oxidativo pode afetar a expressão do gene, interferindo com a atividade de fatores de transcrição e sinal de transdução. Durante o período pré-natal, pode resultar em anomalias congênitas, retardo no crescimento e em casos graves, morte intra-uterina (BARBOSA *et al.*, 2010; VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

Já os defeitos de ruptura vascular consistem em anomalias congênitas resultantes de alterações vasculares no desenvolvimento pré-natal originalmente normal de artérias, veias e capilares. A etiologia proposta parte de dois mecanismos: um é a via extrínseca, em que se acredita na ruptura precoce do âmnio, e o outro é a via intrínseca, a qual aparece intimamente ligada à teratogenicidade dos medicamentos, em que a exposição gestacional a substâncias vasoativas, principalmente vasoconstritores, tem sido apontada como fator causal na formação de defeitos vasculares. Estudos sugerem que estes teratógenos estão relacionados com a diminuição do fluxo sanguíneo na unidade placentária uterina, na unidade placentária-fetal ou no próprio feto, interferindo tanto na estrutura quanto na anatomia de vasos sanguíneos. Esses distúrbios incluem hiperperfusão, hipoperfusão, hipoxia e obstrução. Os principais medicamentos representantes desse grupo são anti-hipertensivos, misoprostol, ácido acetilsalicílico, ergotamina e pseudoefedrina (VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

Há ainda o mecanismo de ação relacionado à afinidade de teratógenos por receptores ou enzimas específicas no corpo do indivíduo, levando a um modo particular de ação. Neste caso, os teratógenos podem ocasionar a inibição ou estimulação dos receptores ou enzimas. As principais enzimas associadas a esse efeito são: 1) perturbação do sistema renina-angiotensina fetal, produzindo hipotensão fetal, rompimento vascular e diminuição do tônus vascular renal fetal, quando da administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonistas dos receptores de angiotensina II (ARA); 2) as estatinas inibem a hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima limitante da velocidade na via que converte HMG-CoA em ácido mevalônico, podendo resultar em uma ampla gama de defeitos, desde o crescimento embrionário até a formação de estruturas; 3) a desacetilação das histonas por inibição da enzima histona desacetilase (HDACs) compromete uma grande quantidade de funções celulares, incluindo a regularidade da expressão gênica por remodelação da cromatina, a transcrição para o DNA, resultando em interrupção da proliferação celular, diferenciação e apoptose; 4) a inibição da ciclooxigenase I (COX-I) que catalisa a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas, interferindo no sistema renina-angiotensina; 5) o bloqueio do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) pode causar erros na migração de elementos neuronais e gliais no cérebro em desenvolvimento; 6) o aumento ou a supressão da estimulação de receptores da 5-hidroxitriptamina ou a inibição do transporte pode causar anomalias congênitas, e os fármacos envolvidos neste mecanismo são a buspirona e a risperidona; 7) a inibição da anidrase carbônica, podendo causar redução no pH intracelular embrionário, e os fármacos envolvidos neste mecanismo são a acetazolamida e o topiramato

(VAN GELDER *et al.*, 2010; VAN GELDER; DE JONG-VAN DEN BERG; ROELEVELD, 2014; VAN GELDER *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2017).

Importante ressaltar que alguns dos mecanismos citados são principalmente compreendidos a partir de modelos animais, uma vez que as possibilidades para a realização de experimentos durante a gravidez humana são bastante limitadas; entretanto, também podem produzir defeitos congênitos em seres humanos. Além disso, alguns fármacos podem estar envolvidos em múltiplos mecanismos para produzir defeitos congênitos. Muitos medicamentos classificados como classe X pelo FDA estão associados a pelo menos um dos mecanismos de ação citados (VAN GELDER *et al.*, 2010).

A identificação dos mecanismos teratogênicos mostra-se relevante para pesquisas etiológicas e de pós-comercialização. Além disso, pode ter implicações no desenvolvimento de novos fármacos e na avaliação da prescrição para mulheres em idade reprodutiva, especialmente porque combinações de drogas aparentemente não relacionadas podem utilizar mecanismos teratogênicos similares, o que pode elevar o risco para ocorrência de defeitos congênitos (VAN GELDER *et al.*, 2010).

3.3.4 Interação materno-fetal

A placenta possui essencialmente a função de transporte de alimentos, metabolização de substâncias endógenas, biotransformação de substâncias exógenas, atividade endócrina, manutenção da gestação, além do isolamento do embrião/feto do organismo materno de modo a evitar sua rejeição e, finalmente, proteção. A passagem de fármacos do sangue materno para o embrião/feto durante a gestação dependerá do tipo de placentação, das propriedades físico-químicas do agente e da biotransformação promovida pela placenta. Desse modo, em placentas do tipo epiteliocorial, encontrada em equinos, ruminantes e suínos, pouca ou nenhuma transferência de medicamentos ocorre do compartimento materno para o fetal, pois não existe relação íntima entre a mãe e o filhote. Por outro lado, as placentas do tipo endoteliocorial, característica de carnívoros, ou hemocorial, encontrada em primatas e roedores, o sangue materno entra em íntimo contato com o fetal, sendo, portanto, mais frequente a passagem de medicamentos da mãe para o feto por essa via (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

As substâncias endógenas ou exógenas que conseguem atravessar a placenta penetram na circulação fetal através da via umbilical e passam pelo fígado do feto antes de alcançarem o coração e a circulação sistêmica. O líquido amniótico é o mais importante reservatório de substâncias exógenas do feto, sendo também a maior via de excreção de substâncias por ele

deglutidas, as quais são filtradas pelo rim fetal, retornando ao compartimento materno através da artéria umbilical (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

3.3.5 Microcefalia

A microcefalia é uma anomalia que pode ser causada por agravos pré-natais, como infecção ou exposição a medicamentos, drogas ilícitas ou outros teratógenos (SADLER, 2013; CARLSON, 2014). Pode ser classificada como primária, de origem genética, cromossômica ou ambiental; ou secundária, quando resultante de evento danoso que atingiu o cérebro em crescimento, ao final da gestação ou nos períodos peri e pós-natal (HARRIS, 2015). A microcefalia primária é provavelmente originada por uma redução no número de neurônios formados no cérebro fetal e também pode surgir a partir do fechamento prematuro das suturas cranianas (CARLSON, 2014).

Segundo a World Health Organization (2016b), existem muitas causas potenciais da microcefalia, mas frequentemente a sua origem permanece desconhecida. As causas mais comuns incluem:

- a) Infecções durante a gravidez por: toxoplasmose, *Campylobacter pylori*, vírus da rubéola, herpes vírus, sífilis, citomegalovírus e HIV (vírus da imunodeficiência humana);
- b) Exposição a produtos químicos tóxicos: exposição materna a metais pesados como arsênico e mercúrio, álcool, radiação e tabagismo;
- c) Lesões pré e perinatais no cérebro em desenvolvimento (hipoxia-isquemia, trauma);
- d) Anormalidades genéticas como a síndrome de Down; e
- e) Desnutrição grave durante a vida fetal.

Gomes, Lloyd e Hong (2008) relataram ainda a detecção de microcefalia em decorrência da exposição oral de camundongos machos e fêmeas a diferentes formulações de pesticidas organofosforados, como o diclorvós, clorpirifós, dimetoato, triazofos, profenofós e pirimifós-metil.

A microcefalia caracteriza-se pelo subdesenvolvimento do crânio (abóboda craniana menor do que o normal) e do encéfalo (CARLSON, 2014). Por este motivo, os recém-nascidos devem ter a circunferência da cabeça mensurada nas primeiras 24 horas após o nascimento, e esta medida deve ser comparada aos padrões de crescimento da Organização Mundial da Saúde. O resultado deve ser interpretado em relação à idade gestacional e também ao peso e comprimento do recém-nascido. Para os casos suspeitos, deve-se realizar mensalmente, no

início da infância, exames de imagem cerebral e avaliação da circunferência da cabeça, os quais devem ser comparados com os padrões de crescimento. Muitos bebês com microcefalia podem também desenvolver epilepsia, paralisia cerebral, dificuldades de aprendizagem, perda auditiva e problemas de visão. Em alguns casos, crianças com microcefalia desenvolvem-se normalmente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

A microcefalia não se trata de uma doença em si, mas um sinal de destruição ou déficit do crescimento cerebral e suas sequelas dependerão da etiologia e da idade em que ocorreu o evento, sendo que, quanto mais precoce a afecção, mais graves serão as anomalias do sistema nervoso central (HARRIS, 2015). A microcefalia congênita pode cursar com diversas alterações, sendo as mais frequentes, deficiência intelectual, paralisia cerebral, epilepsia, dificuldade de deglutição, anomalias dos sistemas visual e auditivo, além de distúrbio do comportamento (transtorno de déficit de atenção com hiperatividade e autismo) (ASHWAL *et al.*, 2009).

Ao exame físico dos recém-nascidos com síndrome da infecção congênita pelo ZIKV, evidencia-se a microcefalia, geralmente grave, com importante desproporção craniofacial. Outras dismorfias, como acentuada protuberância óssea occipital, fontanelas fechadas no nascimento, excesso de pele e/ou dobras de pele no escalpo, além de hérnia umbilical são frequentemente observadas. Entre as anormalidades neurológicas observadas, destacam-se a hipertonia global grave com hiper-reflexia, irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbio de deglutição, além de respostas auditivas e visuais comprometidas. Algumas crianças apresentam crises convulsivas já no período neonatal e até um aumento da sua frequência durante o desenvolvimento, em especial a partir dos três meses de idade, sendo os espasmos epilépticos, o tipo mais comum (HEICKMANN *et al.*, 2016).

Os exames de imagem do sistema nervoso central (ultrassonografia transfontanela, tomografia e ressonância magnética) passaram a caracterizar essa nova síndrome causada pelo ZIKV, com particularidades distintas das observadas em recém-nascidos com microcefalia provocada por outras infecções congênicas, evidenciando marcantes calcificações difusas e puntiformes, predominando na junção córtico-subcortical, podendo estar presentes ainda no tronco, núcleos da base e região periventricular. Outros achados incluem comprometimento do padrão de migração neuronal, além de dilatação ventricular, atrofia cortical, atrofia de tronco ou cerebelo e disgenesias do corpo caloso (ARAGÃO *et al.*, 2016). Em uma frequência menor de pacientes, foram identificadas deformidades ósseas, em especial a artrogripose (contraturas congênicas) e pés tortos congênicos. Anormalidades oculares também já foram documentadas, sendo descritos casos de atrofia macular, além de nistagmo horizontal, alteração na retina e no nervo óptico (VENTURA *et al.*, 2016).

3.4 Avaliação da toxicidade reprodutiva

A avaliação da toxicidade reprodutiva compreende um estudo complexo. Entende-se por reprodução, o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Assim sendo, o ciclo reprodutivo não versa apenas na concepção, prenhez e nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos genitores (no período pré-natal), continuando pela fertilização e desenvolvimento embrionário, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto se torna capaz de procriar (MELLO, 2007).

A experiência com agentes químicos que têm o potencial de induzir a toxicidade ao desenvolvimento indica que ambos os ensaios, com animais de laboratório e os de vigilância da população humana (por exemplo, dados epidemiológicos), são necessários para fornecer proteção adequada à saúde pública (ROGERS; KLAVLOCK, 2012).

No Brasil, ainda são escassos os estudos para avaliação dos riscos teratogênicos potenciais aos quais a população possa estar exposta. Esses estudos seriam importantes para implementação de foco nas estratégias de prevenção no país, uma vez que a maior parte da literatura disponível sobre teratogenicidade em humanos tem sido publicada a partir de investigações em países desenvolvidos. Dessa forma, carecemos de informação científica sobre a segurança de alguns agentes aos quais a população possa estar exposta (SCHÜLER-FACCINI *et al.*, 2002).

Futuros estudos devem concentrar-se nas drogas mais comumente utilizadas durante a gestação e para as quais os riscos teratogênicos em humanos ainda são desconhecidos, mas podem estar presentes, com base em seu mecanismo teratogênico suspeito ou em dados relativos a ensaios em animais (VAN GELDER *et al.*, 2014).

3.4.1 Testes de toxicidade sobre a reprodução

Protocolos de ensaios internacionalmente aceitos dependem de investigação para atender ao objetivo principal de detectar qualquer indicação de toxicidade à reprodução. O objetivo geral desses estudos é identificar a NOAEL, que é o nível de dose máxima que não produz aumento significativo de efeitos adversos na descendência (ROGERS; KLAVLOCK, 2012).

Os principais protocolos utilizados são os emitidos pela Europa por meio da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001), pelos Estados

Unidos através da Food and Drug Administration (1994), ou ainda, pelo Canadá, Ásia e Japão (SILVA; FONSECA, 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, é o órgão responsável pelo registro de medicamentos de uso humano. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 60/2014 dispõe sobre os critérios para o registro de novos medicamentos, visando garantir sua qualidade, segurança e eficácia (BRASIL, 2014). Da mesma forma, a ANVISA é responsável pelo registro de novos saneantes desinfestantes, nos quais se enquadram os produtos destinados à aplicação em domicílios e suas áreas comuns, para controle de insetos, roedores e de outras pragas incômodas ou nocivas à saúde. A RDC nº 34/2010 dispõe sobre as exigências para registro de um novo produto (inseticida, rodenticida ou repelente), o que inclui avaliação de sua qualidade, segurança e eficácia em relação às pragas pretendidas (BRASIL, 2010). Para avaliação da segurança dos produtos citados, são necessários dados toxicológicos e a execução de uma avaliação de risco, o que contempla estudos agudos, subcrônicos e crônicos, incluindo avaliação reprodutiva, de carcinogenicidade, neurotoxicidade, metabolismo, dentre outros, e seus valores NOAEL estabelecidos, sendo aceitos estudos científicos disponíveis.

Os estudos de toxicidade reprodutiva recomendados por Organization for Economic Cooperation and Development (2001) e Food and Drug Administration (1994), abrangem três segmentos:

- a) Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva”: avaliação dos efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, sendo os machos tratados antes e durante o acasalamento e as fêmeas antes e durante o acasalamento, na gestação e lactação;
- b) Segmento II “Toxicidade pré-natal - estudo de teratogenicidade”: avaliação das possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese;
- c) Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal”: avaliação dos efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

O Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” apresenta-se de extrema relevância, uma vez que leva à identificação de agentes, como medicamentos, compostos químicos, aditivos alimentares e pesticidas que possam causar malformações durante o desenvolvimento humano. O conhecimento de que agentes podem perturbar o desenvolvimento pré-natal oferece a oportunidade de alertar gestantes sobre os perigos a seus

embriões, atuando na prevenção de alguns defeitos congênitos (MOORE; PERSAUD, 2016).

Nestes estudos, a escolha dos animais de experimentação é muito importante, pois os resultados podem variar dependendo da espécie (LEMONICA, 2008). Ratos, camundongos e coelhos reúnem diversas características que os torna animais de escolha, como: período curto de gestação, prole numerosa, útero com dois cornos nos quais os sítios de implantação têm distribuição regular, placenta do tipo hemocorial, como no ser humano. A legislação vigente recomenda que os testes de toxicidade reprodutiva e teratogenicidade sejam realizados em pelo menos duas espécies animais e, indiscutivelmente, o rato é o modelo preferencial (MELLO; LANGELOH, 2006).

Em estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar (linhagem de ratos albinos), por serem animais dóceis e por possuírem excelente desempenho reprodutivo. Os machos atingem a maturidade sexual logo após a puberdade (entre 60 e 75 dias de vida), sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva ocorre aproximadamente aos 360 dias de idade. Nas fêmeas, a maturidade sexual é atingida aos 60 e 75 dias de vida, a fertilidade máxima entre 90 e 120 dias e a senescência reprodutiva ocorre aos 360 dias (EBISUI; FONTES; LAPCHIK, 2009). Segundo Mello e Langeloh (2006), a idade inicial para machos e fêmeas nos experimentos deve ser de 120 dias, quando já atingiram a puberdade sexual. Antes do início dos experimentos, os animais devem ser adaptados às condições do laboratório de experimentação, por pelo menos, uma semana. Machos e fêmeas devem ser mantidos em caixas separadas, com cama limpa e renovada periodicamente. O número de animais a ser utilizado deve garantir entre 12 e 20 fêmeas gestantes para cada dose a ser testada. Para fins práticos, é aconselhável iniciar com grupos de 30 fêmeas por dose. A proporção de três fêmeas para cada macho é a mais usada (MELLO; LANGELOH, 2006).

Quanto à indicação para cada segmento, os fármacos e substâncias químicas de abuso devem ser avaliados nos segmentos I e II em duas espécies e, no segmento III, em pelo menos uma. As substâncias agroquímicas como pesticidas e fertilizantes, os produtos químicos de exposição ocupacional e os aditivos alimentares, corantes e antioxidantes devem, pelo menos, ser testados quanto ao segmento II em duas espécies, podendo ser necessário o estudo de uma segunda geração (MELLO; LANGELOH, 2006).

