



## Avaliação da toxicidade pré-natal: estudo de teratogenicidade do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar

[Prenatal toxicity assessment: teratogenicity study of the insecticide pyriproxyfen in Wistar rats]

A.S. Sartori<sup>1</sup>, C.B. Hollenbach<sup>1</sup>, L.H. Jardim<sup>1</sup>, P. Silva<sup>2</sup>, F.B. Mello<sup>1,2</sup>, J.R.B. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Básicas da Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSA – Porto Alegre, RS

### RESUMO

Este estudo investigou a toxicidade pré-natal do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar, de forma a detectar possíveis alterações no desenvolvimento fetal da progênie exposta durante o período organogênico. Três doses de piriproxifeno (100, 300 e 500mg.kg<sup>-1</sup>) foram administradas por via oral às progenitoras, do sexto ao 15º dia de gestação. Os fetos foram submetidos à técnica de diafanização modificada descrita por Taylor e Van Dyke, para avaliação de malformações e alterações esqueléticas. Os resultados não demonstraram a ocorrência de toxicidade materna sistêmica ou alterações nos índices reprodutivos avaliados. Malformações ou alterações teratogênicas não foram detectadas, no entanto alterações esqueléticas sugestivas de retardo no desenvolvimento foram observadas especialmente nas doses mais altas testadas (300mg.kg<sup>-1</sup> e 500mg.kg<sup>-1</sup>). Considerando-se a situação complexa de risco para a saúde humana, mostra-se importante a execução de investigações adicionais, de modo a contribuir para a adequada avaliação de risco do piriproxifeno em água potável.

Palavras-chave: piriproxifeno, Zika vírus, toxicologia, teratogenicidade, microcefalia

### ABSTRACT

*This study investigated the prenatal toxicity of the insecticide pyriproxyfen in Wistar rats to detect the possible changes in the fetal development of the progeny exposed during the organogenic period. Three doses of pyriproxyfen (100, 300, and 500mg.kg<sup>-1</sup>) were administered orally to the progenitors, from day 6 to 15 of gestation. The fetuses were processed using the Taylor and Van Dyke modified diaphanization technique to evaluate malformations and skeletal changes. The results did not demonstrate the occurrence of systemic maternal toxicity or changes in the reproductive indexes evaluated. Malformations or teratogenic changes were not detected, however, skeletal changes suggestive of developmental delay were observed, especially in the highest doses tested (300 mg.kg<sup>-1</sup> and 500 mg.kg<sup>-1</sup>). Owing to the potentially complex situation regarding its risk to human health, it is important that further studies be performed to contribute to the risk assessment of the addition of pyriproxyfen in drinking water.*

*Keywords: pyriproxyfen, Zika virus, toxicology, teratogenicity, microcephaly*

### INTRODUÇÃO

Ao final de 2015, a epidemia de microcefalia ocorrida no Brasil acarretou uma série de manifestações de severidade variável entre os recém-nascidos, o que incluía malformações da cabeça, convulsões e abortamentos espontâneos, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS)

a declarar Emergência em Saúde Pública de Interesse Internacional (Heymann, *et al.*, 2016; World..., 2016). O fato coincidiu com o início do uso do piriproxifeno no país, estabelecido pelo Ministério da Saúde como uma das formas de controle do mosquito *Aedes aegypti* (Brasil, 2009; Reis, 2016), após a OMS ter recomendado seu uso em água potável, especialmente no controle da dengue (World..., 2006; 2017).

Recebido em 6 de fevereiro de 2019

Aceito em 23 de outubro de 2019

E-mail: amandassartori@hotmail.com

Diante do cenário de incertezas a respeito da epidemia, a exposição ao piriproxifeno bem como a infecção pelo Zyka vírus foram citadas como possíveis causas relacionadas à ocorrência das manifestações entre os recém-nascidos, o que levou a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco) a publicar uma nota técnica à época, a qual questionava o Ministério da Saúde a respeito da escolha do inseticida no controle químico do vetor (Reis, 2016).

