

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
(Segmento II) do Inseticida Piriproxifeno em Ratas Wistar infectadas laboratorialmente com
vírus Zika

ALESSANDRA SANTOS WEISS

PORTO ALEGRE

2022

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
(Segmento II) do Inseticida Piriproxifeno em Ratas Wistar infectadas laboratorialmente com
vírus Zika

Autora: Alessandra Santos Weiss

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

2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Santos Weiss, Alessandra
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-NATAL - Estudo de
Teratogenicidade (Segmento II) do Inseticida
Piriproxifeno em Ratas Wistar infectadas
laboratorialmente com vírus Zika / Alessandra Santos
Weiss. -- 2022.
71 f.
Orientador: Prof. Dr. 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, 2022.

1. Piriproxifeno. 2. Teratogenia. 3. Zika Vírus. I.
Braga de Mello, Prof. Dr. João Roberto, orient. II.
Título.

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

Alessandra Santos Weiss

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-NATAL – Estudo de Teratogenicidade
(Segmento II) do Inseticida Piriproxifeno em Ratas Wistar infectadas laboratorialmente com vírus Zika

Aprovada em

APROVADA POR:

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

Prof. Dr. Régis Adriel Zanette
Membro da Comissão

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

Prof. Dr. Marcelo Lacerda Grillo
Membro da Comissão

Dedico aos meus pais, Anelice e Romeu, pela educação e amor, aos meus irmãos Bruna e Lucas pelo carinho, e ao meu marido, Douglas, pelo amparo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais Anelice e Romeu, pelo amor, incentivo emocional e financeiro nessa longa jornada, e também ao meu marido, Douglas, pelo amor e ombro amigo em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, por me dar a chance de viver essa experiência acadêmica, pela paciência e por todo o conhecimento que vou sempre ser muito grata.

Meus sinceros agradecimentos à Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira pelos ensinamentos, pela amizade e pelo apoio importantíssimo para a conclusão deste trabalho, sempre me animando e me dizendo que eu era capaz quando nem eu acreditava mais em mim.

À Clarissa BoemlerHollenbach e Amanda Santos Sartori, Gisele Barcelos Seberino, Raquel Luísa Breunig pela ajuda nas dúvidas e questionamentos em relação a execução do experimento e por partilhar o conhecimento ao longo destes anos.

À Fernanda Bastos de Mello pelo apoio e orientação.

A todos estagiários que contribuíram para que o trabalho fosse executado da melhor maneira possível.

A toda equipe do CREAL o meu agradecimento pela ajuda, dedicação e apoio ao longo do desenvolvimento do experimento.

Aos professores e colaboradores do PPGCV que me auxiliaram durante estes anos.

RESUMO

Doenças transmitidas por mosquitos estão entre as ameaças de saúde pública mais desafiadoras em todo o mundo e o controle de vetores urbanos são especialmente problemáticos porque podem transmitir patógenos para grandes populações de seres humanos suscetíveis, causando epidemias. O impacto social causado pelo vírus Zika, e a recomendação do uso do piriproxifeno como um pesticida de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti* passaram a gerar especulações a respeito da epidemia de microcefalia no Brasil ao final do ano de 2015. As evidências disponíveis até o momento indicam fortemente que o vírus Zika está relacionado à ocorrência de microcefalias, contudo o inseticida piriproxifeno também foi apontado como uma das possíveis causas da epidemia de microcefalia no Brasil. Considerando-se os escassos dados disponíveis sobre a toxicidade do piriproxifeno e sua interação com uma infecção de vírus Zika, e a sua possível relação com o aumento da incidência de microcefalia em recém-nascidos, este estudo investigou os potenciais riscos toxicológicos da utilização do piriproxifeno concomitante a uma infecção por vírus Zika, contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança do seu uso durante a fase da organogênese em ratos Wistar, e a possível interação de ambos. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos – grupo controle negativo (Grupo I), grupo tratado com 500mg/Kg de piriproxifeno (Grupo II), grupo infectado com vírus Zika (Grupo III) e grupo tratado com 500mg/Kg de piriproxifeno e infectado com vírus Zika (Grupo IV). As fêmeas foram tratadas por gavagem, com auxílio de sonda orogástrica, do 6° ao 15° dia de gestação, conforme segmento II, recomendado 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. As ratas prenhas dos grupos III e IV foram infectadas com vírus Zika isolado no Brasil (ZIKV 17). As fêmeas dos grupos infectados receberam 1×10^6 UPF (Unidades formadoras de placas) de ZIKV 17 pela via intraperitoneal, em 500µl de meio de cultivo no 9° dia gestacional (D9). No 21° 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 demonstram que não foi observada toxicidade materna sistêmica em nenhum dos grupos testados, não sendo observadas alterações de massa corporal relativa das progenitoras, e no consumo de água e ração. Além disso, não foi constatada a presença de diarreia, piloereção, estresse, tremores, hemorragia, aborto, óbito ou outras alterações nos grupos tratados e grupo controle, evidenciando reduzido potencial de toxicidade. Em relação as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie e seus efeitos teratogênicos, todos os grupos tratados e o controle apresentaram alterações sugestivas de retardo no desenvolvimento ósseo dos fetos, os três tratamentos testados durante a organogênese não provocaram malformações externas. Pela análise dos fetos dos diferentes grupos é possível identificar alterações ósseas na cabeça e nas regiões cervical, torácica, lombar e pélvica. Levando em conta as alterações observadas na cabeça é possível inferir na interação entre piriproxifeno e Zika (GIV) pelo aumento da ocorrência de supraoccipital com formato irregular, supraoccipital com ossificação incompleta, zigomático com fusão e calota pobremente ossificada, em relação ao tratamento isolado com piriproxifeno (GII) e Zika (GIII). Os achados observados não parecem estar relacionados com a ocorrência de microcefalia. Diante dos resultados encontrados é possível identificar também interação entre piriproxifeno e Zika no aumento do número de perdas pré-implantação em relação ao tratamento isolado.