Em relação à escolha da via de administração utilizada no ensaio de toxicidade reprodutiva, deve-se eleger a que mais se assemelha à via de exposição humana (LEMONICA, 2008). Diferentes vias podem ser utilizadas, como a dérmica, inalatória ou outras, no entanto, a via mais utilizada nos testes de toxicidade reprodutiva é a oral, com uso de sonda flexível ou

rígida, por permitir dosagem precisa da substância teste e padronização dos níveis plasmáticos maternos (LEMONICA, 2001; MELLO; LANGELOH, 2006).

A escolha da dose é outro atributo que deve ser estudado cuidadosamente nos protocolos experimentais. Recomenda-se que corresponda a três concentrações diferentes: (I) a menor dose com a qual não sejam observados efeitos tóxicos na mãe ou no concepto e que normalmente corresponda à dose de exposição, dose terapêutica ou de ingestão diária (ou a menor dose, que abaixo da dose tóxica, manifesta atividade farmacológica para a espécie em estudo); (II) uma dose máxima, relativa à dose máxima correspondente àquela a partir da qual começam a aparecer sinais leves de intoxicação materna e (III) uma dose intermediária, a qual permite maiores informações a respeito da curva dose-resposta (MELLO; LANGELOH, 2006; LEMONICA, 2008).

A extrapolação dos dados obtidos experimentalmente para o homem requer extrema cautela, pois, como se sabe, existem diferenças de sensibilidade entre espécies a serem consideradas. Como exemplo, pode-se citar a talidomida, que requer doses 5 vezes maiores do que as que causaram a síndrome no homem para produzi-las em coelhos. Esse fato faz com que seja adotado o uso de fatores de segurança para a extrapolação dos dados obtidos experimentalmente no homem. As doses máximas de exposição de um produto químico em estudo são, portanto, calculadas tomando-se por base a maior dose com a qual não foi observado efeito teratogênico no animal (NOAEL) e dividindo-se por 10, para correção da diferença de sensibilidade interespecies e, mais uma vez por 10, para correção da diferença intra-espécies. Ou seja, a dose máxima que o homem pode ser exposto é 100 vezes menor do que a dose estabelecida experimentalmente (LEMONICA, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODO

No presente estudo, foi executado o Segmento II para avaliação da toxicidade pré-natal do inseticida piriproxifeno, com exposição da progênie durante a fase de organogênese. Neste segmento, tem-se a curta exposição ao agente de forma a prevenir a adaptação metabólica materna e provocar uma alta exposição ao embrião durante a organogênese (ROGERS; KAVLOCK, 2012).

O experimento foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a metodologia seguiu as normas da EPA, recomendados por Food and Drug Administration (1994) e Organization for Economic Cooperation and Development (2001).

4.1 Animais

Utilizou-se ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) (40 machos e 120 fêmeas) com idade inicial de 90 dias e com padrão sanitário convencional, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). O número de animais segue o recomendado pela Organization for Economic Cooperation and Development (2001), a qual estabelece que cada grupo teste e controle deve conter quantidade suficiente de fêmeas que resulte em aproximadamente 20 progenitoras com presença de implantes uterinos durante a necropsia. Considerando-se a taxa de prenhez esperada entre 70 e 75%, foram definidos grupos teste e controle contendo 30 fêmeas cada.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), em condição constante de umidade ($50\% \pm 5$), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h00min às 20h00min). Utilizou-se a ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*.

As fêmeas e os machos foram mantidos separadamente em grupos de três animais por caixa de polipropileno contendo maravalha e, apenas durante as horas de acasalamento, os machos foram separados individualmente e agrupados com três fêmeas. Somente após confirmada a gestação, as fêmeas foram separadas em caixas individuais, o que permitiu o monitoramento do consumo de água e ração.

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso dos Animais (CEUA) da UFRGS sob o nº 31414. O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguiram a Lei nº 11.794,

de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008) e o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 2009a), e os princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013a; 2013b). Também foram observadas as orientações da Resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012b) e o Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais, elaborado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal do CFMV (CFMV, 2012a).

4.2 Substância química

O piriproxifeno utilizado neste estudo foi recebido por doação da empresa Sespo Indústria e Comércio Ltda. A análise do produto, lote 141014, foi realizada pelo Laboratório Especializado em Eletroeletrônica Calibração e Ensaio (LABELO), ligado à Pontifícia Universidade Católica do Estado do Rio Grande do Sul (PUC/RS), por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo. O ensaio de determinação de teor foi realizado comparando-se com o padrão da empresa Sigma-Aldrich e apresentou como resultado 101,79% de piriproxifeno para a amostra analisada.

4.3 Delineamento experimental

A toxicidade foi avaliada utilizando-se três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado pela Organization for Economic Cooperation and Development (2001) e Food And Drug Administration (1994). Segundo a Organization for Economic Cooperation and Development (2001), deve ser escolhida a menor dose que não tenha produzido qualquer toxicidade materna ou para o desenvolvimento fetal (NOAEL), a dose intermediária que tenha apresentado mínimos efeitos tóxicos observáveis e a dose mais alta que tenha produzido alguma toxicidade (sinais clínicos ou diminuição do peso corporal), porém, que não tenha causado sofrimento grave aos animais.

As doses testadas no estudo foram definidas com base nos dados toxicológicos do piriproxifeno citados neste trabalho (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012), 100 mg.kg⁻¹, 300 mg.kg⁻¹, 500 mg.kg⁻¹, além do controle negativo.

Para preparo da solução controle, foram adicionados 3 gramas de tween 80 em 100 ml de água destilada, enquanto que, para a preparação das soluções de tratamento, o piriproxifeno foi macerado e misturado à 3 gramas de tween 80, sendo posteriormente solubilizado em 100

ml de água destilada. As diferentes concentrações de piriproxifeno nas soluções corresponderam às distintas doses por quilograma de massa corporal (100 mg.kg^{-1} , 300 mg.kg^{-1} ou 500 mg.kg^{-1}). Os animais de todos os grupos receberam volume idêntico de solução (10 mL.kg^{-1}).

As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos, conforme segue:

- a) Grupo I. Dose 1 – tratado com 100 mg.kg^{-1} de piriproxifeno e veículo (3% tween 80 e água destilada) (1P);
- b) Grupo II. Dose 2 – tratado com 300 mg.kg^{-1} de piriproxifeno e veículo (3% tween 80 e água destilada) (3P);
- c) Grupo III. Dose 3 – tratado com 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno e veículo (3% tween 80 e água destilada) (5P);
- d) Grupo IV. Controle negativo – tratado com veículo da solução de tratamento (3% tween 80 e água destilada) (CN).

Após a entrada dos animais no biotério do ICBS, seguiu-se um período de adaptação de 7 dias, conforme recomenda a Organization for Economic Cooperation and Development (2001). A partir do 8º dia, os animais foram acasalados diariamente até a confirmação do diagnóstico de gestação. O tratamento foi realizado, por gavagem, com auxílio de sonda orogástrica, do 6º ao 15º dia de gestação, e posteriormente, no 21º dia procedeu-se à cesariana, conforme mostra o delineamento experimental abaixo (Figura 5).

Figura 5 - Delineamento experimental



Fonte: do autor (2017).

4.4 Avaliação do ciclo estral, acasalamento e diagnóstico de gestação

O ciclo estral de ratas tem duração média de quatro ou cinco dias e é caracterizado por quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II), as quais podem ser

determinadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal. O estro apresenta células queratinizadas e ausência total de leucócitos (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002).

O acasalamento foi realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos e intervalo de 48 horas entre eles, totalizando 21 dias. Três fêmeas virgens e nulíparas foram alocadas na caixa de cada macho, permanecendo no local durante duas horas por dia (das 6 às 8 horas) correspondente ao final do ciclo escuro. Após este período, os animais foram devidamente separados e procedeu-se ao lavado vaginal, com objetivo de se observar a fase do ciclo estral e a presença de espermatozoides em microscópio óptico com aumento de dez vezes. O diagnóstico de gestação foi realizado na presença de espermatozoides associado à fase de estro do ciclo estral. A constatação de esfregaço vaginal positivo indicou o dia zero da gestação.

O procedimento foi realizado diariamente, até que se obteve o número total de fêmeas gestantes por grupo.

4.5 Gestação

As fêmeas gestantes tiveram a massa corporal mensurada diariamente e relacionada à massa corporal inicial de gestação considerada 100% (massa corporal relativa). Durante a gestação, também foram registrados diariamente o consumo de água e ração, os quais foram relacionados à massa corporal do referido dia (consumo relativo à massa corporal individual).

4.6 Variáveis avaliadas nas fêmeas durante a gestação

As variáveis analisadas nas progenitoras durante os 21 dias de gestação (massa corporal relativa, consumo relativo de ração e de água), foram calculadas conforme segue:

$$\text{Massa corporal relativa (\%)} = \frac{\text{massa corporal diária}}{\text{massa corporal inicial}} \times 100$$

$$\text{Consumo relativo de ração (\%)} = \frac{\text{consumo de ração (g)}}{\text{massa corporal (g)}} \times 100$$

$$\text{Consumo relativo de água (\%)} = \frac{\text{consumo de água (mL)}}{\text{massa corporal (g)}} \times 100$$

As fêmeas foram avaliadas diariamente, durante todo o período gestacional, quanto à presença de diarreia, piloereção, estresse, tremores, hemorragia, aborto ou possíveis alterações sistêmicas.

4.7 Eutanásia e celiotomia

As progenitoras de cada grupo experimental, assim como as do grupo controle, foram eutanasiadas no 21º dia de gestação para avaliação reprodutiva, teratogênica e de variáveis sistêmicas. Mensurada a massa corporal, as fêmeas receberam como medicação pré-anestésica fentanila (0,05 mg.kg⁻¹) e foram eutanasiadas com sobredose do anestésico tiopental sódico (50 mg.kg⁻¹) associado à lidocaína na concentração de 10 mg.ml⁻¹, via intraperitoneal (IP). A pele e a parede abdominal foram incisadas (celiotomia) para avaliação e remoção dos órgãos.

Procedeu-se à remoção do útero gravídico, que teve sua massa mensurada com o conteúdo. Logo após, foi realizada uma incisão longitudinal em sua face lateral. Os fetos foram removidos, separados dos seus envoltórios fetais, tiveram o cordão umbilical incisado (0,5 cm do abdômen fetal) e foram observados quanto a sua viabilidade. Os fetos foram então alocados em uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido em isoflurano (a disposição ocorreu de forma que os animais não obtivessem contato direto com o algodão), de acordo com o que preconiza Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2013b) para a realização da eutanásia. O óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos.

Das progenitoras, foram retirados fígado, rins, coração e baço, sendo todos inspecionados quanto a possíveis alterações macroscópicas. A massa dos órgãos foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea sem o útero.

4.7.1 Variável avaliada nas fêmeas durante a cesárea

A massa relativa dos órgãos das progenitoras (fígado, rins, coração e baço) e útero gravídico foi calculada conforme segue:

$$\text{Massa relativa do órgão} = \frac{\text{massa do órgão}}{\text{massa corporal sem útero}} \times 100$$

4.7.2 Avaliação macroscópica dos fetos

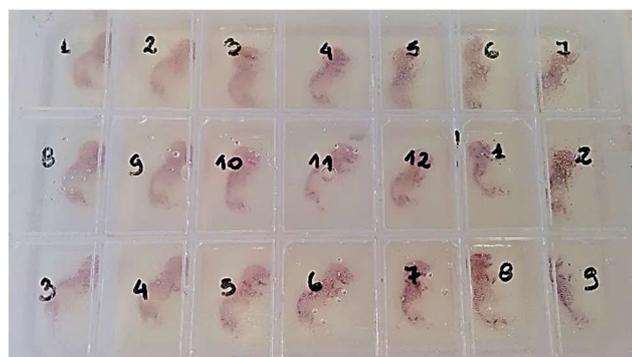
Após remoção do útero gravídico, os filhotes foram secos em papel toalha e identificados com caneta marcadora na região dorsal do corpo, respeitando-se a ordem em que se encontravam no útero (iniciando pelo corno uterino direito). Em seguida, os animais foram pesados individualmente e avaliados macroscopicamente quanto à viabilidade, presença de hematomas, possíveis anomalias e malformações externas, como conformação craniana, presença e forma de membros e cauda, entre outros.

4.7.3 Processo de coloração de fetos e diagnóstico de alterações ósseas

Os fetos provenientes do procedimento de cesariana foram submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985), para avaliação de alterações esqueléticas. Após a inspeção individual, os fetos foram colocados em potes identificados por progenitora e fixados em solução de formalina 5%, por um período mínimo de 7 dias, preparando-os para posterior processo de coloração.

Posteriormente, foram transferidos para bandejas com separação individual e mantidos por ninhada. Todos os fetos tiveram sua identificação numérica registrada nas tampas (nos respectivos quadrantes) e as bandejas foram sinalizadas numericamente de forma sequencial, sem visualização dos grupos aos quais pertenciam (Figura 6). Este procedimento possibilitou que a leitura fosse realizada de forma imparcial.

Figura 6 - Bandeja identificada contendo duas ninhadas de progenitoras tratadas com 100 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno do 6^o ao 15^o dia de gestação



Fonte: do autor (2017).

Após separação e identificação dos fetos, passou-se para a etapa de desidratação, que consiste em imersão por 24 horas em álcool etílico 70° GL, seguida por mais 24 horas de

imersão em álcool etílico 96° GL. Depois de desidratados, os fetos permaneceram em solução de hidróxido de potássio a 1,5% por 48 horas.

Posteriormente, os fetos foram sexados e então eviscerados, através de incisão abdominal próxima à cartilagem xifoide, por meio da qual foram removidos todos os órgãos das cavidades abdominal e torácica. Procedeu-se ainda a retirada da camada de tecido adiposo localizada na região dorsal das vértebras cervicais e entre as escápulas. Este procedimento, juntamente com a evisceração, favorece o processo de digestão e facilita a posterior avaliação esquelética. Em seguida, os fetos foram imersos em solução tampão de borato de sódio a 30% durante 2 dias, esta última, substituída após as primeiras 24 horas.

Para a etapa de clarificação, os fetos foram colocados em solução de borato de sódio a 30% acrescido de 1 grama de tripsina por litro, em temperatura ambiente, trocada sempre que apresentava turbidez até a completa digestão da musculatura, que foi observada através da presença da estrutura muscular translúcida. A clarificação permitiu a visualização da calota craniana e demais estruturas ósseas.

Para coloração dos esqueletos dos fetos, foi utilizada a solução de hidróxido de potássio a 1,5%, adicionado de corante vermelho de alizarina até a solução tornar-se de cor lilás. Os fetos permaneceram em solução por um período de 24 horas.

Após a coloração, os fetos passaram por duas soluções de glicerina em hidróxido de potássio a 1,5%, em concentrações de 30% e 70%, consecutivamente. Permaneceram por 48 horas em cada solução e após a conclusão deste processo, sendo armazenados em glicerina PA 100% (Figura 7).

Figura 7 - Bandeja aberta contendo filhotes de progenitoras tratadas com 100 mg.kg^{-1} de piriproxifeno do 6° ao 15° dia de gestação, corados com vermelho de alizarina com método de coloração adaptado por Taylor e Van Dyke (1985)



Fonte: do autor (2017).

Os fetos foram colocados em placa de petri e avaliados individualmente quanto à presença de alterações ósseas existentes em seu esqueleto, por meio de microscópio estereoscópico com aumento de 0,7 a 4 vezes (Figura 8). A análise das alterações encontradas foi realizada baseada no Atlas de Anomalias Externas e Esqueléticas em Ratos (CHAHOU, 1996).

Figura 8 - Filhote de progenitora tratada com 100 mg.kg^{-1} de piroxicam, do 6º ao 15º dia de gestação, corado com vermelho de alizarina com método de coloração adaptado por Taylor e Van Dyke (1985), pronto para avaliação quanto à presença de alterações ósseas



Fonte: do autor (2017).

O esqueleto foi analisado sistematicamente da cabeça à cauda, sendo minuciosamente analisados os ossos do crânio, as vértebras, as costelas, o esterno, pelve, os membros anteriores e os membros posteriores.

Todos os ossos foram avaliados quanto à forma, tamanho, adição ou ausência óssea, localização e quantificação óssea.

4.7.4 Variáveis avaliadas

As variáveis avaliadas nas progenitoras foram: massa corporal relativa, consumo relativo de água, consumo relativo de ração, massa relativa dos órgãos, como já descritos, e ainda, os índices reprodutivos que incluem o número de fetos por genitora e as perdas pós-implantação, calculadas conforme segue (LEMONICA; DAMASCENO; DI-STASI, 1996):

$$\text{N}^\circ \text{ de fetos por genitora} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos nascidos}}{\text{n}^\circ \text{ de genitoras}}$$

$$\text{Perdas pós-implantação (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos nascidos}}{\text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}} \times 100$$

Nos fetos, foram avaliadas a massa corporal e os índices fetais, que incluem proporção de sexo, taxa de malformações macroscópicas externas e de alterações esqueléticas, as quais foram calculadas conforme segue (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996):

$$\text{Proporção de sexo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de machos}}{\text{n}^\circ \text{ de fêmeas}}$$

$$\text{Taxa de malformações externas (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos com malformações externas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

$$\text{Taxa de alterações esqueléticas (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de fetos com alterações esqueléticas}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos}} \times 100$$

4.8 Análise estatística

As variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes doses do piroxicam sobre o desenvolvimento ponderal das progenitoras de cada grupo e o consumo relativo de água e de ração foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas. Quando necessária a comparação entre pares de médias, utilizou-se o Teste de Comparações Pareadas com Ajuste de Bonferroni.