Considerando-se que o piriproxifeno é um pesticida relativamente novo e que há um potencial de exposição direto por meio da água de bebida quando aplicado diretamente nos locais de armazenamento de água potável (World..., 2010), evidencia-se a necessidade de investigações adicionais em torno da sua potencial contribuição, isolada ou em combinação com o Zyka vírus, para a ocorrência de microcefalia (Swedish Toxicology Science Research Center, 2016).

Diante do exposto, optou-se por desenvolver o presente trabalho para investigação dos potenciais riscos toxicológicos decorrentes do uso do piriproxifeno em ratos Wistar, especialmente no que se refere à teratogenicidade, com fins de detecção de possíveis malformações externas e alterações esqueléticas na progênie exposta durante a fase da organogênese.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) (120 fêmeas e 40 machos), com idade inicial de 90 dias e padrão sanitário convencional, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (Creal) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em condições constantes de umidade ( $50\% \pm 5$ ), temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das oito às 20 horas). Utilizou-se ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/Paraná) e água *ad libitum*. O alojamento, o manejo, o tratamento e a eutanásia obedeceram às normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e às leis brasileiras, com aprovação pelo

Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da UFRGS, sob o nº 31414.

Os animais tratados com piriproxifeno (Sumitomo Chemical Co., Ltd., Japão) foram divididos aleatoriamente em três grupos, com 30 fêmeas cada: grupo tratado com  $100\text{mg.kg}^{-1}$  e veículo (1P), grupo tratado com  $300\text{mg.kg}^{-1}$  e veículo (3P) e grupo tratado com  $500\text{mg.kg}^{-1}$  e veículo (5P). O grupo controle negativo, com 30 fêmeas, foi tratado apenas com o veículo da solução de tratamento (3% tween 80 e água destilada) (CN). Os animais dos diferentes grupos receberam volume idêntico de solução ( $10\text{mL.kg}^{-1}$ ).

As fêmeas foram tratadas por via oral, com sonda orogástrica, do sexto ao 15º dia de gestação, o que compreende o período organogênico dos animais avaliados. Mensurou-se diariamente a massa corporal relativa e o consumo relativo de água e ração.

O acasalamento foi realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos e com 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 ao dia (das seis às oito horas), o que corresponde ao final do ciclo escuro. Após esse período, procedeu-se ao lavado vaginal, para observação da fase do ciclo estral e detecção de espermatozoides em microscópio óptico. O diagnóstico de gestação foi realizado na presença de espermatozoides associada à fase de estro do ciclo estral. A constatação de esfregaço vaginal positivo indicou o dia zero da gestação.

No 21º dia de gestação, procedeu-se à cesariana, para avaliação reprodutiva, teratogênica e análise de variáveis sistêmicas. Mensurada a massa corporal, as fêmeas receberam como medicação pré-anestésica fentanila ( $0,05\text{mg.kg}^{-1}$ ) e foram eutanasiadas com sobredose do anestésico tiopental sódico ( $50\text{mg.kg}^{-1}$ ) associado à lidocaína na concentração de  $10\text{mg.mL}^{-1}$ , por via intraperitoneal (IP). A massa dos órgãos (rins, coração, baço e fígado) foi mensurada e relacionada à massa corporal de cada fêmea (sem o útero). Após remoção e pesagem do útero gravídico, os filhotes foram sexados, pesados individualmente e avaliados macroscopicamente quanto à viabilidade, à presença de hematomas, às possíveis anomalias e malformações externas,

como conformação craniana, presença e forma de membros e cauda, entre outros. Os filhotes foram eutanasiados com uso de uma caixa hermeticamente fechada, contendo algodão embebido em isoflurano. O óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos. Posteriormente, os fetos foram identificados e fixados em formalina 5%. Uma vez removidos os botões embrionários, os sítios de implantação uterina foram avaliados visualmente. As perdas pós-implantação foram calculadas pelo número de sítios de implantação menos o de fetos nascidos, dividido pelo número de sítios de implantação, multiplicado por 100.

Os fetos foram submetidos à técnica de diafanização modificada descrita por Taylor e Van Dyke (1985), para avaliação de alterações esqueléticas. A análise das alterações encontradas foi realizada com uso de microscópio estereoscópico e classificada de acordo com Atlas de Anomalias Externas e Esqueléticas em Ratos (Chahoud, 1996).