Palavras chave: Desenvolvimento Fetal. Pesticida. Piriproxifeno. Teratogenia. Microcefalia. Vírus Zika

ABSTRACT

Mosquito-borne diseases are among the most challenging public health threats worldwide, and urban vector control is especially problematic because they can transmit pathogens to large populations of susceptible humans, causing epidemics. The social impact caused by the Zika virus, and the recommendation to use pyriproxyfen as a pesticide for the focal control of Aedes aegypti mosquito larvae started to generate speculation about the microcephaly epidemic in Brazil at the end of 2015. The evidence available so far strongly indicates that the Zika virus is related to the occurrence of microcephaly, however the insecticide pyriproxyfen was also identified as one of the possible causes of the microcephaly epidemic in Brazil. Considering the limited data available on the toxicity of pyriproxyfen and its interaction with a Zika virus infection, and its possible relationship with the increased incidence of microcephaly in newborns, this study investigated the potential toxicological risks of using pyriproxyfen concomitant with a Zika virus infection, contributing to the elucidation of questions related to the safety of its use during the organogenesis phase in Wistar rats, and the possible interaction of both. The females were randomly divided into 4 groups - negative control group (Group I), group treated with pyriproxyfen 500mg/Kg (Group II), group infected with Zika virus (Group III) and group treated with pyriproxyfen 500mg/Kg and infected with Zika virus (Group IV). Females were treated by gavage, with the aid of 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 pregnancy, the dams were monitored for changes in relative body mass, water and feed consumption. Group III and IV pregnant rats were infected with Zika virus isolated in Brazil (ZIKV 17). The females of the infected groups received 1×10^6 PFU (plaque forming units) of ZIKV 17 intraperitoneally, in 500 μ l of culture medium on the 9th gestational day (D9). On the 21st day of gestation, the females were euthanized for reproductive, teratogenic and systemic variables evaluation. Fetuses were evaluated for embryotoxicity and the presence of external malformations and skeletal changes. The results demonstrate that no systemic maternal toxicity was observed in any of the groups tested, with no changes in the relative body mass of the dams, in the consumption of water and feed. Furthermore, the presence of diarrhea, piloerection, stress, tremors, hemorrhage, abortion, death or other alterations was not observed in the treated and control groups, evidencing a reduced potential for toxicity. Regarding the possible alterations in the development of the progeny and its teratogenic effects, all the treated groups presented alterations suggestive of delay in the bone development of the fetuses, the three treatments tested during the organogenesis do not provoke external malformations. By analyzing the fetuses of the different groups, it is possible to identify bone alterations in the head and in the cervical, thoracic, lumbar and pelvic regions. The changes in the head can indicate the interaction between pyriproxyfen and Zika (GIV) administered concomitantly by the increased occurrence of irregularly shaped supraoccipital, incompletely ossified supraoccipital, zygomatic with fusion and poorly ossified cap, in relation to treatment with pyriproxyfen alone (GII) and Zika (GIII). The observed findings do not seem to be related to the occurrence of microcephaly. In view of the results, it is also possible to identify the interaction between pyriproxyfen and Zika in the increase in the number of pre-implantation losses in relation to the isolated treatment.