As variáveis quantitativas referentes à massa relativa dos órgãos das progenitoras, a massa corporal dos fetos ao nascimento, perdas pós-implantação e o número de filhotes por ninhada foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de homogeneidade das variâncias (Teste de Levene) e, posteriormente, comparadas através da Análise de Variância (ANOVA) ou através do Teste Não Paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando necessária a comparação entre pares de médias, utilizou-se o Teste de Dunn-Bonferroni.

As associações entre os grupos e as variáveis qualitativas referentes ao percentual de alterações ósseas dos fetos e a proporção de machos e fêmeas das progênes foram avaliadas

através do teste Qui-quadrado de independência e do teste de diferença de proporções (Teste Z), respeitando os valores estatisticamente significativos.

Os programas utilizados para efetuar as análises foram o IBM SPSS para Windows 20.0 e o EXCEL. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os valores foram expressos como média e erro padrão da média (média \pm EPM).

5 RESULTADOS

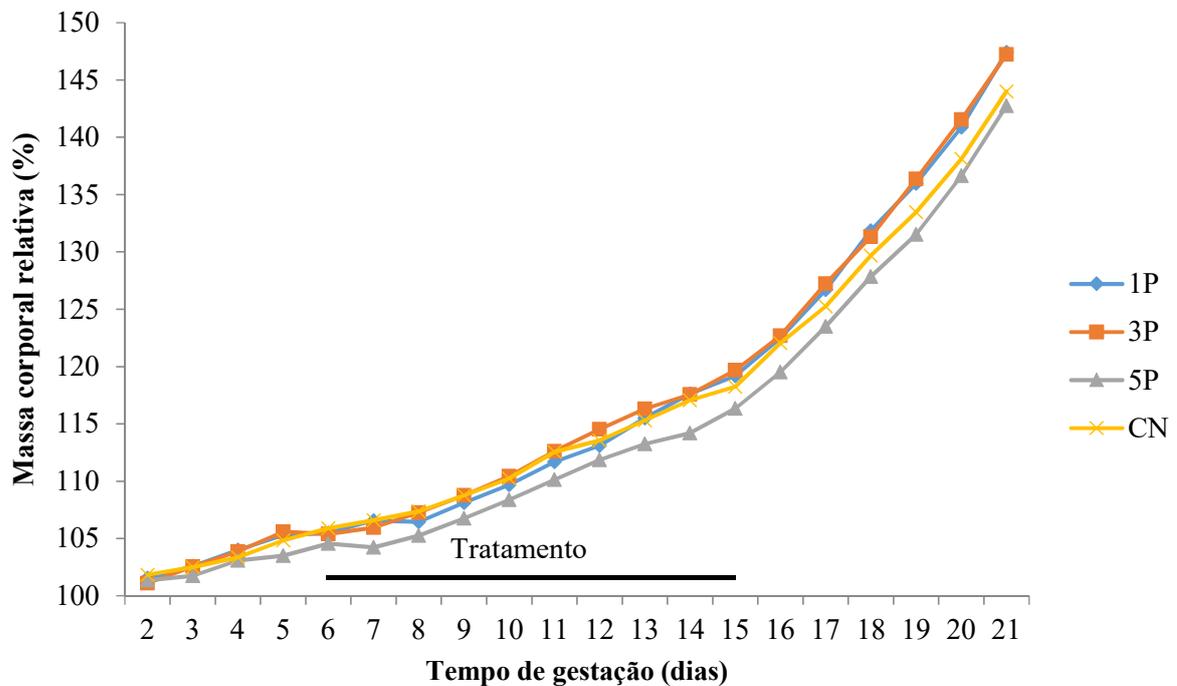
5.1 Avaliação de toxicidade materna

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda nas fêmeas progenitoras dos diferentes grupos, como diarreia, piloereção, apatia, tremores, hemorragia, abortos ou outras alterações sistêmicas. Além disso, não houve registro de óbito entre os animais avaliados.

5.1.1 Massa corporal relativa

O ganho de massa corporal foi determinado através da massa corporal relativa (g), resultado da relação entre a massa corporal diária avaliada até o 21º dia de gestação e a massa corporal inicial, multiplicado por 100. A Figura 9 demonstra o ganho de massa corporal relativa do 1º ao 21º dia de gestação.

Figura 9 - Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com piroxicam 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN), do 6º ao 15º dias de gestação, expressa pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22, respectivamente)



Neste estudo, foram comparados estatisticamente quatro momentos da avaliação do ganho de massa corporal em relação ao 1º dia de gestação: 2º, 7º, 14º e 21º dias de gestação. Em análise aos dados, pode-se verificar que no 2º dia não houve alteração significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Já no 7º dia, as fêmeas do grupo 5P apresentaram ganho de massa corporal relativa reduzido quando comparado aos animais dos grupos CN e 1P ($p < 0,05$). No 14º dia de gestação, as fêmeas do grupo 5P apresentaram ganho de massa corporal relativa também reduzido quando comparado às progenitoras dos grupos CN, 1P e 3P ($p < 0,05$). Por fim, no dia da cesariana, 21º de gestação, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). A média e o erro padrão podem ser observados na Tabela 1.

Conforme esperado para o período de gestação, verificou-se que houve aumento no ganho de massa corporal das progenitoras ao longo de toda a gestação.

Tabela 1 - Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com piroxicam 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN), do 6º ao 15º dias de gestação

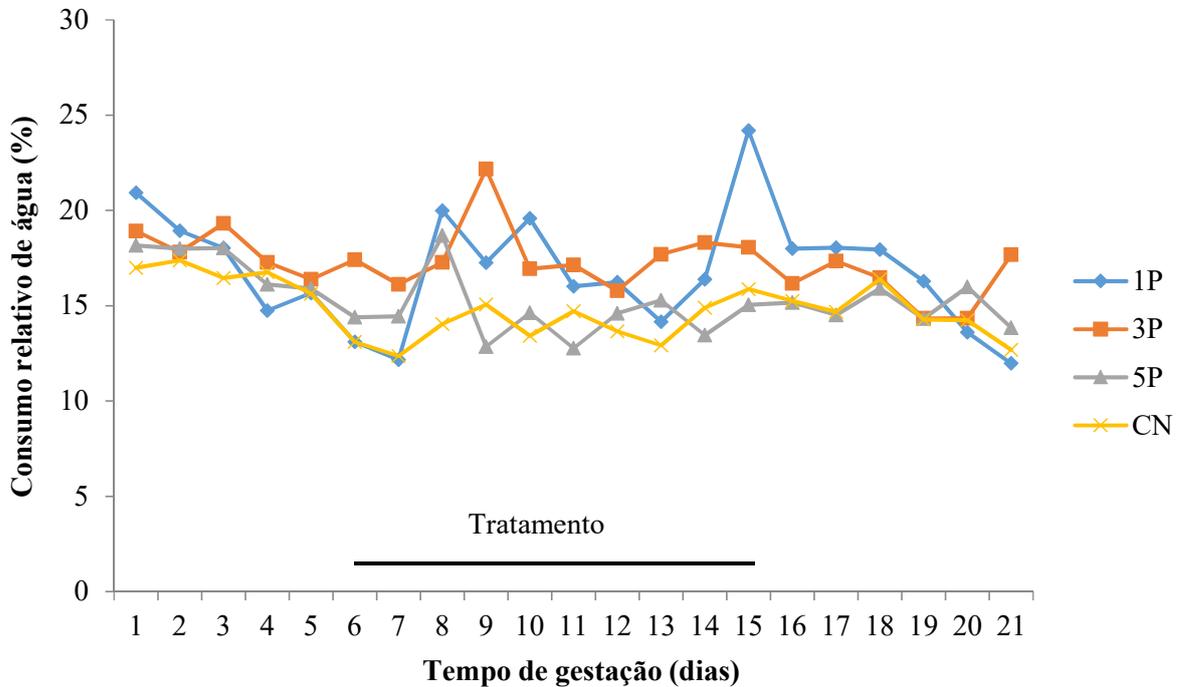
Dias	Grupos			
	1P (n = 27)	3P (n = 25)	5P (n = 25)	CN (n = 22)
	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
2	101,55 ± 0,309	101,11 ± 0,259	101,36 ± 0,293	101,85 ± 0,317
7*	106,57 ± 0,733 ^a	105,95 ± 0,366 ^{a/b}	104,23 ± 0,580 ^b	106,60 ± 0,494 ^a
14*	117,64 ± 0,832 ^a	117,56 ± 0,589 ^a	114,18 ± 0,645 ^b	117,08 ± 0,829 ^a
21	147,41 ± 1,673	147,22 ± 1,284	142,75 ± 1,204	144,00 ± 1,222

Os dados são média ± erro padrão. *P < 0,05 (ANOVA para Medidas Repetidas/Teste de Comparações Pareadas com Ajuste de Bonferroni). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

5.1.2 Consumo relativo de água

O consumo de água foi mensurado diariamente para cada animal e encontra-se apresentado na forma de consumo relativo, resultado da relação entre a quantidade específica consumida e a massa corporal do animal, multiplicado por 100. A Figura 10 demonstra o consumo relativo de água das progenitoras do 1º ao 21º dia de gestação.

Figura 10 - Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN), do 6º ao 15º dia de gestação, expresso pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22, respectivamente)



Para avaliação estatística, considerou-se a média de consumo relativo nos seguintes períodos: entre os dias 1 e 5 (1º período ou antes do tratamento), dias 6 e 15 (2º período ou durante o tratamento) e dias 16 e 21 (3º período ou após o tratamento).

Embora tenha ocorrido oscilação no consumo de água durante o tratamento, não houve diferença significativa entre os distintos grupos das progenitoras nos diferentes períodos ($p > 0,05$). A média e o erro padrão podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6º ao 15º de gestação

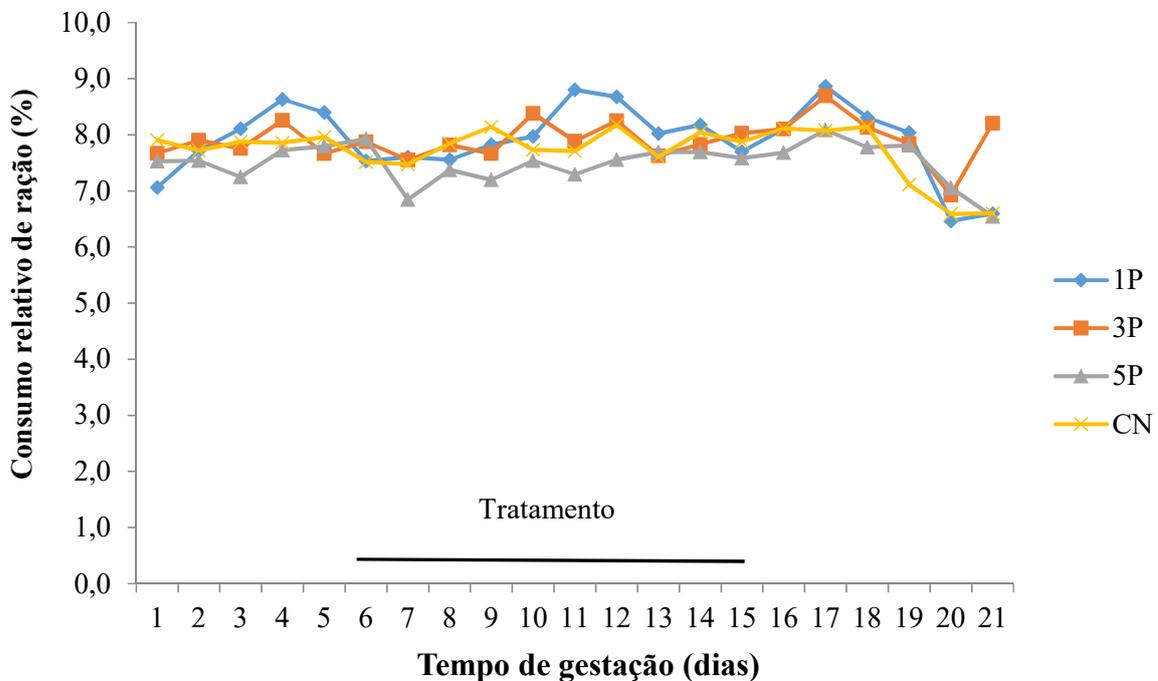
Períodos	Grupos			
	1P (n = 27)	3P (n = 25)	5P (n = 25)	CN (n = 22)
1º (dias 1 a 5)	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
	17,64 ± 1,314	17,84 ± 1,565	17,20 ± 1,294	16,64 ± 1,643
2º (dias 6 a 15)	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
	16,77 ± 0,877	17,62 ± 0,858	14,60 ± 0,855	13,96 ± 0,645
3º (dias 16 a 21)	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
	16,22 ± 0,863	16,06 ± 0,723	14,93 ± 0,886	14,66 ± 0,494

Os dados são média ± erro padrão. ANOVA por Medidas Repetidas/Teste de Comparações Pareadas com Ajuste de Bonferroni.

5.1.3 Consumo relativo de ração

O consumo de ração foi mensurado diariamente para cada animal e encontra-se apresentado na forma de consumo relativo, resultado da relação entre a quantidade específica consumida e a massa corporal do animal, multiplicado por 100. A Figura 11 demonstra o consumo relativo de ração das progenitoras, do 1º ao 21º dia de gestação.

Figura 11 - Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6º ao 15º dia de gestação, expresso pela média dos animais por grupo (n= 27, 25, 25 e 22 respectivamente)



Para avaliação estatística, considerou-se a média de consumo relativo de ração nos seguintes períodos: entre os dias 1 e 5 (1º período ou antes do tratamento), dias 6 e 15 (2º período ou durante o tratamento) e dias 16 e 21 (3º período ou após o tratamento).

A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre períodos e diferentes grupos das progenitoras ($p > 0,05$). A média e o erro padrão podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação

	Grupos			
	1P (n = 27)	3P (n = 25)	5P (n = 25)	CN (n = 22)
Períodos	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
1° (dias 1 a 5)	8,00 ± 0,237	7,85 ± 0,139	7,57 ± 0,166	7,86 ± 0,217
2° (dias 6 a 15)	7,98 ± 0,147	7,89 ± 0,174	7,47 ± 0,135	7,81 ± 0,169
3° (dias 16 a 21)	7,83 ± 0,146	7,97 ± 0,166	7,49 ± 0,144	7,47 ± 0,143

Os dados são média ± erro padrão. ANOVA para Medidas Repetidas.

5.1.4 Massa relativa dos órgãos

A massa relativa dos órgãos está apresentada na forma de massa relativa, resultado da relação entre a massa do órgão e a massa corporal sem o útero, multiplicado por 100.

A análise dos resultados não evidenciou diferenças significativas na massa relativa dos órgãos entre os diferentes grupos ($p > 0,05$), conforme mostra a Tabela 4, que apresenta a média e o erro padrão.

Tabela 4 - Massa relativa dos órgãos de fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação

Órgãos	Grupo			
	1P (n = 27)	3P (n = 25)	5P (n = 25)	CN (n = 22)
	Média (%)	Média (%)	Média (%)	Média (%)
Rim Direito	0,35 ± 0,007	0,36 ± 0,009	0,35 ± 0,007	0,33 ± 0,007
Rim Esquerdo	0,34 ± 0,007	0,34 ± 0,009	0,34 ± 0,006	0,32 ± 0,006
Coração*	0,28 ± 0,006	0,30 ± 0,008	0,29 ± 0,003	0,29 ± 0,005
Baço	0,30 ± 0,008	0,31 ± 0,008	0,30 ± 0,009	0,31 ± 0,011
Fígado	4,96 ± 0,088	4,98 ± 0,083	4,99 ± 0,064	4,82 ± 0,079
Útero Gravídico	81,56 ± 3,117	79,96 ± 2,165	88,91 ± 2,337	79,44 ± 3,451

Os dados são média ± erro padrão. ANOVA ou Kruskal-Wallis*.

5.1.5 Índices reprodutivos

A administração das três doses de piriproxifeno testadas, juntamente com o controle, não acarretaram em diferenças significativas nos índices reprodutivos estudados nas progenitoras, como número de fetos por genitora e perdas pós-implantação ($p > 0,05$), conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Índices reprodutivos de progenitoras expostas a 100 mg.kg^{-1} de piriproxifeno (1P), 300 mg.kg^{-1} de piriproxifeno (3P), 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno (5P) e tween 80 (300 mg.kg^{-1}) (CN), do 6º ao 15º dia de gestação

Índices Reprodutivos	Grupo			
	1P	3P	5P	CN
Número de progenitoras	27	25	25	22
Número total de fetos	305	275	298	241
Nº de fetos/genitora ¹	$11,3 \pm 0,500$	$11,0 \pm 0,327$	$11,92 \pm 0,294$	$10,91 \pm 0,509$
Perdas pós-implantação (%) ²	$1,27 \pm 0,608$	$3,32 \pm 1,695$	$1,86 \pm 0,811$	$1,89 \pm 1,218$

Os dados representam a média \pm erro padrão. ANOVA¹ ou Kruskal-Wallis².