As variáveis quantitativas foram primeiramente submetidas ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e ao teste de homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e, posteriormente, comparadas por meio da

análise de variância (ANOVA) ou 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 foram avaliadas por meio do teste qui-quadrado de independência e do teste de diferença de proporções (teste Z), respeitando-se os valores estatisticamente significativos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de P foi menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda nas fêmeas progenitoras dos diferentes grupos. O ganho de massa corporal das fêmeas nos dias dois, sete, 14 e 21 foi comparado com o dia um de gestação, conforme mostra a Tab. 1. Em análise aos dados, percebe-se que houve redução do ganho de massa corporal relativa apenas nos dias em que houve tratamento (dias sete e 14) nas fêmeas do grupo 5P (500mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno), tendo, ao final da gestação, no dia 21, a evolução da massa corporal voltado a ser equivalente entre os diferentes grupos, sem diferir estatisticamente.

Tabela 1. Evolução da massa corporal relativa de ratas Wistar tratadas com 100mg.kg<sup>-1</sup> (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> (3P) e 500mg.kg<sup>-1</sup> (5P) de piriproxifeno e 300mg.kg<sup>-1</sup> de tween 80 (CN), por via oral, com sonda orogástrica, do sexto ao 15º dia de gestação

Dias	Grupos				Valor-P*
	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	0,385
7	106,57 ± 0,733 <sup>a</sup>	105,95 ± 0,366 <sup>a,b</sup>	104,23 ± 0,580 <sup>b</sup>	106,60 ± 0,494 <sup>a</sup>	0,012
14	117,64 ± 0,832 <sup>a</sup>	117,56 ± 0,589 <sup>a</sup>	114,18 ± 0,645 <sup>b</sup>	117,08 ± 0,829 <sup>a</sup>	0,002
21	147,41 ± 1,673	147,22 ± 1,284	142,75 ± 1,204	144,00 ± 1,222	0,038

Os dados são expressos em média ± erro-padrão. \*ANOVA para medidas repetidas. Teste de comparações pareadas com ajuste de Bonferroni. Valores com a mesma letra, na segunda e terceira linhas, não são significativamente diferentes, considerando-se  $P < 0,05$ .

Para avaliação do consumo relativo de água e ração, foi realizada análise estatística dos seguintes períodos: entre os dias um e cinco (antes do tratamento), dias seis e 15 (durante o tratamento) e dias 16 e 21 (após o tratamento). Constatou-se que não houve diferença no

consumo de água entre os distintos grupos das progenitoras, independentemente do período ( $P=0,279$ ). Em relação ao consumo de ração, não foi constatada diferença entre os períodos ( $P=0,366$ ) nem entre os grupos ( $P=0,096$ ).

Quanto à massa relativa dos órgãos das progenitoras, não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos: rim direito (P=0,069), rim esquerdo (P=0,239), coração (P=0,258), baço (P=0,992), fígado (P=0,394) e útero gravídico (P=0,063).

A administração das três doses de piriproxifeno não acarretou diferenças significativas nos índices reprodutivos estudados nas progenitoras, como número de fetos por genitora e perdas pós-implantação, conforme mostra a Tab. 2.

Tabela 2. Índices reprodutivos de ratas Wistar expostas a 100mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno (3P), 500mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno (5P) e tween 80 (300mg.kg<sup>-1</sup>) (CN), do sexto ao 15º dia de gestação

Índices reprodutivos	Grupo				
	1P	3P	5P	CN	P
Número de progenitoras	27	25	25	22	
Número total de fetos	305	275	298	241	
Nº de fetos/genitora <sup>1</sup>	11,3 ± 0,500	11,0 ± 0,327	11,92 ± 0,294	10,91 ± 0,509	0,325
Perdas pós-implantação (%) <sup>2</sup>	1,27 ± 0,608	3,32 ± 1,695	1,86 ± 0,811	1,89 ± 1,218	0,868

Os dados representam a média ± erro-padrão. ANOVA<sup>1</sup> ou Kruskal-Wallis<sup>2</sup>.