Key words: Fetal development. Pesticide. Pyriproxifen. Teratogeny. Microcephaly. Zika Virus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Bandeja aberta contendo filhotes de progenitoras do grupo controle..... 344
- Figura 2 - Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (**n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente**). 366
- Figura 3 - Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (**n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente**). 388
- Figura 4 - Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente). 400
- Figura 5 – Perda pré-implantação observada na fêmea de número 94 do grupo GII tratado com piriproxifeno. 422
- Figura 6 - Fêmea 55 GIII tratada com veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika. Ninhada com 13 filhotes, sendo o oitavo da esquerda para a direita desproporcionalmente pequeno em comparação com os demais..... 45
- Figura 7 - Fetos diafanizados tratados e do grupo controle submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985) 46
- Figura 8 - Feto de progenitora grupo GII apresentando esternobra de tamanho reduzido 48
- Figura 9 - Feto de progenitora grupo GII apresentando costela vestigial 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Evolução da massa corporal relativa do 1° ao 21° dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV).	377
Tabela 2 - Evolução do consumo relativo de água das fêmeas nos grupos do 1° ao 21° dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV).	39
Tabela 3 - Evolução do consumo relativo de ração das fêmeas nos grupos do 1° ao 21° dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV).	411
Tabela 4 - Massa relativa dos órgão de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).	422
Tabela 5 - Índices reprodutivos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).	433
Tabela 6- Índices fetais de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg ⁻¹ e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).	444
Tabela 7 - Ocorrência de anormalidades nos ossos da cabeça dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).	47
Tabela 8 - Ocorrência de anormalidade s nos ossos da região cervical, tórax, lombar e pelve dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).	49
Tabela 9 - Ocorrência de anormalidades nos ossos dos membros torácicos e pélvicos dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9°	

dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6° ao 15° dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente). 51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Piriproxifeno	17
3.1.1 Mecanismos de Ação.....	17
3.1.2 Usos do Piriproxifeno.....	17
3.1.3 Toxicidade do Piriproxifeno.....	19
3.2 Avaliação Toxicológica.....	24
3.2.1 Testes sobre toxicidade reprodutiva	24
3.3 Vírus Zika e Microcefalia	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Obtenção do Piriproxifeno e do Material Viral.....	29
4.2 Protocolo experimental para toxicidade pré-natal- teratogenicidade (Segmento II).29	
4.2.1 Animais.....	29
4.2.2 Delineamento experimental.....	30
4.2.3 Gestação	31
4.2.4 Eutanásia e Celiotomia	32
4.3 Processo de coloração de fetos e diagnóstico de alterações ósseas	33
4.3.1 Variáveis Avaliadas.....	34
4.4 Análise Estatística.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Avaliação de toxicidade materna	36
5.1.1 Massa corporal relativa.....	36
5.1.2 Consumo relativo de água	37
5.1.3 Consumo relativo de ração	39
5.1.4 Massa relativa dos órgãos.....	41
5.1.5 Índices reprodutivos	42
5.2 Avaliação da embriotoxicidade	43
5.2.1 Avaliação dos fetos.....	43
5.2.2 Alterações esqueléticas.....	45
6 DISCUSSÃO	52
6.1 Toxicidade materna.....	53
6.2 Toxicidade fetal.....	57
7 CONCLUSÕES.....	63
REFERENCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

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

O vírus Zika pertence à família Flaviridae e ao gênero *Flavivirus* (THIEL *et al.*, 2005). O Zika vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, em Uganda, a partir de uma amostra de soro de um macaco Rhesus que servia de sentinela para estudo vigilância da febre-amarela (DICK *et al.*, 1952). No Brasil foi identificado por método de biologia molecular em maio de 2015 (BRASIL, 2017a). As malformações congênitas, dentre elas a microcefalia, têm etiologia complexa e multifatorial, podendo ocorrer em decorrência de processos infecciosos durante a gestação. As evidências disponíveis até o momento indicam fortemente que o vírus Zika está relacionado à ocorrência de microcefalias. No entanto, como esta condição pode depender de diversos fatores como, a carga viral, fatores do hospedeiro, momento da infecção ou presença de outros fatores, é fundamental continuar os estudos para descrever melhor a história natural dessa doença. (BRASIL, 2015).

Diante do impacto social causado pelo vírus Zika, se observa que doenças transmitidas por mosquitos afetam desproporcionalmente as classes menos privilegiadas da população brasileira, de várias maneiras. O vírus Zika teve impacto maior no Nordeste, nos estados de Bahia, Pernambuco e Rio Grande do Norte, onde uma percentagem maior da população é pobre e as condições climáticas são mais favoráveis à propagação de vírus transmitidos por mosquitos do que no Sul, mais rico e menos tropical.(LESSER; KITRON, 2016). Dentre esses fatores, destacam-se o surgimento de aglomerados urbanos, inadequadas condições de habitação, irregularidade no abastecimento de água, destinação imprópria de resíduos, o crescente trânsito de pessoas e cargas entre países e as mudanças climáticas provocadas pelo aquecimento global (BRASIL, 2009).