As Figuras 12, 13 e 14 apresentam úteros de progenitoras tratadas com piriproxifeno, visualizados logo após a realização da laparotomia, evidenciando a presença de perdas pós-implantação.

Figura 12 - Útero de progenitora tratada com 500 mg.kg^{-1} de piroxicam (5P), do 6º ao 15º dia de gestação, evidenciando perda pós-implantação indicada pela seta



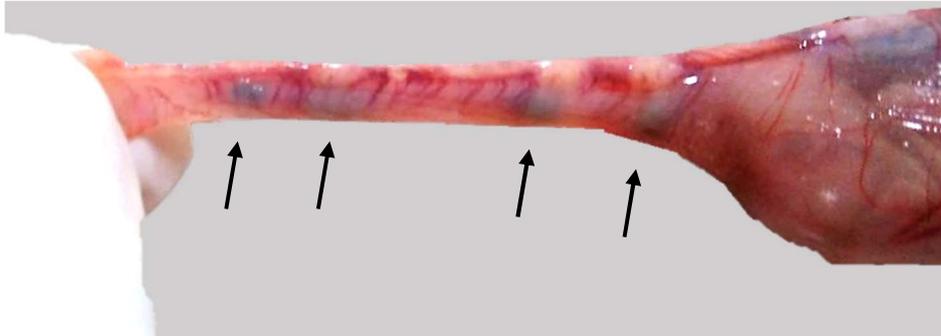
Fonte: do autor (2017).

Figura 13 - Detalhe do útero de progenitora tratada com 500 mg.kg^{-1} de piroxicam (5P), do 6º ao 15º dia de gestação, evidenciando perda pós-implantação indicada pela seta



Fonte: do autor (2017).

Figura 14 - Detalhe do útero de progenitora tratada com 300 mg.kg⁻¹ de piroxicam (3P), do 6º ao 15º dia de gestação, evidenciando a presença de quatro perdas pós-implantação indicadas pelas setas



Fonte: do autor (2017).

5.2 Avaliação da embriotoxicidade

5.2.1 Avaliação dos fetos

O estudo de embriotoxicidade de três diferentes doses de piroxicam administrados durante a organogênese avaliou um total de 1119 fetos, sendo 305 do grupo 1P, 275 do grupo 3P, 298 do grupo 5P e 241 do grupo CN.

Os dados obtidos demonstram que houve aumento na média da massa corporal dos fetos do grupo 5P, quando comparado ao grupo CN ($p < 0,05$). A média e o erro padrão da massa corporal dos filhotes por grupo, no momento da cesariana (21º dia de gestação), estão relacionadas na Tabela 6.

A administração de diferentes concentrações de piroxicam não causou diferenças significativas na proporção entre os sexos (macho:fêmea) ($p > 0,05$). Não foram observados fetos com malformações macroscópicas externas, como alterações na conformação craniana, ausência ou alteração de forma de membros ou cauda, entre outros. Os índices fetais estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Índices fetais das progenitoras tratadas com piripixifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação

Índices Fetais	Grupo			
	1P	3P	5P	CN
Número total de fetos	305	275	298	241
Massa corporal ao nascimento (g) ¹	4,92 ± 0,028 ^{a,b}	4,89 ± 0,027 ^{a,b}	4,99 ± 0,024 ^a	4,90 ± 0,026 ^b
Proporção de sexo (macho:fêmea) ²	0,8485:1	0,8333:1	0,8089:1	0,9127:1
Taxa de malformações externas (%)	0	0	0	0

Os dados representam a média ± erro padrão. ¹ P < 0,05 (Kruskal-Wallis/ Dunn-Bonferroni). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa. ² Qui-quadrado.

5.2.2 Alterações esqueléticas

A exposição de progenitoras a 100 mg.kg⁻¹ (P1), 300 mg.kg⁻¹ (P3) ou 500 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno (P5), durante o período de organogênese, resultou em alterações esqueléticas significativas estatisticamente nos fetos avaliados (p<0,05). As alterações ósseas estão relacionadas neste trabalho por região anatômica e tipo de alteração.

A Tabela 7 apresenta alterações de forma, localização, tamanho e de calcificação nos ossos da cabeça, juntamente com sua porcentagem de ocorrência entre os diferentes grupos. Identificou-se diferença significativa (p<0,05) na detecção das seguintes alterações: alargamento de fontanela, ossificação incompleta de supraoccipital, centro adicional de ossificação em interparietal e parietal, ossificação incompleta de mandíbula e calota não ossificada.

A detecção de alargamento de fontanela mostrou-se superior nos fetos dos grupos 5P e 3P em relação ao CN, sendo que o grupo 5P apresentou-se também superior em comparação aos demais grupos tratados. No que se refere à detecção de ossificação incompleta do supraoccipital, houve aumento no grupo 5P em relação ao CN, sem apresentar diferença entre os demais grupos e o CN. A presença de centro adicional de ossificação em interparietal e parietal mostrou-se mais elevada no grupo 5P em relação ao CN e demais grupos expostos. Quanto à ossificação incompleta de mandíbula, apresentou-se superior nos grupos 1P e 5P em comparação ao CN, sendo que no grupo 5P mostrou-se superior também em relação ao 3P. Os

resultados demonstraram aumento na detecção de calota pobremente ossificada no grupo 3P em relação ao 1P, 5P e CN, sem diferir entre eles.

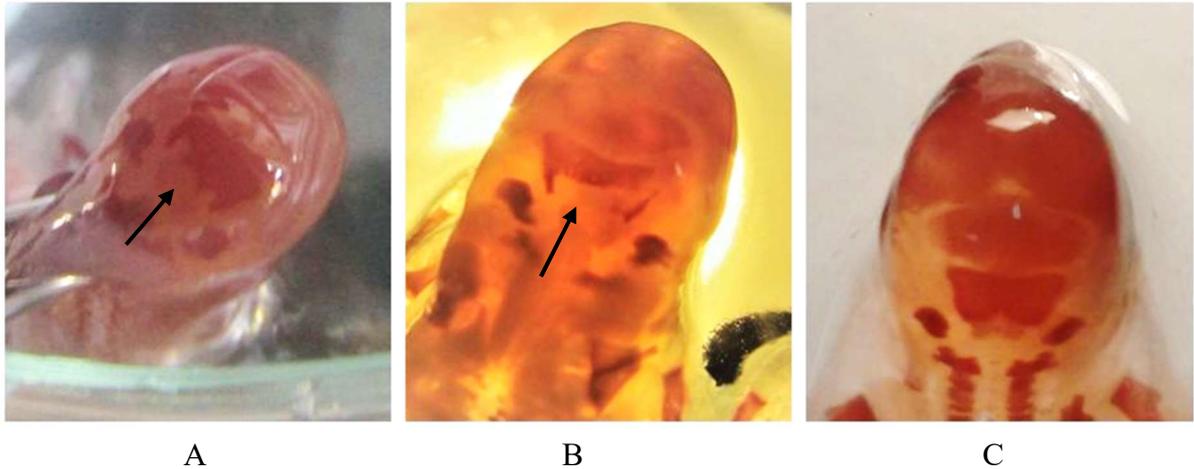
Tabela 7 - Ocorrência de anormalidades nos ossos da cabeça dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo			
	1P (n = 305)	3P (n = 275)	5P (n = 298)	CN (n = 241)
Alargamento de fontanela*	44,92 ^{a,c}	49,09 ^a	66,33 ^b	35,68 ^c
Redução de fontanela	4,92	4,73	2,69	5,81
Supraoccipital				
Formato Irregular	0,98	2,18	1,01	0,83
Ossificação Incompleta*	20,33 ^{a,b}	20,36 ^{a,b}	27,95 ^a	17,01 ^b
Centro Adicional de Ossificação	0	0,36	0	1,24
Interparietal				
Ossificação Incompleta	1,31	1,09	1,68	0,83
Centro Adicional de Ossificação*	5,25 ^a	3,64 ^a	13,47 ^b	6,22 ^a
Parietais				
Formato Irregular	0,33	0	0	0
Ossificação Incompleta	2,30	2,18	2,36	0
Centro Adicional de Ossificação*	0,98 ^a	0	5,72 ^b	0,4 ^a
Frontais				
Formato Irregular	0,33	0	0	0
Ossificação Incompleta	0,33	0	0,67	0
Nasal				
Ossificação Incompleta	0,33	0	0	0
Incisivo				
Ossificação Incompleta	0,33	0	0	0
Zigomático				
Ossificação Incompleta	1,64	1,82	2,02	0,41
Fusão	1,64	0,73	3,03	0,00
Mandíbula				
Ossificação Incompleta*	13,11 ^{a,b}	10,18 ^{a,c}	19,87 ^b	4,56 ^c
Encurtada	1,97	4,36	3,70	5,39
Basisfenóide				
Formato Irregular	0	0,36	0	0,41
Ossificação Incompleta	0	2,18	2,36	0,41
Axis				
Formato Irregular	0	0,36	0	1,24
Justaposição de Parietais e Frontais	4,92	4,36	6,73	4,56
Calota Pobremente Ossificada*	3,93 ^a	13,09 ^b	4,71 ^a	0,83 ^a

* P < 0,05 (Qui-quadrado/ Teste Z). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

A Figura 15 mostra fetos de progenitoras do grupo 5P, tratadas com 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno durante a organogênese, evidenciando cabeça com ossificação incompleta de supraoccipital, ao lado de feto de progenitora do grupo controle apresentando supraoccipital considerado normal.

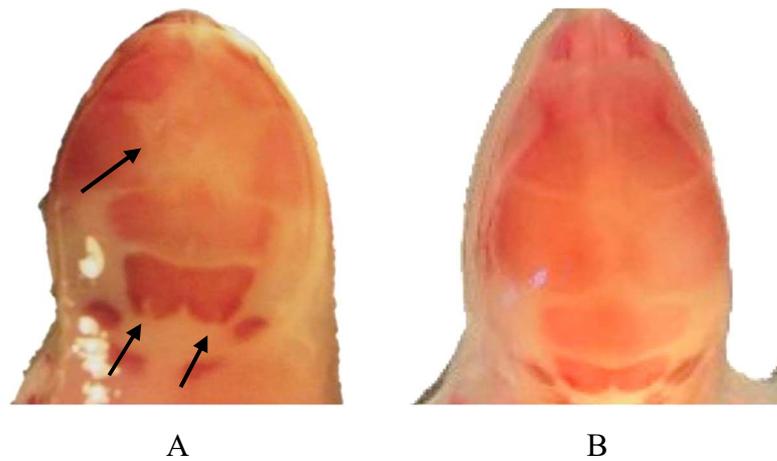
Figura 15 - Fetos diafanizados tratados e do grupo controle submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985)



A e B: Fetos de progenitoras tratadas com piriproxifeno 500 mg.kg^{-1} (5P), do 6º ao 15º dia de gestação, com setas evidenciado supraoccipital com ossificação incompleta.
C: Feto de progenitora tratada com tween 300 mg.kg^{-1} (CN), do 6º ao 15º dia de gestação, apresentando supraoccipital com ossificação considerada normal. Fonte: do autor (2017).

A Figura 16 apresenta feto de progenitora do grupo 1P, tratada com 100 mg.kg^{-1} de piriproxifeno, durante a organogênese, apresentando ossificação incompleta dos parietais e falhas na ossificação do supraoccipital, ao lado de feto de progenitora do grupo controle, apresentando ossificação da cabeça considerada normal.

Figura 16 - Fetos diafanizados, tratado e do grupo controle, submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985)



A: Feto de progenitora tratada com piriproxifeno 100 mg.kg^{-1} (1P), do 6º ao 15º dia de gestação, com setas indicando parietais com ossificação incompleta e supraoccipital com falhas na ossificação.
 B: Feto de progenitora tratada com tween 300 mg.kg^{-1} (CN), do 6º ao 15º dia de gestação, apresentando ossificação da cabeça considerada normal. Fonte: do autor (2017).

A Figura 17 apresenta feto diafanizado de progenitora do grupo 5P, tratada com 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno, durante a organogênese, evidenciando ossificação incompleta do crânio.

Figura 17 - Feto de progenitora tratada com 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno (5P), do 6º ao 15º dia de gestação, submetido à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985), com ossificação incompleta do crânio



Fonte: do autor (2017).

A Tabela 8 apresenta alterações ósseas de forma, localização, número e de calcificação nos ossos da região cervical, tórax, lombar e pelve dos fetos, juntamente com sua porcentagem de ocorrência entre os diferentes grupos. Identificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na detecção das seguintes alterações: escápula com ossificação incompleta e/ou parte perdida, além de esternobras com formato irregular e/ou pobremente ossificadas.

Para a anormalidade escápula com ossificação incompleta, os fetos do grupo 3P apresentaram maior ocorrência em relação ao CN e 5P, sendo que os grupos 1P e 5P não diferiram do CN. Em relação à escápula com parte ausente, houve aumento nos grupos 3P e CN em comparação ao 1P e 5P, sem apresentar diferença entre o grupo 3P e o CN. A ocorrência de esternobra com formato irregular mostrou-se superior nos grupos 3P e 5P em relação ao CN, sem diferir entre o grupo 1P e o CN. Já em relação à presença de esternobra pobremente ossificada, os grupos 1P e 3P apresentaram maior ocorrência em comparação ao 5P, sendo que os três grupos tratados não diferiram do CN.

Tabela 8 - Ocorrência de anormalidades nos ossos da região cervical, tórax, lombar e pelve dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ de (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN) do 6° ao 15° dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo			
	1P (n = 305)	3P (n = 275)	5P (n = 298)	CN (n = 241)
Vértebras Cervicais				
Pobremente Ossificadas	1,97	2,18	0,34	0
Clavícula				
Posição Irregular	0	0,36	0,34	0
Escápula				
Formato Irregular	0,66	0	2,69	0
Ossificação Incompleta*	4,59 ^{a,b}	7,27 ^a	1,68 ^b	2,07 ^b
Parte Ausente*	5,25 ^a	12,00 ^b	2,02 ^a	12,03 ^b
Vértebras Torácicas				
Ossificação Incompleta	0,98	1,45	0,34	0,41
Centro Bipartido	2,30	2,55	2,69	0,83
Costelas				
Onduladas	3,61	2,55	4,71	6,64
Ausentes	0,33	0,73	2,02	0,83
14°. vestigial	27,87	24,73	29,97	20,33
14°. rudimentar	1,31	0,73	0,34	0,83
Esternebras				
Formato Irregular*	72,46 ^{a,b}	76,73 ^a	75,08 ^a	64,32 ^b
Pobremente Ossificadas*	26,89 ^a	26,9 ^a	14,81 ^b	22,41 ^{a,b}
Ausente	3,61	4,73	2,69	1,66
Vértebras Lombares				
Ossificação Incompleta	0,66	1,45	2,69	0
Pobremente ossificadas	1,64	1,82	0	0
Ílio				
Pobremente Ossificado	1,64	0,73	0	0
Ísquio				
Pobremente Ossificado	2,30	1,82	0	0,41
Pubis				
Pobremente Ossificado	2,30	1,82	0,34	0,83
Vértebras Sacrais				
Pobremente Ossificadas	3,28	3,64	0,67	1,24

* P < 0,05 (Qui-quadrado/ Teste Z). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

A Tabela 9 apresenta alterações ósseas relativas à calcificação nos ossos dos membros torácicos e pélvicos fetais, juntamente com sua porcentagem de ocorrência entre os diferentes grupos. Identificou-se diferença significativa (p<0,05) na detecção das seguintes alterações: falanges dos membros torácicos e pélvicos não ossificadas, tíbia e fibula pobremente ossificadas e metatarso pobremente ossificado.

A presença de falanges não ossificadas nos membros torácicos mostrou-se superior nos fetos do grupo 5P em relação aos fetos expostos a doses mais baixas do piriproxifeno (grupos 1P e 3P), contudo, não foram detectadas diferenças significativas entre os três grupos tratados e o CN. A ocorrência de falanges não ossificadas nos membros pélvicos apresentou-se superior no grupo CN em relação ao 1P, sem diferir dos demais grupos tratados. Quanto à detecção de tíbia e fíbula pobremente ossificadas, mostrou-se superior nos grupos 3P e 5P em comparação ao CN, sendo que o grupo 1P não diferiu do CN. E em relação aos metatarsos pobremente ossificados, o grupo 3P apresentou maior ocorrência em relação ao CN, sendo que os demais grupos expostos não diferiram do CN.