A Tab. 3 apresenta os índices fetais obtidos no presente trabalho. Identificou-se diferença na média da massa corporal dos fetos do grupo 5P em comparação ao grupo CN. A administração de diferentes concentrações de piriproxifeno não resultou em diferenças significativas na

proporção entre os sexos (macho:fêmea). Além disso, não foram observados fetos com malformações macroscópicas externas, como alterações na conformação craniana, ausência ou alteração de forma de membros ou cauda, entre outras.

Tabela 3. Índices fetais de ratas Wistar tratadas com 100mg.kg<sup>-1</sup> (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> (3P) e 500mg.kg<sup>-1</sup> (5P) de piriproxifeno e 300mg.kg<sup>-1</sup> de tween 80 (CN), com sonda orogástrica, do sexto ao 15º dia de gestação

Índices fetais	Grupo				
	1P	3P	5P	CN	P
Número total de fetos	305	275	298	241	
Massa corporal ao nascimento (g) <sup>1</sup>	4,92 ± 0,028 <sup>a,b</sup>	4,89 ± 0,027 <sup>a,b</sup>	4,99 ± 0,024 <sup>a</sup>	4,90 ± 0,026 <sup>b</sup>	0,010
Proporção de sexo (macho:fêmea) <sup>2</sup>	0,8485:1	0,8333:1	0,8089:1	0,9127:1	0,919
Taxa de malformações externas (%)	0	0	0	0	

Os dados são expressos em média ± erro-padrão. <sup>1</sup>Kruskal-Wallis/Dunn-Bonferroni. Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes, considerando-se P<0,05. <sup>2</sup>Qui-quadrado.

A Tab. 4 apresenta alterações esqueléticas nos ossos da cabeça dos fetos avaliados, o que inclui alterações de forma, localização, tamanho e

calcificação, juntamente com a porcentagem de ocorrência das alterações entre os diferentes grupos e o valor P.

*Avaliação da toxicidade...*

Tabela 4. Ocorrência de anormalidades nos ossos da cabeça dos fetos de ratas Wistar tratadas com 100mg.kg<sup>-1</sup> (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> (3P) e 500mg.kg<sup>-1</sup> (5P) de piriproxifeno e 300mg.kg<sup>-1</sup> de tween 80 (CN), do sexto ao 15º dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo				P*
	1P (n = 305)	3P (n = 275)	5P (n = 298)	CN (n = 241)	
Alargamento de fontanela	44,92 <sup>a,c</sup>	49,09 <sup>a</sup>	66,33 <sup>b</sup>	35,68 <sup>c</sup>	< 0,001
Redução de fontanela	4,92	4,73	2,69	5,81	0,335
<b>Supraoccipital</b>					
Formato irregular	0,98	2,18	1,01	0,83	0,462
Ossificação incompleta	20,33 <sup>a,b</sup>	20,36 <sup>a,b</sup>	27,95 <sup>a</sup>	17,01 <sup>b</sup>	0,014
Centro adicional de ossificação	0	0,36	0	1,24	0,026
<b>Interparietal</b>					
Ossificação incompleta	1,31	1,09	1,68	0,83	0,853
Centro adicional de ossificação	5,25 <sup>a</sup>	3,64 <sup>a</sup>	13,47 <sup>b</sup>	6,22 <sup>a</sup>	< 0,001
<b>Parietais</b>					
Formato irregular	0,33	0	0	0	1,000
Ossificação incompleta	2,30	2,18	2,36	0	0,130
Centro adicional de ossificação	0,98 <sup>a</sup>	0	5,72 <sup>b</sup>	0,4 <sup>a</sup>	< 0,001
<b>Frontais</b>					
Formato irregular	0,33	0	0	0	1,000
Ossificação incompleta	0,33	0	0,67	0	0,568
<b>Nasal</b>					
Ossificação incompleta	0,33	0	0	0	1,000
<b>Incisivo</b>					
Ossificação incompleta	0,33	0	0	0	1,000
<b>Zigomático</b>					
Ossificação incompleta	1,64	1,82	2,02	0,41	0,462
Fusão	1,64	0,73	3,03	0	0,016
<b>Mandíbula</b>					
Ossificação incompleta	13,11 <sup>a,b</sup>	10,18 <sup>a,c</sup>	19,87 <sup>b</sup>	4,56 <sup>c</sup>	< 0,001
Encurtada	1,97	4,36	3,70	5,39	0,189
<b>Basisfenoide</b>					
Formato irregular	0	0,36	0	0,41	0,357
Ossificação incompleta	0	2,18	2,36	0,41	0,016
<b>Áxis</b>					
Formato irregular	0	0,36	0	1,24	0,026
Justaposição de parietais e frontais	4,92	4,36	6,73	4,56	0,560
Calota pobremente ossificada	3,93 <sup>a</sup>	13,09 <sup>b</sup>	4,71 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>	< 0,001

\*Qui-quadrado. Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Z, considerando-se P<0,05.

A Tab. 5 apresenta alterações ósseas de forma, localização, número e calcificação nos ossos da região cervical, do tórax, da lombar e da pelve

dos fetos, juntamente com a porcentagem de ocorrência das alterações entre os diferentes grupos e o valor P.

Tabela 5. Ocorrência de anormalidades nos ossos da região cervical, do tórax, da lombar e da pelve dos fetos de ratas Wistar tratadas com 100mg.kg<sup>-1</sup> (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> (3P) e 500mg.kg<sup>-1</sup> (5P) de piriproxifeno e 300mg.kg<sup>-1</sup> de tween 80 (CN), com sonda orogástrica, do sexto ao 15° dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo				P*
	1P (n = 305)	3P (n = 275)	5P (n = 298)	CN (n = 241)	
<b>Vértebras cervicais</b>					
Pobrememente ossificadas	1,97	2,18	0,34	0	0,027
<b>Clavícula</b>					
Posição irregular	0	0,36	0,34	0	0,721
<b>Escápula</b>					
Formato irregular	0,66	0	2,69	0	0,001
Ossificação incompleta	4,59 <sup>a,b</sup>	7,27 <sup>a</sup>	1,68 <sup>b</sup>	2,07 <sup>b</sup>	0,002
Parte ausente	5,25 <sup>a</sup>	12,00 <sup>b</sup>	2,02 <sup>a</sup>	12,03 <sup>b</sup>	< 0,001
<b>Vértebras torácicas</b>					
Ossificação incompleta	0,98	1,45	0,34	0,41	0,458
Centro bipartido	2,30	2,55	2,69	0,83	0,448
<b>Costelas</b>					
Onduladas	3,61	2,55	4,71	6,64	0,124
Ausentes	0,33	0,73	2,02	0,83	0,171
14° vestigial	27,87	24,73	29,97	20,33	0,065
14° rudimentar	1,31	0,73	0,34	0,83	0,605
<b>Estérnebras</b>					
Formato irregular	72,46 <sup>a,b</sup>	76,73 <sup>a</sup>	75,08 <sup>a</sup>	64,32 <sup>b</sup>	0,009
Pobrememente ossificadas	26,89 <sup>a</sup>	26,9 <sup>a</sup>	14,81 <sup>b</sup>	22,41 <sup>a,b</sup>	0,001
Ausente	3,61	4,73	2,69	1,66	0,231
<b>Vértebras lombares</b>					
Ossificação incompleta	0,66	1,45	2,69	0	0,024
Pobrememente ossificadas	1,64	1,82	0	0	0,024
<b>Ílio</b>					
Pobrememente ossificado	1,64	0,73	0	0	0,033
<b>Ísquio</b>					
Pobrememente ossificado	2,30	1,82	0	0,41	0,022
<b>Púbis</b>					
Pobrememente ossificado	2,30	1,82	0,34	0,83	0,148
<b>Vértebras sacrais</b>					
Pobrememente ossificadas	3,28	3,64	0,67	1,24	0,039

\*Qui-quadrado. Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Z, considerando-se P<0,05.

### Avaliação da toxicidade...

A Tab. 6 apresenta alterações ósseas relativas à calcificação nos ossos dos membros torácicos e pélvicos fetais, juntamente com a porcentagem

da ocorrência entre os diferentes grupos e o valor P.