Tabela 9 - Ocorrência de anormalidades nos ossos dos membros torácicos e pélvicos dos fetos das fêmeas tratadas com piriproxifeno 100 mg.kg⁻¹ (1P), 300 mg.kg⁻¹ (3P), 500 mg.kg⁻¹ (5P) e tween 80 (300 mg.kg⁻¹) (CN), do 6º ao 15º dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo			
	1P (n = 305)	3P (n = 275)	5P (n = 298)	CN (n = 241)
Úmero	0	0	0	0
Rádio e Ulna	0	0	0	0
Metacarpos				
Pobremente Ossificados	1,31	2,91	0,34	0,41
Falanges (membros torácicos)				
Não Ossificadas*	53,44 ^a	55,64 ^a	68,35 ^b	60,58 ^{a,b}
Fêmur				
Pobremente Ossificado	1,31	2,91	0,67	0,00
Tíbia e Fíbula				
Pobremente Ossificadas*	2,62 ^{a,b}	4,36 ^a	4,04 ^a	0,41 ^b
Metatarsos				
Pobremente Ossificado*	5,57 ^{a,b}	8,73 ^a	5,39 ^{a,b}	2,49 ^b
Falanges (membros pélvicos)				
Não Ossificadas*	76,07 ^a	78,18 ^{a,b}	80,13 ^{a,b}	86,31 ^b

* P < 0,05 (Qui-quadrado/ Teste Z). Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

6 DISCUSSÃO

O uso de inseticidas tem sido frequente para o controle de mosquitos, em especial no combate à dengue. Como consequência, vêm sendo detectadas populações de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas comumente utilizados, como os organofosforados, piretróides, carbamatos e organoclorados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), o que acarretou na necessidade de uso de químicos alternativos para aprimorar o controle do mosquito (OHBA *et al.*, 2013).

Após ter sido recomendado pela OMS para uso em água potável, o piriproxifeno começou a ser utilizado no Brasil como uma das formas de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti* no ano de 2014 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006a; 2006b; BRASIL, 2009b). Contudo, o inseticida foi apontado como uma das possíveis causas do aumento da incidência de microcefalia no Brasil ao final do ano de 2015 (REIS, 2016).

Ressalta-se que a escassez de informações necessárias para avaliar a segurança do uso de drogas durante a gestação constitui-se em um grave problema de saúde pública. A orientação de mulheres grávidas quanto aos riscos ou à segurança dos tratamentos medicamentosos é, muitas vezes, complexa pela ausência de informações sobre a natureza, a magnitude ou mesmo a existência de um transtorno teratogênico. Além disso, a classificação utilizada para fármacos contraindicados na gravidez normalmente é definida com base em estudos de teratogenicidade animal necessários para sua aprovação previamente a sua comercialização, os quais, muitas vezes não foram publicados e assim, não estão disponíveis para comunidade científica (ADAM; POLIFKA; FRIEDMAN, 2011).

Considerando-se os escassos dados disponíveis relativos à segurança no uso do piriproxifeno, os quais não apresentam informações detalhadas sobre a metodologia e resultados encontrados nos estudos, percebe-se dificuldade na implementação de uma avaliação de risco adequada do verdadeiro papel do inseticida no desenvolvimento da microcefalia. Haja vista que os estudos experimentais em animais tradicionalmente fornecem a base de triagem para a verificação do potencial teratogênico de um determinado agente (SCHÜLER-FACCINI *et al.*, 2002), optou-se por desenvolver este trabalho com o intuito de avaliar os possíveis efeitos no desenvolvimento fetal, decorrentes da administração de doses progressivas do inseticida piriproxifeno (100 mg.kg⁻¹, 300 mg.kg⁻¹ e 500 mg.kg⁻¹) em progenitoras de ratas Wistar, durante o período de organogênese.

6.1 Toxicidade materna

A toxicidade materna pode ser avaliada pela redução na ingestão de água ou alimentos, diminuição do peso corporal e do ganho de peso corporal das progenitoras, pela mortalidade materna ou ainda, pela presença de sinais clínicos evidentes de toxicidade (EUROPEAN COMMISSION, 2008; 2015). Neste estudo, não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda nas fêmeas progenitoras dos diferentes grupos, como diarreia, piloereção, apatia, tremores, hemorragia, abortos ou outras alterações sistêmicas.

O monitoramento do peso durante o estudo é utilizado como indicação do estado de saúde dos animais, o que pode fornecer importante informação sobre a toxicidade do produto testado (HOLLENBACH *et al.*, 2015). No presente estudo, considerando-se os quatro momentos em que se avaliou o ganho de massa corporal das progenitoras (2º, 7º, 14º e 21º dias de gestação), percebeu-se que houve redução do ganho de massa corporal relativa apenas durante os dias em que houve tratamento (7º e 14º dias) nas fêmeas do grupo 5P (500 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno), sendo que, ao final da gestação, no 21º dia, a evolução da massa corporal voltou a ser equivalente entre os diferentes grupos, sem diferir estatisticamente.

Em relação ao consumo relativo de água e ração, constatou-se que não houve diferença significativa entre os distintos períodos (antes, durante e após o tratamento) e grupos de progenitoras. Observou-se maior variação no consumo de água entre os diferentes grupos durante os dias em que o tratamento foi administrado (6º ao 15º dia de gestação), contudo, não foi considerada significativa estatisticamente.

Os resultados encontrados diferem dos evidenciados pelas referências bibliográficas citadas neste trabalho. A World Health Organization (2010) apresenta como resultado de estudo de toxicidade pré-natal em ratos, a ocorrência de leve toxicidade materna, com detecção de redução do ganho de peso corporal na dose de 100 mg.kg⁻¹ por dia de piriproxifeno, e relata ainda que, redução do peso corporal, do ganho de peso e/ou do consumo de alimento foram achados comuns em vários estudos com uso de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães.

Estudo de toxicidade no desenvolvimento pré-natal em ratos citado pela Environmental Protection Agency (2012), também evidenciou toxicidade materna, com base na redução do peso corporal, do ganho de peso e do consumo de alimento, além do aumento do consumo de água, na dose de 300 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno ao dia (LOAEL). Neste contexto, outro estudo de toxicidade pré-natal em ratos com uso do inseticida demonstrou redução do ganho de peso e do consumo de alimento, na dose de 300 mg.kg⁻¹ por dia (LOAEL). Adicionalmente, relatou-se outro estudo com resultados semelhantes para toxicidade materna do piriproxifeno, no que

se refere à redução do ganho de peso, mas com aumento do consumo de água e alimento, além de alterações no peso dos órgãos na dose de 300 mg.kg⁻¹ por dia (LOAEL) (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012),

Segundo Lourenço *et al.* (2009), as alterações no peso relativo dos órgãos são parâmetros indicadores de toxicidade materna. No presente estudo, a administração de três doses progressivas de piriproxifeno não acarretou em diferenças significativas na massa relativa dos órgãos avaliados, como fígado, rins, coração, baço e útero gravídico, entre os diferentes grupos.

Nesse mesmo contexto, em análise aos dados disponíveis, os diferentes estudos apresentados para avaliação da toxicidade pré-natal em ratos também não relataram alteração no peso dos órgãos de progenitoras expostas ao piriproxifeno (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012), exceto por um estudo que demonstrou alteração na dose de 300 mg.kg⁻¹ ao dia, porém, não foram especificados os órgãos, nem quais foram as alterações (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012).

Em contrapartida, cabe destacar que há relatos de estudos com administração de doses repetidas de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães, que concluíram que o fígado e rins são os principais órgãos alvo, com leve anemia nos roedores (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012).

Já em estudo de toxicidade subcrônica, com administração oral de 300 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno, durante 90 dias, evidenciou-se aumento absoluto e relativo do peso do fígado e alargamento dos hepatócitos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012). Ainda, de forma semelhante, estudos ditos apenas como de toxicidade, realizados em camundongos, ratos e cães, evidenciaram aumento do peso do fígado e alterações nas concentrações de lipídeos plasmáticos, em especial o colesterol, em doses iguais ou superiores a 120 mg.kg⁻¹ por dia de piriproxifeno em ratos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Além disso, estudo com administração de piriproxifeno na dieta crônica, por 6 meses, em ratos *Sprague-Dawley*, evidenciou aumento do fígado (com hipertrofia de hepatócitos), dos rins, da tireoide, além de redução na pituitária em doses de 2000 e 10000 ppm. Os autores concluíram que níveis inferiores a 400 ppm (24 mg.kg⁻¹ para machos e 27,5 mg.kg⁻¹ para fêmeas) não causaram efeitos nos animais avaliados (KOYAMA *et al.*, 1989).

Segundo Lourenço *et al.* (2009), a interpretação das alterações nas taxas reprodutivas pode identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos se estabeleceram nos animais. Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram constatar que as três doses do

piriproxifeno não acarretaram em diferenças significativas nos índices reprodutivos estudados nas progenitoras, no que se refere ao número de fetos por genitora e perdas pós-implantação. Da mesma forma, não foi constatada a presença de abortos ou partos anteriores ao 21º dia de gestação.

Diferentemente do observado, há estudos que relatam interferência do piriproxifeno e de outros pesticidas em índices reprodutivos e na ocorrência de abortos e partos prematuros.

A World Health Organization (2010) apresenta estudo de toxicidade reprodutiva do piriproxifeno em ratos, com tratamento durante o período pré-natal e lactação, o qual evidenciou aumento no número de partos com natimortos na geração F₀ e redução no número de implantações e na média dos fetos vivos na geração F₁, na dose de 500 mg.kg⁻¹ de peso corporal ao dia. Relata ainda estudo sobre a toxicidade do desenvolvimento em coelhos, com sinais de toxicidade materna, como aborto e parto prematuro, em doses superiores ou iguais a 300 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno ao dia.

Outro estudo demonstrou os efeitos tóxicos do clorpirifós em ratos, na dose de 80 mg.kg⁻¹ ao dia, administrado por via intraperitoneal, durante a organogênese, evidenciando redução do número de fetos vivos e aumento de reabsorções (TIAN *et al.*, 2005). Da mesma forma, experimento contemplando a exposição oral de camundongos machos e fêmeas a diferentes formulações de pesticidas organofosforados (diclorvós, clorpirifós, dimetoato, triazofos, profenofós e pirimifós-metil) demonstrou aumento do número de reabsorções (GOMES; LLOYD; HONG, 2008).

Segundo Bernardi e Spinosa (2017), os agentes teratogênicos sempre produzem suas ações por interferirem nos mecanismos celulares, em doses que causam nenhuma ou mínima toxicidade materna. O monitoramento do peso materno trata-se do principal parâmetro avaliado na identificação da toxicidade materna (EUROPEAN COMMISSION, 2008).

A toxicidade materna abrange uma série de efeitos adversos observados na gestação animal, como sinais clínicos evidentes de toxicidade (por exemplo, ataxia) e/ou diminuição no peso corporal. Entretanto, a interpretação dos efeitos sobre o desenvolvimento fetal mostra-se frequentemente difícil nas doses que causam toxicidade materna. O desenvolvimento do concepto no útero pode ser influenciado por efeitos tóxicos na progenitora, seja por mecanismos relacionados ao estresse, ou por específicos mecanismos mediados pela progenitora. Portanto, a influência da toxicidade materna deve ser avaliada conjuntamente com os resultados relativos à toxicidade no desenvolvimento (EUROPEAN COMMISSION, 2008).

Ao avaliar a toxicidade materna, especialmente no que diz respeito à perda de peso corporal materno ou ao ganho de peso diminuído, deve-se considerar que qualquer efeito que

acarrete na diminuição do peso corporal fetal ou na diminuição do tamanho da ninhada terá um efeito no peso corporal ou no ganho de peso materno. Para avaliar a influência do peso corporal fetal ou do tamanho da ninhada nas alterações de peso materno, mostra-se essencial avaliar a correlação entre o peso corporal materno (ou suas alterações), o peso do útero gravídico, o tamanho da ninhada e o peso dos fetos. Após essa avaliação, deve ser possível determinar se houve efeito sobre o peso materno, com ou sem efeito sobre a ninhada. Se uma redução no peso corporal materno for resultado do reduzido peso fetal, provavelmente ocorrerá durante o último trimestre de gestação, quando o tamanho fetal influenciar o peso total da progenitora. No entanto, se uma redução no aumento de peso ocorrer próximo do início do período de dosagem, é provável que seja o resultado de um efeito no animal materno (BEYER *et al.*, 2011).

No presente trabalho, considerando-se que a redução no ganho de massa corporal relativa de progenitoras expostas a 500 mg.kg^{-1} de piroproxifeno ocorreu apenas junto ao período de tratamento, somado ao fato de que houve maior massa corporal dos fetos ao nascimento no mesmo grupo, além de não ter ocorrido diferenças significativas no peso do útero gravídico e no tamanho da ninhada, pode-se inferir que a redução do ganho de massa corporal relativa materna esteja relacionada ao efeito do agente químico no animal materno, e não seja decorrente de alterações no desenvolvimento fetal.

Beyer *et al.* (2011) relata ainda que a ocorrência de leves alterações maternas, como por exemplo, efeitos transitórios sobre o peso corporal ou no consumo do alimento, ou ainda, na diminuição do ganho de peso corporal de menos de 10% em relação aos animais de controle, o que foi evidenciado no presente trabalho, não apresentam efeitos adversos no desenvolvimento embrionário.

6.2 Toxicidade fetal

Muitos teratologistas preconizam que substâncias químicas que passam da circulação materna para os fluidos uterinos e penetram no embrião no período de pré-implantação podem causar a morte do embrião ou a sobrevivência sem danos, porque, nesta situação, células tronco têm a capacidade de substituir células danificadas, resultando em desenvolvimento embrionário normal. No entanto, teratógenos que passam a barreira placentária podem não ser letais ao embrião, mas podem causar desvios de desenvolvimento, como malformação congênita, retardo do crescimento, déficit funcional e comportamental (LOURENÇO *et al.*, 2009).

Importante considerar que, quanto maior for o período de formação de um determinado sistema, maior será o risco de seu desenvolvimento ser afetado por determinado agente. Por

isso, nos testes de teratogenicidade são estudadas possíveis anomalias ósseas dos animais, pois o período da organogênese do esqueleto é bastante longo (BERNARDI; SPINOSA, 2017). A organogênese é o período em que a maioria das estruturas corporais é estabelecida e é nesta fase que os teratógenos podem induzir defeitos congênitos importantes (ROGERS; KALVLOCK, 2012; MOORE; PERSAUD, 2016).

O presente estudo avaliou a toxicidade teratogênica de doses crescentes do inseticida piriproxifeno (100, 300 ou 500 mg.kg⁻¹) em fetos de ratos Wistar, expostos durante o período da organogênese, que abrange do 6º ao 15º dia de gestação.

A análise aos resultados encontrados demonstra que a proporção entre os sexos (macho:fêmea) nas ninhadas não diferiu entre os grupos. Já a média da massa corporal individual fetal apresentou-se superior no grupo tratado com 500 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno, em comparação ao controle. Como consequência, a média da massa relativa do útero gravídico também apresentou resultado superior no mesmo grupo, embora sem apresentar diferença significativa. Contudo, segundo Aliverti *et al.* (1979), o peso fetal não é parâmetro conclusivo em estudos de desenvolvimento porque pode variar dependendo do tamanho da ninhada. Neste trabalho, o número de fetos por genitora não apresentou diferença significativa entre os grupos, embora as ninhadas tratadas com 500 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno tenham apresentado-se mais numerosas do que as demais, o que, somado ao fato de que se constatou uma maior massa corporal individual fetal neste mesmo grupo, poderia ser interpretado como consequência de uma melhor condição física das fêmeas.

Diferentemente do constatado, os estudos apresentados neste trabalho relativos à toxicidade no desenvolvimento pré-natal com uso do piriproxifeno em ratos não relataram alteração do peso fetal (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010; ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012), exceto por um citado pela EPA, que evidenciou, porém, redução no peso corporal fetal, além de aumento da incidência de dilatação da pelve renal, na dose de 300 mg.kg⁻¹ por dia do inseticida (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012).

Outro trabalho relativo à toxicidade do desenvolvimento, com a administração do pesticida dinoseb em ratas prenhes também evidenciou redução do peso fetal ao nascimento. O produto foi administrado em ratas prenhes, por gavagem, na dose de 8 mg.kg⁻¹ ou 10 mg.kg⁻¹, do 6º ao 15º dia de gestação, ou na dieta, nas doses de 120 ppm ou 200 ppm, do 6º ao 16º dia de gestação, e as ninhadas foram avaliadas no 20º dia de gestação. Os resultados indicaram que, em todos os grupos tratados, houve redução no consumo de alimento e no peso corporal das progenitoras. Observou-se redução no peso dos fetos, além de ossificação retardada nos

diferentes grupos expostos, exceto no grupo tratado com 120 ppm de dinoseb (MATSUMOTO *et al.*, 2010).

Por outro lado, há estudo com uso do antiparasitário dipropionato de imidocarb, empregado no tratamento e na profilaxia da babesiose, acarretando em aumento do ganho de peso fetal. O produto foi administrado para avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos em ratos durante o período de organogênese, do 7º ao 15º dia de gestação, por via subcutânea, nas doses de 1,7 m.kg⁻¹ ou 2,5 m.kg⁻¹. Como resultado, ambas as doses não alteraram o peso e o ganho de peso materno, contudo, a dose de 2,5 m.kg⁻¹ promoveu aumento da média de peso dos filhotes por ninhada e diminuição da média de peso da placenta individual e por ninhada. Em relação à avaliação óssea e visceral, não foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais e o controle. Na dose de 2,5 m.kg⁻¹, notou-se também maior maturidade da prole, evidenciada pela maior ossificação total e do número de esternébras. Segundo o autor, este resultado pode indicar um grau maior de maturidade dos filhotes, que por sua vez levaria a um maior peso fetal no grupo que recebeu a dose de 2,5 m.kg⁻¹, o que poderia ser justificado como simplesmente um fato coincidente em relação ao maior número de filhotes e melhor condição materna (COSTA, 2005).

Além disso, outro estudo avaliou a toxicidade reprodutiva de três doses de óleo de copaíba (0,3 m.kg⁻¹, 0,6 ml.kg⁻¹ e 0,9 ml.kg⁻¹), administradas por gavagem, durante a organogênese de camundongos (*Mus musculus*). Dentre os resultados encontrados, detectou-se que, na dose mais baixa administrada, os fetos apresentaram-se com peso e comprimento maior do que o grupo controle, enquanto as outras doses proporcionaram uma diminuição no peso e comprimento fetais em relação ao controle. Adicionalmente, verificou-se que a exposição materna ao óleo de copaíba não influenciou na ossificação dos fetos, confirmando-se que este componente não altera o desenvolvimento intra-uterino e não causa efeitos teratogênicos (LOURENÇO *et al.*, 2009).

Na toxicologia do desenvolvimento, os efeitos adversos decorrentes de substâncias químicas em fetos durante o desenvolvimento no útero são investigados. As alterações no desenvolvimento esquelético durante a organogênese são manifestações de tais efeitos adversos e geralmente são chamadas de anomalias. Durante a avaliação de risco na indução de anomalias causadas por substâncias químicas, a diferenciação das alterações em variações ou malformações mostra-se crucial para a sua categorização quanto ao potencial de toxicidade da substância (CHAHOUUD *et al.*, 2015).

Segundo Chahoud *et al.* (2015) e Bernardi e Spinosa (2017), o termo malformações é utilizado para alterações estruturais permanentes irreversíveis que podem afetar a sobrevivência

pós-natal, o desenvolvimento ou a função de um organismo; já as variações são divergências estruturais na formação de um ser que não afetam sua sobrevivência ou saúde, ou ainda, são caracterizadas por um atraso no desenvolvimento. Tanto as malformações quanto às variações podem ser causadas pela ação direta de um agente químico (substância química) ou física (radiações) no produto da concepção ou, secundariamente, pela ação no organismo materno (BERNARDI; SPINOSA, 2017).

No presente estudo, a avaliação dos defeitos esqueléticos dos fetos foi utilizada para detecção do potencial teratogênico do inseticida. Foram observadas diferenças significativas na ocorrência de desvios em fetos expostos a 100 mg.kg^{-1} (1P), 300 mg.kg^{-1} (3P) ou 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno (5P), do 6º ao 15º dia de gestação. Contudo, em avaliação externa aos fetos dos diferentes grupos, não foram observados animais com malformações.

A avaliação dos ossos da cabeça identificou diferença significativa na ocorrência das seguintes alterações: alargamento de fontanela, ossificação incompleta do supraoccipital, centro adicional de ossificação em interparietal e parietal, ossificação incompleta de mandíbula e calota não ossificada.

A detecção de alargamento de fontanela mostrou-se superior nos fetos dos grupos 5P e 3P em relação ao CN, sendo que o grupo 5P apresentou-se superior em comparação aos demais grupos tratados. No que se refere à presença de centro adicional de ossificação em interparietal e parietal, houve aumento no grupo 5P em relação ao CN e demais grupos expostos. Segundo Solecki *et al.* (2001), na avaliação esquelética do crânio, as anormalidades relativas à presença de fontanelas aumentadas e de centro adicional de ossificação são classificadas como variações.

A ossificação incompleta de supraoccipital evidenciou maior ocorrência no grupo 5P em comparação ao CN. Quanto à ossificação incompleta de mandíbula, apresentou-se superior nos grupos 1P e 5P em comparação ao CN, sendo que no grupo 5P mostrou-se superior também em relação ao 3P. A detecção de calota pobremente ossificada apresentou aumento significativo no grupo 3P em relação ao CN e demais grupos tratados. Chahoud e Paumgarten (2009) informam que a aparente diminuição da quantidade de osso mineralizado (por exemplo, ossificação incompleta ou osso mal ossificado) em comparação ao que se espera para a idade de desenvolvimento, pode ser classificada como ossificação retardada. Considerando-se que, na maioria dos casos, a cartilagem está aparentemente intacta, é provável que a mineralização ocorra mais tarde e, portanto, essas observações são consideradas como transitórias, de menor impacto na sobrevivência ou na saúde. As ossificações atrasadas são, portanto, incluídas nas variações do esqueleto.

Segundo Solecki *et al.* (2001), a ossificação incompleta no rato normalmente é assumida como retardo de crescimento, indiferente à estrutura afetada. No entanto, cabe ressaltar que a ossificação incompleta de uma estrutura isolada, quando o restante do esqueleto do animal está normal, provavelmente é mais importante do que a ossificação incompleta, acompanhada de perda de peso ou outros sinais de imaturidade esquelética. Neste mesmo sentido, no caso do crânio, a classificação malformação é mais apropriada na detecção de uma estrutura não ossificada identificada de forma isolada, enquanto que as demais estruturas da cabeça apresentam-se sem alterações, o que difere do observado no presente trabalho, uma vez que a maior parte das alterações não foram encontradas de forma isolada nos fetos avaliados.

A avaliação dos ossos da região cervical, tórax, lombar e pelve dos fetos detectou alterações significativas na ocorrência de escápula com ossificação incompleta ou parte perdida, além de esternébras com formato irregular ou pobremente ossificadas.

A detecção de escápula com ossificação incompleta apresentou-se superior no grupo 3P em comparação aos grupos CN e 5P. Em relação à escápula com parte perdida, houve aumento nos grupos 3P e CN em relação aos grupos 1P e 5P. Segundo Chahoud, Bochert e Neubert (1992), o aumento da frequência de anomalias também pode ocorrer em fetos do grupo controle e são chamadas anomalias espontâneas, as quais podem ser designadas como variações. A ocorrência de formato irregular em esternébra apresentou aumento dos grupos 3P e 5P em relação ao CN. Quanto à ocorrência de esternébra pobremente ossificada, os grupos 1P e 3P apresentaram maior taxa em comparação ao 5P, sendo que nenhum grupo diferiu do CN. Chahoud *et al.* (1999a) e Chahoud e Paumgarten (2009) estabeleceram que esternébra com ossificação incompleta ou esternébra não ossificada caracterizam-se como variações.

As alterações relativas à ocorrência de centro bipartido em vértebra torácica foram detectadas, mas sem apresentar diferenças significativas no presente trabalho, e Chahoud *et al.* (2015) demonstraram em estudo que este tipo de anomalia é claramente reduzida no 21º dia após o nascimento, evidenciado que se trata de atraso no desenvolvimento, assim como centro com ossificação assimétrica na coluna vertebral.

Em relação às alterações relativas à calcificação nos ossos dos membros torácicos e pélvicos, identificou-se diferença significativa na ocorrência de falanges dos membros torácicos e pélvicos não ossificadas, tíbia e fíbula pobremente ossificadas e metatarso pobremente ossificado.

A presença de falanges não ossificadas dos membros torácicos foi superior no grupo 5P em relação ao 1P e 3P, sendo que não houve diferença significativa entre qualquer um dos grupos tratados e o CN. Já a ocorrência de falanges não ossificadas dos membros pélvicos foi

superior no CN em relação ao 1P. Quanto à presença de tíbia e fíbula pobremente ossificados, mostrou-se superior nos grupos 3P e 5P em comparação ao CN. E em relação ao metatarso pobremente ossificado, o grupo 3P apresentou maior ocorrência em relação ao CN. Segundo Chahoud *et al.* (1999a), a presença de falanges não ossificadas é classificada como variação, assim como Chahoud e Paumgartten (2009) esclareceram que a aparente diminuição da quantidade de osso mineralizado caracteriza-se como ossificação retardada, sendo classificada também como variação.

Os fetos que apresentaram a maior prevalência de quase a totalidade das diferentes anomalias esqueléticas detectadas neste trabalho foram os do grupo 5P, evidenciando diferença significativa na detecção de alargamento de fontanela, ossificação incompleta de supraoccipital, ossificação incompleta de mandíbula, centro adicional de ossificação em interparietal e parietal, além de falanges dos membros torácicos não ossificadas. Já os fetos do grupo 3P apresentaram maior prevalência de calota pobremente ossificada, além de escápula com ossificação incompleta e metatarso pobremente ossificado. As alterações relativas ao formato irregular em esternébra, além de tíbia e fíbula pobremente ossificadas, foram mais prevalentes nos grupos 5P e 3P.

Diante da análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se perceber que as alterações observadas são variações caracterizadas por atraso no desenvolvimento, enquanto as malformações, que são representadas pela ausência de ossos importantes, ossos mal posicionados, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias ou fusões (SOLECKI *et al.*, 2001; CHAHOUD *et al.*, 2015), não foram encontradas, exceto pela fusão do zigomático com a maxila, que foi detectada superior no grupo 5P, embora não tenha sido considerada estatisticamente significativa. Cabe ressaltar ainda que esta alteração tem sua classificação controversa por diferentes estudos. Apesar de Solecki *et al.* (2001) classificarem-na como malformação, Chahoud e Paumgartten (2009) definiram-na como variação, tendo em vista sua alta incidência nos registros históricos de estudos realizados com animais da mesma linhagem, considerando que a fusão do osso zigomático ocorre posteriormente (durante o crescimento pós-natal), e ainda, que as consequências dessa antecipação ainda não estão bem esclarecidas.

Percebe-se que os resultados encontrados são compatíveis com o apresentado pela European Food Safety Authority (2009) e European Chemicals Agency (2012), que informaram que estudos de toxicidade do desenvolvimento com uso do piroproxifeno em ratos e coelhos não evidenciaram efeitos teratogênicos nos fetos avaliados. E ainda, com a Environmental Protection Agency (2012), que relatou estudo de toxicidade do desenvolvimento em ratos, com a administração de 1000 mg.kg⁻¹ por dia de piroproxifeno, resultando no aumento da incidência

de variações esqueléticas em fetos no 21º dia de gestação, além de inespecíficas variações viscerais após o 56º dia de nascimento. Nesse mesmo contexto, a World Health Organization (2010) fez referência a estudo sobre a toxicidade do desenvolvimento em ratos, o qual demonstrou aumento da frequência de variações esqueléticas (abertura do forame transversal na sétima vertebra cervical) e anomalias viscerais em fetos na geração F₁, com a administração de 1000 mg.kg⁻¹ de peso corporal por dia. Não houve evidência de retardo de crescimento ou neurotoxicidade em fetos, com a administração de doses superiores ou iguais a 1000 mg.kg⁻¹ de piroxicam nas progenitoras.

Embora as anomalias citadas no presente trabalho tenham sido mais prevalentes nas doses mais altas administradas, a toxicidade não apresentou influência da relação dose-dependente, exceto pelo alargamento das fontanelas e ossificação incompleta do supraoccipital, uma vez que, com o aumento gradual da dose, evidenciou-se maior prevalência destas alterações, caracterizadas como variações por Solecki *et al.* (2001) e Chahoud e Paumgarten (2009).

Cabe ressaltar que um aumento induzido por dada substância na incidência de variações esqueléticas deve ser considerado na avaliação de risco de agentes embriotóxicos humanos. Mesmo diante da afirmação de que as alterações provocadas por agentes químicos classificadas como variações são improváveis de afetar adversamente a sobrevivência ou a saúde do indivíduo, deve-se considerar que, embora aparentemente não seja considerada adversa e não transmita desvantagem seletiva, um aumento na sua ocorrência, induzida pelo tratamento, significa que o agente químico tem o potencial de perturbar o desenvolvimento do esqueleto. Dessa forma, sob uma condição diferente de exposição, ou em outras espécies, esta perturbação da formação óssea normal pode dar origem a um resultado diferente e mais severo (CHAHOU; BOCHERT; NEUBERT, 1992; CHAHOU; PAUMGARTTEN, 2009).

Segundo Chahoud e Paumgarten (2009), as alterações transitórias tendem a ser consideradas como variações, ao invés de malformações (alteração estrutural permanente). No entanto, mesmo que uma determinada alteração seja eventualmente reparada, pode afetar negativamente a saúde animal, desde que persista na vida pós-natal. Poucos estudos experimentais abordaram estas questões até o momento. Uma variação, portanto, deve ser considerada na avaliação de risco, a menos que existam evidências de que não cause um efeito prejudicial sobre a sobrevivência ou a saúde após o nascimento (CHAHOU; PAUMGARTTEN, 2009). Solecki *et al.* (2001) esclarecem ainda que, se uma curva de crescimento normal é assumida, o atraso na ossificação nos estágios posteriores de

desenvolvimento mostra-se provavelmente mais importante do que o atraso nos estágios iniciais.

Informações relativas à toxicidade humana do piriproxifeno são muito escassas e há apenas um relato de caso relacionado ao potencial de toxicidade reprodutiva, em que a exposição pré-natal ao piriproxifeno foi supostamente associada ao desenvolvimento de rara anomalia congênita, a extrofia de bexiga (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016). Neste relato de caso, a gestante foi exposta a um *spray* contendo piriproxifeno (0,01%), cifenotrina (0,5%), tetrametrina (0,31%), durante as primeiras 12 semanas de gestação, e apresentou sinais de intoxicação como, episódios recorrentes de cefaleia, desconforto geral, rinite, espirro, dispneia, dor de garganta, conjuntivite e tosse, coincidentes com a exposição ao pesticida. Detectou-se a presença de piriproxifeno e piretroides em amostra de urina da criança obtida aos 4 meses de idade e não foram identificados outros fatores de risco para a ocorrência da malformação (MARTIN *et al.*, 2009).

Segundo Heickmann *et al.* (2016), em análise às alterações características da microcefalia, pode-se perceber importante desproporção craniofacial e outras dismorfias como, acentuada protuberância óssea occipital, fontanelas fechadas ao nascer, excesso de pele e/ou dobras de pele no escalpo, além de hérnia umbilical, alterações que não foram detectadas nos fetos dos diferentes grupos do presente estudo; ao contrário, as fontanelas apresentaram-se aumentadas nos grupos tratados. Ventura *et al.* (2016) descreve ainda outras características ligadas à microcefalia, mas em uma proporção menor, como a artrogripose e pés tortos congênitos, o que também não foi observado neste estudo.

Importante comentar ainda que, segundo Environmental Protection Agency (2012), recente revisão de literatura relativa a estudos de neurotoxicidade aguda e subcrônica indica o piriproxifeno não é um químico neurotóxico, uma vez que não foi observada neurotoxicidade em estudos agudos e crônicos até o limite de 2000 mg.kg⁻¹ e, ainda, não houve alterações no peso do cérebro ou histopatologia relacionadas à exposição ao pesticida. Outro estudo demonstrou que não há evidências de ocorrência de anomalias no sistema nervoso do feto em estudos de toxicidade pré-natal em ratos e coelhos, com doses tóxicas maternas até 1000 mg.kg⁻¹ por dia e 300 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno ao dia, respectivamente.

No presente trabalho, pode-se constatar que a administração do piriproxifeno nas doses de 100, 300 ou 500 mg.kg⁻¹ não apresentou evidências de que acarrete em malformações fetais. Contudo, sabe-se que outros pesticidas administrados às progenitoras durante o período pré-natal induziram a uma maior incidência de alterações teratogênicas; entre eles, pode-se citar

diclorvós, clorpirifós, dimetoato, triazofos, profenofós e pirimifós-metil (organofosforados), além do dinoseb (dinitrofenol).

Gomes, Lloyd e Hong (2008) avaliaram os efeitos da exposição oral de diferentes formulações de pesticidas organofosforados (diclorvós, clorpirifós, dimetoato, triazofos, profenofós e pirimifós-metil) no desenvolvimento de camundongos. Os resultados demonstraram malformações congênitas nos fetos, como defeitos nas orelhas, olhos, mandíbulas, cérebro e língua. A ocorrência de microcefalia, anencefalia, catarata, hipoplasia maxilar ou mandibular e língua protusa mostrou-se significativamente superior nos grupos expostos aos pesticidas.

Outro trabalho demonstrou os efeitos tóxicos do clorpirifós em ratos, na dose de 80 mg.kg⁻¹, administrado via intraperitoneal, durante a organogênese, evidenciando redução do número de fetos vivos e aumento de reabsorções, além de malformações externas e esqueléticas (TIAN *et al.*, 2005). Ainda, estudo para avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida dinoseb em ratas prenhes, durante a organogênese, indicou que, nas doses de 8 e 10 mg.kg⁻¹ (gavagem) e 200 ppm (dieta), houve redução do peso fetal e ossificação retardada nos grupos tratados. O potencial teratogênico da dose de 10 mg.kg⁻¹ foi confirmado pelo aumento da incidência de fetos com malformações esqueléticas e externas, incluindo a microftalmia (MATSUMOTO *et al.*, 2010).

Embora alguns antifúngicos do grupo azólicos sejam considerados teratogênicos, o eficonazole, novo fármaco utilizado no tratamento da onicomicose, não apresentou evidências de teratogenicidade em ratos e coelhos. O novo antifúngico foi administrado por via subcutânea, nas doses de 2, 10 ou 50 mg.kg⁻¹, do 7º ao 17º dia de gestação. Nas progenitoras, observou-se toxicidade no local da injeção com engrossamento da pele e presença de nódulos com administração de 10 e 50 mg.kg⁻¹, além de redução do consumo, alargamento do baço, hematopoiese na dose de 50 mg.kg⁻¹. Sinais de toxicidade embriofetal foi observada na mais alta dose, incluindo morte embrionária, redução de fetos vivos, aumento no peso da placenta e lesões microscópicas na placenta. Constatou-se ainda aumento no número de costelas lombares unilaterais e bilaterais na mais alta dose testada, contudo, alterações consideradas como variações e não malformações. A NOAEL para malformações fetais foi de 10 mg.kg⁻¹, com base na ausência de malformações na mais alta dose (GLYNN *et al.*, 2015).