Tabela 6. Ocorrência de anormalidades nos ossos dos membros torácicos e pélvicos dos fetos de ratas Wistar tratadas com 100mg.kg<sup>-1</sup> (1P), 300mg.kg<sup>-1</sup> (3P) e 500mg.kg<sup>-1</sup> (5P) de piriproxifeno e 300mg.kg<sup>-1</sup> de tween 80 (CN), com sonda orogástrica, do sexto ao 15º dia de gestação

Anormalidades (%)	Grupo				P*
	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	0,020
Falanges (membros torácicos)					
Não ossificadas	53,44 <sup>a</sup>	55,64 <sup>a</sup>	68,35 <sup>b</sup>	60,58 <sup>a,b</sup>	0,001
Fêmur					
Pobremente ossificado	1,31	2,91	0,67	0,00	0,017
Tíbia e fíbula					
Pobremente ossificadas	2,62 <sup>a,b</sup>	4,36 <sup>a</sup>	4,04 <sup>a</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,034
Metatarsos					
Pobremente ossificados	5,57 <sup>a,b</sup>	8,73 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a,b</sup>	2,49 <sup>b</sup>	0,024
Falanges (membros pélvicos)					
Não ossificadas	76,07 <sup>a</sup>	78,18 <sup>a,b</sup>	80,13 <sup>a,b</sup>	86,31 <sup>b</sup>	0,024

\*Qui-quadrado. Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste Z, considerando-se P<0,05.

### DISCUSSÃO

O presente estudo foi delineado para avaliação do potencial teratogênico do piriproxifeno sobre a progênie exposta durante o período organogênico, em ratos Wistar. A diminuição do ganho de massa corporal das progenitoras, a redução na ingesta de água e alimentos, bem como a presença de sinais clínicos evidentes de toxicidade, foram utilizadas para avaliação da toxicidade materna (European Commission, 2008; 2015). Os resultados do estudo demonstraram redução do ganho de massa corporal relativa nas progenitoras expostas a 500mg.kg<sup>-1</sup> do inseticida, contudo essa redução restringiu-se aos dias avaliados em que houve tratamento. Não foram constatados sinais clínicos evidentes de toxicidade aguda nem alterações no consumo de água ou ração entre as progenitoras dos diferentes grupos avaliados. Os resultados são semelhantes ao evidenciado pela World Health Organization (2010), que 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 100mg.kg<sup>-1</sup> por dia de piriproxifeno e, ainda, redução do peso corporal e/ou do consumo de alimento.

As alterações no peso relativo dos órgãos também são parâmetros indicadores de toxicidade materna (Lourenço *et al.*, 2009). No presente estudo, a massa relativa dos órgãos avaliados, como fígado, rins, coração, baço e útero gravídico, não diferiu estatisticamente entre os grupos, o que se mostra semelhante aos resultados de estudos de toxicidade pré-natal do piriproxifeno em ratos relatados pela World Health Organization (2010) e Environmental Protection Agency (2012).

A interpretação das alterações nas taxas reprodutivas pode identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos se estabeleceram nos animais (Lourenço *et al.*, 2009). No presente

trabalho, a administração das três doses de piriproxifeno não provocou alterações nos índices reprodutivos avaliados, como diferenças no número de fetos por genitora ou perdas pós-implantação. Abortamentos ou partos anteriores ao 21º dia de gestação também não foram observados. Os resultados diferem dos estudos referenciados pela World Health Organization (2010), que relatam interferência do piriproxifeno na ocorrência de redução no número de implantações, abortamentos e partos prematuros em estudo de toxicidade reprodutiva em ratos.

A média da massa corporal individual fetal evidenciou-se superior no grupo tratado com 500mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno em comparação ao controle, o que, somado ao fato de que as ninhadas do mesmo grupo apresentaram-se mais numerosas do que as demais, embora sem se diferirem estatisticamente, poderia ser interpretado como consequência de uma melhor condição física das fêmeas.

Os defeitos esqueléticos e as alterações macroscópicas externas dos fetos foram utilizados na avaliação do potencial teratogênico do piriproxifeno. Na análise dos defeitos esqueléticos, realizada posteriormente à técnica da diafanização modificada descrita por Taylor e Van Dyke (1985), identificou-se a presença de alterações ósseas nos fetos dos três grupos tratados com o inseticida. Nos ossos da cabeça, constatou-se maior ocorrência de alargamento de fontanela e centro adicional de ossificação em interparietal e parietal, nas doses mais altas testadas em relação ao controle, alterações que, segundo Solecki *et al.* (2001), classificam-se como variações. A detecção de ossificação incompleta em supraoccipital e mandíbula bem como de calota pobremente ossificada apresentaram-se superiores em grupos tratados quando comparados ao controle. Segundo Chahoud e Paumgartten (2009), a aparente diminuição da quantidade de osso mineralizado, como 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 que essas observações sejam transitórias, de menor impacto na sobrevivência ou na saúde do

indivíduo. As ossificações atrasadas são, portanto, incluídas nas variações do esqueleto, segundo os autores citados.