Outro estudo avaliou a atividade teratogênica de droga antiepiléptica em cérebro de ratas, por meio da avaliação dos segmentos cefálicos dos animais estudados. A lamotrigina, droga utilizada no tratamento de convulsões tônico-clônicas parciais, secundariamente generalizadas, foi administrada na dose de 1,5 mg por intubação gástrica nos dias 9, 10 e 11 de

gestação (correspondente à organogênese). Os fetos foram examinados macroscopicamente, pesados e porções dos seus segmentos cefálicos foram dissecados. Preparações histológicas do córtex, subcórtex, epêndima e ventrículos laterais foram aleatoriamente escolhidos em 30% da prole e foram preparados para análise estereológica. Os resultados mostraram redução do peso dos fetos ao nascimento, dilatação ventricular, aumento de densidade da camada subcortical com aumento do diâmetro e volume da estrutura cerebral nos fetos do grupo tratado, evidenciando que a lamotrigina possui efeitos teratogênicos no cérebro de ratos (MARCHI; AZOUBEL; TOGNOLA, 2001).

Os efeitos da artemisinina no desenvolvimento fetal, droga utilizada no tratamento da malária, foram avaliados com o uso da droga em dois diferentes períodos de gestação em ratos Wistar. O medicamento foi administrado por gavagem, do 7º ao 13º dia ou do 14º ao 20º dia gestacional, em doses crescentes de 7, 35 ou 70 mg.kg⁻¹ por dia, durante 7 dias consecutivos. Para o primeiro grupo, no dia seguinte ao final do tratamento (14º dia de gestação), coletou-se o sangue para análise hormonal, além dos órgãos e embriões para avaliação. Os embriões viáveis, as perdas pós-implantação, bem como os níveis de progesterona e testosterona foram monitorados. Já para o segundo grupo, as progenitoras estiveram junto aos filhotes até o dia do desmame e os dados resultantes da gestação, perdas pós-implantação e fase final de desenvolvimento da prole foram avaliados. Os resultados indicam que não houve toxicidade materna em nenhum dos grupos de tratamento, contudo, houve toxicidade para o desenvolvimento em ambos os períodos, com menor sensibilidade na fase final da gestação. Os resultados evidenciaram que as doses de 35 e 75 mg.kg⁻¹ de artemisinina causaram altas porcentagens de perdas pós-implantação, o que foi correlacionado à tendência para redução da progesterona e testosterona maternas. Os achados demonstram que a administração de artemisinina pode afetar negativamente o desenvolvimento pós-implantação e a gestação em ratos Wistar (BOARETO *et al.*, 2008).

Como exposto anteriormente, atualmente estão descritos determinados mecanismos de ação pelos quais os fármacos podem se comportar como agentes teratogênicos, são eles: antagonismo do folato, rompimento das células da crista neural, desreguladores endócrinos dos hormônios sexuais, estresse oxidativo, rompimento vascular e afinidade de teratógenos por receptores ou enzimas específicas (VAN GELDER *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2017).

A Swedish Toxicology Science Research Center (2016) apresentou ainda mecanismos de ação potenciais especificamente do piriproxifeno, que poderiam estar relacionados a distúrbios no desenvolvimento neurológico, em especial a microcefalia, na tentativa de contribuição para a investigação das causas relacionadas à epidemia ocorrida no Brasil.

A primeira hipótese relaciona o uso do piriproxifeno a distúrbios no desenvolvimento neurológico por meio da sua interferência nos níveis de colesterol do indivíduo. Inicialmente, cabe relatar que estudos regulatórios com uso do piriproxifeno em animais, revelaram efeitos adversos sobre o fígado, e em determinados casos, alterações dos níveis de colesterol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Adicionalmente, sabe-se que os agentes que interferem com a biogênese do colesterol possuem potencial de teratogenicidade, induzindo a anomalias cerebrais holoprosencefálicas, as quais são caracterizadas pela ausência do desenvolvimento do prosencéfalo (lóbulo frontal do cérebro do embrião), como a microcefalia, e se assemelham à síndrome de *Smith-Lemli-Opitz*. Esta síndrome é caracterizada por malformações faciais e cerebrais, retardo do crescimento, defeitos dos membros e anormalidades genitais masculinas e possui forte relação com a microcefalia (ROUX *et al.*, 2000; SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016). Além disso, estudo demonstrou que determinados inibidores da síntese de colesterol são altamente teratogênicos em ratos, embora sua relação exata continue a ser esclarecida, contudo, o papel do colesterol no desenvolvimento embrionário deve ser levado em consideração na busca de causas da teratogenicidade (ROUX *et al.*, 2000).

Outra hipótese relatada refere-se à suposta correlação entre o piriproxifeno e a ocorrência de mutações em genes seletivos. Há um número crescente de genes humanos que foram associados ao desenvolvimento da microcefalia, como o KIF1 (com uma mutação pontual que leva à diminuição da proteína associada à microcefalia envolvida na formação de fuso mitótico), DYRK1A (cópia adicional na síndrome de *Down*, levando ao aumento da proteína associada à microcefalia), microcefalina e outras proteínas MCPH (importantes para a formação do fuso mitótico e a biogênese dos centrôsomos), além de uma variedade de outros genes identificados recentemente pelo sequenciamento do genoma integral (RAB3GAP1, RNASEH2B, ERCC8, CASK e BRCA2). Qualquer um desses produtos de genes pode agir como alvo molecular potencial para o piriproxifeno, assumindo uma exposição fetal suficiente. Além disso, pode ser que determinados genótipos particulares sejam mais suscetíveis do que outros e que isso também possa estar relacionado a sua distribuição geográfica e étnica diferenciada (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

Relatou-se ainda a possível relação entre o desenvolvimento de alterações neurológicas e o gene *Methoprene-tolerant* (Met). O principal alvo molecular para o piriproxifeno na larva do mosquito foi definida como a proteína Met, que é ativada após sua ligação com o inseticida e codifica um fator de transcrição contendo os domínios bHLH-PAS. As proteínas bHLH-PAS são expressas em diferentes áreas do cérebro e sob diferentes períodos

da embriogênese, podendo regular a transcrição de genes que são importantes para o desenvolvimento neurológico, predominantemente a proliferação e diferenciação de células neuroprogenitoras. Portanto, mostra-se plausível que o piriproxifeno seja capaz de interferir nessas ligações durante os estágios iniciais do neurodesenvolvimento (CHARLES *et al.*, 2011; SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

A interrupção do hormônio tireoideiano apresenta-se como uma possibilidade para a causa de alterações neurológicas. Os estudos de triagem regulatória relatados pela Environmental Protection Agency (2015) indicaram que o piriproxifeno possa interagir com o sistema endócrino de mamíferos. Adicionalmente, sabe-se que os hormônios tireoidianos (TH) desempenham um papel essencial no desenvolvimento de todos os vertebrados, e em especial, no neurodesenvolvimento adequado. O sistema nervoso central é particularmente sensível a deficiências no TH. A disponibilidade e a ação no cérebro são reguladas precisamente por vários mecanismos, incluindo a secreção de TH pela glândula tireoidea, o transporte de TH para o cérebro e células neurais, a ativação e inativação de TH por enzimas metabólicas e, no feto, pela passagem transplacentária de TH materno. A entrada de tiroxina (T4) e de triiodotironina (T3) no cérebro é facilitada por transportadores específicos que, se sofrerem mutações, acarretam em dificuldade na transferência de T4 e T3 através da barreira hematoencefálica. Além disso, está claro que no início da função da glândula tireoide fetal, o cérebro fetal depende da tireoide materna. O hormônio tireoideiano primeiro cruza a placenta e depois a barreira hematoencefálica. O transporte diferencial de T4 e T3 tem uma consequência importante: a hipotiroxinemia materna, ou seja, o baixo nível de T4 no soro materno com T3 e níveis de TSH dentro da faixa normal, é uma causa de transtornos do desenvolvimento neurológico (BERNAL, 2015; SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016; BÁREZ-LÓPEZ; GUADAÑO-FERRAZ, 2017).

Diante do exposto, mostra-se importante considerar ainda que, embora raros, existem casos evidentes de diferenças no potencial teratogênico entre as diferentes espécies animais (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

Tradicionalmente, os estudos experimentais em animais fornecem a base de triagem para verificação do potencial teratogênico de um determinado agente e possuem o papel fundamental de elucidar os princípios e mecanismos de teratogênese, no entanto, apresentam dificuldades na identificação de teratógenos humanos, devido às diferenças genéticas entre as espécies. Como exemplo, pode-se citar os corticosteroides, que são potentes teratógenos em roedores, mas aparentemente seguros para o homem; por outro lado, a talidomida, um teratógeno potente para o homem, é aparentemente seguro para a maioria dos animais

(LEMONICA, 2001). Além disso, vários medicamentos como a fenitoína (HOLMES *et al.*, 2001) e o metotrexato (HYOUN; OBICAN; SCIALLI, 2012) possuem alerta de riscos no uso durante a gravidez e na possibilidade da ocorrência microcefalia, apesar de terem sido submetidos a testes normativos em animais. Em cada caso particular, o mecanismo da teratogênese é objeto de contínuo estudo por parte da comunidade científica (SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER, 2016).

A avaliação de risco para o homem dos efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento intra-uterino envolve três etapas: a condução de estudos em animais e, se possível, no homem; a avaliação dos dados obtidos nesses estudos e o uso destes dados na avaliação de risco para a reprodução humana. Uma avaliação adequada para essa extrapolação requer dados suficientes, conhecimento amplo e familiaridade com os estudos, muitas vezes complexos. Assim, a avaliação de risco de novas moléculas ou de moléculas suspeitas de causar danos à reprodução humana baseia-se na importância dos testes *in vitro* e *in vivo*. Devido a inúmeras dificuldades encontradas em muitos casos para se considerar os resultados experimentais como válidos para a população humana, dados referentes a estudos epidemiológicos são, quando disponíveis, extremamente importantes para estabelecer essa correlação (LEMONICA, 2001).

7 CONCLUSÕES

A administração oral do inseticida piriproxifeno, nas doses de 100, 300 ou 500 mg.kg⁻¹ por dia, durante o período de organogênese fetal em ratas Wistar, para avaliação da toxicidade pré-natal, nos permite concluir que:

- Não provocou toxicidade materna sistêmica, uma vez que não acarretou em alteração no consumo de água e ração, nem na massa relativa dos órgãos das progenitoras dos diferentes grupos testados. A redução do ganho de massa corporal observada nas progenitoras do grupo 5P apresentou-se transitória, apenas durante o período de tratamento, e não foi constatada presença de diarreia, piloereção, estresse, tremores, hemorragia, aborto ou outras alterações sistêmicas nos diferentes grupos avaliados.
- Pode interferir no desenvolvimento fetal da progênie, por ter sido constatado aumento da média da massa corporal individual dos fetos, após a administração da maior dose testada (500 mg.kg⁻¹ por dia);
- Desencadeou alterações esqueléticas nos grupos tratados, especialmente nas doses mais altas testadas (300 e 500 mg.kg⁻¹ por dia), sugestivas de retardo no desenvolvimento esquelético;
- Não produziu efeitos teratogênicos, malformações externas ou alterações sugestivas de microcefalia nos fetos dos diferentes grupos avaliados.

Diante dos resultados encontrados, conclui-se que a administração do inseticida piriproxifeno em ratas Wistar possa interferir na gestação de fêmeas tratadas no período organogênico, no que se refere ao desenvolvimento fetal.

Por fim, diante da situação potencialmente complexa de risco para a saúde humana, mostra-se importante a execução de investigações adicionais por meio de estudos em outras espécies animais, juntamente com estudos epidemiológicos, de forma a contribuir com a avaliação de risco para o uso do piriproxifeno em água potável.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. *et al.* Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, art. 0003702. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003702>>. Acesso em: 3 maio 2016.
- ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; LUZ, S. L. B. Mosquito-disseminated insecticide for citywide vector control and its potential to block arbovirus epidemics: entomological observations and modeling results from Amazonian Brazil. **PLoS Medicine**, v. 14, art. 1002213, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002213>>. Acesso em: 3 out. 2017.
- ABO-ELGHAR, G. E.; FUJIYOSHI, P.; MATSUMURA, F. Significance of the sulfonyleurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 743-752, ago. 2004.
- ADAM, M. P.; POLIFKA, J. E.; FRIEDMAN, J. M. Evolving knowledge of the teratogenicity of medications in human pregnancy. **American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)**, v. 157, n. 3, p. 175–182, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.c.30313/abstract;jsessionid=C99942C6B14C04CA7B70A0F98F8CEA65.f01t02>>. Acesso em: 27 dez. 2017.
- ALIVERTI, V. *et al.* The extent of fetal codification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, p. 237-242, 1979.
- ANDRADE, A. M. *et al.* Farmacocinética e mecanismos de teratogenicidade dos medicamentos na gestação: uma revisão de literatura. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 29, p. 100-107, 2017. Disponível em: <<http://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=1929>>. Acesso em: 3 dez. 2017.
- ARAGÃO, M.F.V. *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **The BMJ**, v. 353, ed. 1901, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/30130859_Clinical_features_and_neuroimaging_CT_and_MRI_findings_in_presumed_Zika_virus_related_congenital_infection_and_microcephaly_Retrospective_case_series_study>. Acesso em 05 out. 2017.
- ASHWAL, S. *et al.* Practice parameter: evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 73, n. 11, p. 887-97, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/jped/v92n3/pt_0021-7557-jped-92-03-0230.pdf>. Acesso em: 20 out. 2017.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

BÁREZ-LÓPEZ, S.; GUADAÑO-FERRAZ, A. Thyroid hormone availability and action during brain development in rodents. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/7719/6d174693c27986f36aea60a9aac743f6fbd7.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

BAR-YAM, Y.; PARENS, R.; MORALES, A. J. Is Zika the cause of microcephaly? Status Report November 4, 2016. **New England Complex Systems Institute**, 2016. Disponível em: <<http://necsi.edu/research/social/pandemics/statusreport4>>. Acesso em: 03 out. 2017.

BERNAL, M.D. Thyroid hormones in brain development and function. In: GROOT, L. J. *et al.* **Thyroid disease manager**. South Dartmouth: Endocrine Education, Inc, 2015. Disponível em: <<http://www.thyroidmanager.org/chapter/thyroid-hormones-in-brain-development-and-function/>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

BERNARDI, M. M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 807-826.

BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Exposição aos medicamentos durante o período do desenvolvimento. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 900-908.

BEYER *et al.* ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Research**, v. 92, p. 36–51, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, vol. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOARETO *et al.* Toxicity of artemisinin [*artemisia annua* L.] in two different periods of pregnancy in wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 25, p. 239-246, 2008.

BRASIL. Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009a. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm>. Acesso em: 30 abr. 2016.

BRASIL. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm>. Acesso em: 14 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 28/2017**. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/agosto/16/BE-2017_024-Monitoramento-integrado-de-alteracoes-no-crescimento-e-desenvolvimento-relacionadas-a-infeccao-pelo-virus-Zika.pdf>. Acesso em: 9 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. **Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue**. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2009b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf>. Acesso em: 22 out. 2017.

BRASIL. Portaria Ministério da Saúde/Gabinete do Ministro nº 1.172, de 17 de junho de 2004. Regulamenta a NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal, na área de Vigilância em Saúde, define a sistemática de financiamento e dá outras providências. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2004/prt1172_15_06_2004.html>. Acesso em: 10 out. 2017.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 34, de 16 de agosto de 2010. Regulamento técnico para produtos saneantes e desinfestantes. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_34_2010.pdf/0259adb1-e660-467c-be79-b1e165fd9e71>. Acesso em: 10 out. 2017.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 60, de 10 de outubro de 2014. Regulamento técnico para concessão e renovação do registro de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867994/%283%29RDC_60_2014_COMP.pdf/e9edc5a3-9fec-4f0e-9b66-f8edfe5ace61>. Acesso em: 10 out. 2017.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, 6. ed, p. 653-660, jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26897108>>. Acesso em: 05 out. 2017.

CARLSON, B. M. **Embriologia humana e biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 505.

CARMICHAEL, S. L., YANG, W., SHAW, G. M. Periconceptional nutrient intakes and risks of neural tube defects in California. **Birth Defects Research Part A, Clinical and Molecular Teratology**, v. 88, p. 670–678, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2929981/>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

CHAHOUD, I. **Atlas of external and skeletal anomalies in rats**. Berlin: Institute of Toxicology and Embryopharmacology FU, Leipzig: Pr & C GmbH, 1996. CD-ROM.

CHAHOUD, I.; BOCHERT, G., NEUBERT, D. Dose response relationships in reproductive toxicology. In: NEUBERT, D.; KAVLOCK, R. J.; MERKER, H.J., KLEIN, J. (eds.). Risk assessment of prenatally-induced adverse health effects. [S.I.]: **Springer-Verlag**, 1992. p. 227-244.

CHAHOUD, I. *et al.* Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the second workshop on the terminology in developmental toxicology Berlin, 27-28 august 1998. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 77-82, 1999a.

CHAHOUD, I. *et al.* Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, vol. 13, p. 375-381, 1999b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623899000350>>. Acesso em: 18 out. 2017.

CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Dose-response relationships of rat fetal skeleton variations: relevance for risk assessment. **Environmental Research**, v. 109, p. 922-929, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682677>>. Acesso em 23 dez. 2017.

CHAHOUD, I. *et al.* Postnatal investigation of prenatally induced effects on the vertebral column of rats reduces the uncertainty of classification of anomalies. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 15-23, 2015.

CHARLES, J. *et al.* Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, methoprene-tolerant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21128-21133, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/108/52/21128.full>>. Acesso em: 28 dez. 2017.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Resolução n. 1.000, de 11 de maio de 2012. Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Brasília: CFMV, 2012b.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA (CFMV). Sistema CFMV/CRMVs. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais: conceitos e procedimentos recomendados**. v. 1. Brasília: CFMV, 2012a.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013**. Brasília: CONCEA, 2013a.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília: CONCEA, 2013b.

COSTA, P. P. **Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos**. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo, 2005.

CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, ed. 7606, p. 1-15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature18296>>. Acesso em: 26 set. 2017.

DICKE, J. M. Teratology: principles and practice. **Medical Clinics of North America**, vol. 73, p. 567-582, 1989.

DURHAM, W. F.; WILLIAMS, C. H. Mutagenic, teratogenic, carcinogenic 6022 properties of pesticides. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p. 123–148, 1972. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.17.010172.001011?journalCode=ento>>. Acesso em: 18 out. 2017.

DZIECIOLOWSKA, S. *et al.* The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. **Scientific Reports**, art. 40067. 7 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep40067>>. Acesso em: 26 set. 2017.

EBISUI, L.; FONTES, R. S.; LAPCHIK, V. B. V. Rato. In: LAPCHIK, V. B. V; MATTARAI, V. G. M.; KO, G. M. (Orgs.). **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009.

EICKMANN, S. H. *et al.* Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 32, n. 7, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2016000700601#B12>. Acesso em: 12 out. 2017.

EL GENDY, M. M. *et al.* The teratogenic effects of imatinib mesylate on rat fetuses. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 654-663, 2015. Disponível em: <<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC5598385&blobtype=pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO - AGÊNCIA BRASIL. **RS suspende uso de larvicida pyriproxyfen no combate ao mosquito *Aedes***. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-02/rs-suspende-larvicidapyriproxyfen-usado-em-caixas-dagua-para-combater-aedes>>. Acesso em: mai. 2016.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. **Federal Register**, Washington, v. 61, n. 212, p. 56274-56322, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Memorandum**: endocrine screening program (EDSP): weight of evidence analysis of potencial interaction with estrogen, androgen and thyroid pathways - chemical: pyriproxifen. 2015. Disponível em: <http://yworlds.com/content/uploads/2016/02/EPA-pyriproxyfen-129032_2015-06-29_trx00571401.pdf>. Acesso: em 29 dez. 2017.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Memorandum**: pyriproxyfen. human health risk assessment for the request to add uses on herb subgroup 19a, and the expansions of existing crop group uses to numerous crop subgroups. 2012. Disponível em: <<https://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2011-1012-0005>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Special report on environmental endocrine disruption**: an effects assessment and analysis, U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012. Washington D. C, 1997.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY (ECHA). **Directive 98/8/EC concerning the placing of bicial products on the market**: assessment report, Pyriproxifen (product type 18). 2012.

Disponível em: <http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/ActiveSubstances/0061-18/0061-18_Assessment_Report.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2017.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation (EC) n° 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. **Official Journal of the European Union**, Bruxelas, 31 dez 2008. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:en:PDF>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation (EC) n° 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures: last amended by regulation (EU) N° 2015/1221. **Official Journal of the European Union**, Bruxelas, 25 jul 2015. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32015R1221>>. Acesso em: 26 dez. 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Conclusions on pesticide peer review of Pyriproxifen**. N° EFSA-Q-2009-00239. EFSA Journal, v. 7, n. 8, ago. 2009. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/336r.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2017.

EUROPEAN SURVEILLANCE OF CONGENITAL ANOMALIES (EUROCAT). **A review of environmental risk factors for congenital anomalies**: special report. Newtownabbey: EUROCAT, 2004. Disponível em: <<http://www.eurocat-network.eu/content/Special-Report-Env-Risk-I-and-II.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guideline for industry detection of toxicity to reproduction for medicinal products**. 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074950.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Prescription drug advertising: content and format for labeling of human prescription drugs. Rules and regulations. 44 **Federal Register** 37451, 1979.

FOURRIER, J. *et al.* Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxifen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. **PloS One**, v. 10, n. 7. 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132985>>. Acesso em: 10 abr. 2016.

GLYNN, M. *et al.* Eflinaconazole: developmental and reproductive toxicity potential of a novel antifungal azole. **Reproductive Toxicology**, v. 52, p. 18-25, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623814003189>>. Acesso em 28 dez. 2017.

GOMES, J.; LLOYD, O. L.; HONG, Z. Oral exposure of male and female mice to formulations of organophosphorus pesticides: congenital malformations. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 231-240, 2008.

GOODMAN, W. G.; GRANGER, N. A. The juvenile hormones. In: LAWRENCE, I. G.; KOSTAS, I.; SARJEET, S. G. **Comprehensive molecular insect science**. Oxford: Elsevier, 2005. v. 3. p. 319-408.

HARRIS, S. R. Measuring head circumference: update on infant microcephaly. **Canadian Family Physician**, v. 61, p. 680-684, 2015. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/3214/bcc569f663bfbcdb9e70474300e1eff1527.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2017.

HEYMANN, D. L. *et al.* Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? **Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 719-721, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/26876373/>>. Acesso em: 10 out. 2017.

HIRSCH, A. J. *et al.* Zika virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 3, art. 1006219, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006219>>. Acesso em: 29 set. 2017.

HOLLENBACH, C. B. *et al.* Reproductive toxicity assessment of origanum vulgare essential oil on male wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1, p. 1295-1301, 2015. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/actascivet/article/view/26602/27700>>. Acesso em: 29 dez. 2017.

HOLMES, L. B. *et al.* The teratogenicity of anticonvulsant drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1132-1138, 2001. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200104123441504#t=articleTop>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

HYOUN, S. C.; OBICAN, S. G.; SCIALLI, A. R. Teratogen update: methotrexate. **Birth Defects Research**, v. 94, 4. ed., p. 187-2017, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bdra.23003/epdf>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Vector-borne diseases: understanding the environmental, human health, and ecological connections**. Washington: The National Academies Press, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452451>>. Acesso em: 15 out. 2017.

KOYAMA, Y. *et al.* A six month chronic dietary toxicity study of pyriproxyfen in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 14, p. 43-64, 1989. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts1976/14/1/14_1_43/_pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 5, art. 646, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000646>>. Acesso em: 5 abr. 2016.

LEMONICA, I. P. Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

LEMONICA, I. P. Toxicologia da reprodução. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 100-113.

LEMONICA; DAMASCENO, D. C.; DI-STASI, L. C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, São Paulo, v. 29, n. 2, p.223-227, fev. 1996.

LI, C. *et al.* Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016. Disponível em: <[http://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909\(16\)30084-4](http://www.cell.com/cell-stem-cell/fulltext/S1934-5909(16)30084-4)>. Acesso em: 2 dez. 2017.

LINTON, S. *et al.* Potential endocrine disruption of ovary synthesis in the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* by the insecticide pyriproxyfen. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 154, n. 3, p. 289-297, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643309000476>>. Acesso em: 2 abr. 2016.

LIU, T. X. Effects of a juvenile hormone analog, pyriproxyfen, on Thrips tabaci (Thysanoptera: Thripidae). **Pest Management Science**, v. 59, n. 8, p. 904-912, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.701/pdf>>. Acesso em: 1 mai. 2016.

LOURENÇO, A. C. S. *et al.* Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 407-413, 2009.

MARCHI, N. S. A.; AZOUBEL, R.; TOGNOLA, W. A. Teratogenic effects of lamotrigine on rat fetal brain. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 2, p. 362-364, 2001.

MARCONDES, F. K; BIANCHI, F. J; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.

MARTIN, M. *et al.* Household exposure to pesticides and bladder exstrophy in a newborn baby boy: a case report and review of the literature. **Jornal of Medical Case Reports**, 2009, 3:6626. Disponível em: <<https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-3-6626>>. Acesso em: 06 set. 2016.

MATTAR, *et al.* Case report: microcephaly associated with Zika virus infection, Colombia. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 423, 4 out. 2017. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12879-017-2522-6?site=bmcinfectdis.biomedcentral.com>>. Acesso em: 04 out. 2017.

MATSUMOTO, M. *et al.* Prenatal developmental toxicity of gavage or feeding doses of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 292-297, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623810000146?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 out. 2017.

MAYNARD, L.; HOUFFSCHMITT, P.; LEBREUX, B. Field efficacy of a 10% pyriproxyfen spot-on for the prevention of flea infestations on cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 42, n. 10, 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2001.tb02454.x/pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

MELLO, J. R. B; LANGELOH, A. Avaliação da toxicidade reprodutiva e teratogenicidade. In: RHODEN, E. L.; RHODEN, C. R. **Princípios e técnicas em experimentação animal**. Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 455-464.

MELLO, M. S. C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

MELO, A. S. *et al.* A infecção intra-uterina do vírus Zika causa anormalidades cerebrais do feto e microcefalia: ponta do iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6-7, jan. 2016. Disponível em: <<http://microbiologia.yolasite.com/resources/zika%20x%20anormalidade%20cerebral.pdf>>. Acesso: em 5 out. 2017.

MEOLA, R. *et al.* Effect of pyriproxyfen in the blood diet of cat fleas on adult survival, egg viability, and larval development. **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 37, n. 4, p. 503-506, jul. 2000.

MICHAEL, K. R. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. **Trends in Parasitology**, Riverside, v. 21, n. 5, p. 232-236, maio 2005.

MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>>. Acesso em: 5 out. 2017.

MLAKAR, J. *et al.* Zika virus associated with microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 951–958, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1600651>>. Acesso em: 20 out. 2017.

MOORE, K. L; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

NITZSCHE, D. Effect of maternal feed restriction on prenatal development in rats and rabbits: a review of published data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 95-103, 2017.

NORONHA, L. *et al.* Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287-293, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000500287>. Acesso em: 05 out. 2017.

OHBA, S. Y. *et al.* The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. **PloS One**, v. 8, n. 7, art. 67045, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0067045>>. Acesso em: 20 out. 2017.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for the testing of chemicals**. 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oecd/oecd_gl414.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2016.

PADILLA-TORRES, S. D. *et al.* Modeling dengue vector dynamics under imperfect detection: three years of site-occupancy by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban Amazonia. **PloS One**, v. 8, n. 3, art. 58420, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0058420>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Regional Zika epidemiological update (Americas)**. 25 Aug 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691>. Acesso em: 08 out. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. **Ministério da saúde declara fim da emergência nacional de Zika e microcefalia**. 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/28347-ministerio-da-saude-declara-fim-da-emergencia-nacional-para-zika-e-microcefalia>>. Acesso em: 06 out. 2017.

PORTAL DA SAÚDE. **Orientações para uso do larvicida pyriproxifen no controle do *Aedes aegypti***. 2014. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/30/Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2016.

RAMOZ, L.L.; PATEL-SHORI, N.M. Recent changes um pregnancy and lactation labeling: retirement of risks categories. **Pharmacotherapy**, v. 34, 4. ed., p. 389-395, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/phar.1385/abstract>>. Acesso em: 23 dez. 2017.

RANG, H. *et al.* **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

REIS, V. **Nota técnica sobre microcefalia e doenças vetoriais relacionadas ao *Aedes aegypti***: os perigos das abordagens com larvicidas e nebulizações químicas – fumacê. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://www.abrasco.org.br/site/2016/02/nota-tecnica-sobre-microcefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagens-com-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/>>. Acesso em: 30 abr. 2016

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In: KLAASEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons**. 6. ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

ROGERS, J. M.; KALVLOCK, R. J. Toxicologia do desenvolvimento. In: KLAASEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Cassarett e Doull**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 137-148.

ROUX, C. *et al.* Role of cholesterol in embryonic development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1270-1279, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10799401>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

SADLER, T. W. **Embriologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. A. Agentes empregados no controle de ectoparasitas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDO, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 567-583.

SCHÜLER-FACCINI, L. *et al.* Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141381232002000100006&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em 28 dez. 2017.

SCHÜLER-FACCINI, L.; SCHVARTZMANN, L.; CECCHIN, C. R. Teratogênese Humana e o SIAT. In: SPRITZER, D. T.; SANSEVERINO, M. T. V.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de teratogênese**. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

SIHUINCHA, M. *et al.* Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (**Diptera: Culicidae**) in Iquitos, Perú. **Journal of Medicine Entomology**, v. 42, n. 4, p. 620-630, 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article/42/4/620/911821>>. Acesso em: 18 abr. 2016.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SOLECKI *et al.* Harmonisation of rat fetal skeletal terminology and classification. Report of the Third Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology. Berlin, 14-16 September 2000. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 713-721, 2001. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/966b/82ae86a3afa3e04bc3ac51f3a18085bf29f8.pdf>>. Acesso em: 21 out. 2017.

SULLIVAN, J.; GOH, K. Environmental fate and properties of pyriproxyfen. **Journal of Pest Science**, Sacramento, v. 33, n. 4, p. 339-350, out. 2008.

SWEDISH TOXICOLOGY SCIENCE RESEARCH CENTER (SWETOX). **Pyriproxyfen and microcephaly: an investigation of potential ties to the ongoing “Zika epidemic”**. Södertälje: mar 2016. Disponível em: <<http://swetox.se/wp-content/uploads/2016/03/ppf-zika.pdf>>. Acesso em 2 de out. 2017.

TAY, J.; LEE, C. Influences of pyriproxyfen on fecundity and reproduction of the Pharaoh Ant (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 3, p. 1216-1233, 2014. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/0022-0493-98.6.2169>>. Acesso em: 28 mar. 2016.

TAYLOR, W. R.; VAN DYKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, n. 2, p. 107-119. 1985. Disponível em: <<http://sfi.mnhn.fr/cybium/numeros/1985/92/01-Taylor%5b92%5d107-119.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

TIAN, Y. *et al.* Teratogenicity and developmental toxicity of chlorpyrifos. Maternal exposure during organogenesis in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p. 267-270, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062380500033X>>. Acesso em 04 out. 2017.

VAN GELDER, M. M. H. J., DE JONG-VAN DEN BERG, L. T. W., ROELEVELD, N. Drugs associated with teratogenic mechanisms. Part II: a literature review of the evidence on human risks. **Human Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 168–183, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article/29/1/168/628180>>. Acesso em: 23 dez. 2017.

VAN GELDER, M. M. H. J. *et al.* Drugs associated with teratogenic mechanisms. Part I: dispensing rates among pregnant women in the Netherlands, 1998-2009. **Human Reproduction**, v. 29, n. 1, p. 161–167, 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article/29/1/161/628059>>. Acesso em 23 dez. 2017.

VAN GELDER, M. M. H. J. *et al.* Teratogenic mechanisms of medical drugs. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 4, p. 378–394., 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/det370>>. Acesso em: 27 dez. 2017.

VENTURA, C. V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 79, p. 1-3, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492016000100002>. Acesso em: 15 out. 2016.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354209004951?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 out. 2017.

WISMER, T.; MEANS, C. Toxicology of newer insecticides in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 42, n. 2, p. 335-347, mar. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Doença do vírus Zika**. Geneva: WHO, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>. Acesso em: 6 out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for Drinking-water quality**. Geneva: WHO, 2011. Disponível em: <http://www.unicef.org/cholera/Chapter_4_prevention/01_WHO_Guidelines_for_drinking_water_quality.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Microcephaly: fact sheet**. Geneva: WHO, 2016b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/en/>>. Acesso em: 29 set. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pesticides and their application - for the control of vectors and pests of public health importance.** Geneva: WHO, 2006a.

Disponível em:

<http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPEPES_GCDPP_2006.1_eng.pdf>.

Acesso em: 5 abr. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pyriproxyfen:** 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether. 2006b. Disponível em:

<http://www.who.int/whopes/quality/en/pyriproxyfen_eval_pecs_WHO_jul2006.pdf>.

Acesso em: 13 abr. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Pyriproxyfen in drinking-water:** use for vector control in drinking- water sources and containers. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO statement on the first meeting of the international health regulations (2005) (ihr 2005) emergency committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations.** Geneva: WHO, 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>>. Acesso em 10 out. 2017.

XU, Q. *et al.* Effects of Pyriproxyfen on Female Reproduction in the Common Cutworm, *Spodoptera litura* (F.) **PloS One**, v. 10, n. 10, art. 0138171, 2015. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0138171>>. Acesso em: 15 mar. 2016.