Na avaliação dos ossos do tórax, observou-se aumento na detecção de escápula com ossificação incompleta no grupo tratado com 300mg.kg<sup>-1</sup> de piriproxifeno, em relação ao controle, e um aumento na ocorrência de escápula com parte ausente no mesmo grupo tratado e no controle, em comparação aos demais. Segundo Chahoud *et al.* (1992), o aumento da frequência de anomalias também pode ocorrer em fetos do grupo controle, sendo chamadas anomalias espontâneas, as quais podem ser designadas como variações. As esternébras apresentaram forma marcadamente irregular nos grupos que receberam as maiores doses do inseticida em relação ao controle, alteração essa que pode ser considerada como variação por Chahoud *et al.* (1999) e Chahoud e Paumgartten (2009). Não foram detectadas alterações significativas nos ossos da região cervical, na lombar e na pelve nem nos membros torácicos, quando comparados ao controle. Em relação aos membros pélvicos, a presença de tíbia e fíbula pobremente ossificadas mostrou-se superior nos grupos testados com as mais altas doses em relação ao controle, tendo a detecção de metatarso pobremente ossificado se apresentado superior no grupo que recebeu a dose intermediária do piriproxifeno.

Diante da análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se perceber que as alterações observadas classificam-se como variações, as quais são caracterizadas por atraso no desenvolvimento esquelético do indivíduo, enquanto as malformações, que são representadas pela ausência de ossos importantes, ossos malposicionados, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias ou fusões (Solecki *et al.*, 2001; Chahoud *et al.*, 2015), não foram encontradas. Além disso, a análise externa aos fetos dos diferentes grupos não evidenciou animais com malformações ou alterações macroscópicas externas. Percebe-se, portanto, que os resultados do presente trabalho são compatíveis com os apresentados pela European Food Safety Authority (2009) e European Chemicals Agency (2012). Os estudos de toxicidade do desenvolvimento apresentados por essas Organizações, com o uso do piriproxifeno em ratos e coelhos, não



evidenciaram efeitos teratogênicos nos fetos avaliados. Nesse mesmo contexto, a Environmental Protection Agency (2012) relatou estudo de toxicidade do desenvolvimento em ratos, com a administração de 1000mg.kg<sup>-1</sup> por dia de piriproxifeno, 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.

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 variações provocadas por agentes químicos 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, essa perturbação da formação óssea normal pode dar origem a um resultado diferente e mais severo (Chahoud *et al.*, 1992; Chahoud e Paumgarten, 2009).

### CONCLUSÕES

Diante do relatado, o presente estudo sugere que a administração oral do inseticida piriproxifeno, nas doses de 100, 300 ou 500mg.kg<sup>-1</sup> por dia, durante o período organogênico, em ratos Wistar, acarreta alterações esqueléticas sugestivas de retardo no desenvolvimento, especialmente nas doses mais altas testadas (300 e 500mg.kg<sup>-1</sup> por dia); entretanto, efeitos teratogênicos, malformações ou alterações sugestivas de microcefalia não foram observados. Por fim, diante da situação potencialmente complexa de risco para a saúde humana, sugere-se a execução de investigações adicionais, por meio de estudos em outras espécies animais, de forma a contribuir para a adequada avaliação de risco do uso do piriproxifeno em água potável.

### REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2009. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_nacionais\\_prevencao\\_controle\\_dengue.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf)>. Acessado em: 22 out. 2017.
- CHAHOUD, I. *Atlas of external and skeletal anomalies in rats*. Berlin: Institute of Toxicology and Embryopharmacology FU, 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.l.]: Springer-Verlag, 1992. p.227-244.
- CHAHOUD, I.; BUSCHMANN, J.; CLARK, R. *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. *Reprod. Toxicol.*, v.13, p.77-82, 1999.
- CHAHOUD, I.; PAUMGARTEN, F.J.R. Dose-response relationships of rat fetal skeleton variations: relevance for risk assessment. *Environ. Res.*, v.109, p.922-929, 2009.
- CHAHOUD, I.; TALSNESS, C.E.; WALTER A. *et al.* Postnatal investigation of prenatally induced effects on the vertebral column of rats reduces the uncertainty of classification of anomalies. *Reprod. Toxicol.*, v.58, p.15-23, 2015.
- ENVIRONMENTAL Protection Agency. *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. Available in: <<https://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2011-1012-0005>>. Accessed in: 30 Apr. 2016.
- EUROPEAN Chemicals Agency. *Directive 98/8/EC concerning the placing of bical products on the market: assessment report, Pyriproxifen (product type 18)*. 2012. Available in: <[http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/ActiveSubstances/0061-18/0061-18\\_Assessment\\_Report.pdf](http://dissemination.echa.europa.eu/Biocides/ActiveSubstances/0061-18/0061-18_Assessment_Report.pdf)>. Accessed in: 29 Dec. 2017.

- EUROPEAN Commission. Regulation (EC) n° 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. Bruxelles: Official Journal of the European Union, 31 Dec. 2008. Available in: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:en:PDF>>. Accessed in: 26 Dec. 2017.
- EUROPEAN Commission. Regulation (EC) n° 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures: last amended by regulation (EU) N° 2015/1221. Bruxelles: Official Journal of the European Union, 25 Jul. 2015. Available in: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32015R1221>>. Accessed in: 26 Dec. 2017.
- EUROPEAN Food Safety Authority. Conclusions on pesticide peer review of *Pyriproxyfen*. N° EFSA-Q-2009-00239. *EFSA J.*, v.7, n.8, 2009. Available in: <[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/336r.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/336r.pdf)>. Accessed in: 20 Jul. 2018.
- HEYMANN, D.L.; HODQSON, A.; SALL, A.A. et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet*, v.387, p.719-721, 2016. Available in: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/26876373/>>. Accessed in: 10 Jul. 2018.
- LOURENÇO, A.C.S.; MIGUEL, L.K.; GUARIDO, K.L. et al. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embrionário. *Rev. Bras. Plantas Med.*, v.11, p.407-413, 2009.
- 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/>>. Acessado em: 30 jun. 2018.
- SOLECKI, R.; BÜRGIN, H.; BUSCHMANN, J. 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. *Reprod. Toxicol.*, v.15, p.713-721, 2001.
- SWEDISH Toxicology Science Research Center (). *Pyriproxyfen and microcephaly: an investigation of potential ties to the ongoing “Zika epidemic”*. Södertälje: Swetox, 2016. Available in: <<http://swetox.se/wp-content/uploads/2016/03/ppf-zika.pdf>>. Accessed in: 2 Jul. 2018.
- 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, p.107-119. 1985.
- WORLD Health Organization. *Doença do vírus Zika*. Geneva: WHO, 2016. Available in: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>. Accessed in: 6 Jul. 2018.
- WORLD Health Organization. *Pesticides and their application - for the control of vectors and pests of public health importance*. Geneva: WHO, 2006. Available in: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_CDS\\_NTD\\_WHOPEP\\_GCDPP\\_2006.1\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_WHOPEP_GCDPP_2006.1_eng.pdf)>. Accessed in: 5 Jul. 2018.
- WORLD Health Organization. *Pyriproxyfen: 4-phenoxyphenyl (RS)-2-(2-pyridyloxy) propyl ether*. 2017. Available in: <[http://www.who.int/whopes/quality/Pyriproxyfen\\_ev\\_al\\_specs\\_WHO\\_July\\_2017.pdf](http://www.who.int/whopes/quality/Pyriproxyfen_ev_al_specs_WHO_July_2017.pdf)>. Accessed in: 13 Jul. 2018.
- WORLD Health Organization. *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: WHO, 2010. Available in: <[https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/pyriproxyfenvector.pdf](https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/pyriproxyfenvector.pdf)>. Accessed in: 10 Dec. 2018.