As estratégias de controle atuais de *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 humanas (WHO, 2009; BRASIL, 2009). Infelizmente, ambas as espécies *Aedes* procriam-se em pequenos recipientes de retenção de água que podem ser difíceis de detectar, levando a baixa

cobertura nos locais de reprodução em campanhas de controle. Isso explica parcialmente porque 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 durante as campanhas de controle. O controle de mosquitos é crucial para a prevenção de infecção e o 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, foram detectadas populações de *Aedes aegypti* resistentes a inseticidas em determinados países. Níveis significativos de resistência a organofosforados, piretroides, carbamatos e organoclorados foram documentados (WHO, 2009). Diante da ocorrência de resistência, químicos alternativos têm sido requeridos para melhorar o controle do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (OHBA *et al.*, 2013).

O Ministério da Saúde estabeleceu o uso de piriproxifeno como uma das formas de controle focal das larvas do mosquito *Aedes aegypti* no ano de 2009 (BRASIL, 2009). 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 (WHO, 2006a; 2006b).

O piriproxifeno é um inseticida análogo ao hormônio juvenil de insetos, com atividade ovicida e larvicida, tendo sido primeiramente sintetizado e desenvolvido na década de 90, pela empresa Sumitomo Chemical Co. Ltd. (SULLIVAN; GOH, 2008; WISMER; MEANS, 2012).

Possíveis ligações entre a infecção pelo vírus Zika na gravidez e microcefalia do feto estão sob investigação desde o mês de outubro de 2015, quando o Ministério da Saúde informou um aumento anormal de casos de microcefalia nos estados da região Nordeste do Brasil (BRASIL, 2017c). Em janeiro de 2016, a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) publicou um 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. No documento, foi questionado o papel do modelo de controle químico do vetor, o qual abrange o piriproxifeno, utilizado pelo Governo Brasileiro a partir do segundo semestre de 2014, após a ocorrência 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. No entanto, há um potencial de exposição direto através da água de bebida quando aplicado diretamente nos locais de armazenamento de água potável (WHO, 2011).

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção (toxicidade crônica), durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento, continuamente até sua maturação sexual (toxicidade peri e pós-natal) (LEMONICA, 2001). Os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos: Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” para avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” no qual ocorre a exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal”, em que são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento antes e após o nascimento das progênies expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e lactacional. Estes testes são adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA, 1996) e recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA, 1994) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 2001).

O objetivo do presente estudo será a avaliação da toxicidade pré-natal (Segmento II), através da exposição de ratas Wistar ao piriproxifeno e ao vírus Zika, de forma a avaliar possíveis efeitos no desenvolvimento fetal e efeitos teratogênicos na progênie exposta durante o período de organogênese (6º ao 15º dia de gestação). A realização do estudo citado é de extrema importância para atestar que a substância em estudo e a exposição concomitante ao vírus não exerça atividade tóxica durante a fase de organogênese nos animais testados. Busca-se uma possível interação entre o piriproxifeno e o vírus Zika na etiologia de anomalias crâniocerebrais observadas na doença viral.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar os potenciais riscos toxicológicos da utilização do piroxicam concomitante a uma infecção por vírus Zika, no que se refere à toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade, contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança do seu uso durante a fase da organogênese em ratos Wistar, e a possível interação de ambos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do piroxicam sobre as possíveis alterações no desenvolvimento fetal da progênie exposta durante a fase de organogênese.

- Avaliar os efeitos do piroxicam na dose de 500mg/Kg quanto à possibilidade de produzir maiores efeitos teratogênicos na progênie exposta durante a organogênese concomitantemente ao vírus Zika.

- Buscar uma possível interação entre o piroxicam e o vírus Zika na etiologia de anomalias craniocerebrais observadas na doença viral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Piriproxifeno

O piriproxifeno é um análogo do hormônio juvenil de insetos, tendo atividade ovicida e larvicida (WISMER; MEANS, 2012). Possui como nome químico (2- [1-metil-2- (4-fenoxifenoxi) etoxi]piridina) e foi primeiro sintetizado e desenvolvido pela Sumitomo Chemical Co. Ltd. na década de 90 (SULLIVAN; GOH, 2008).

3.1.1 Mecanismo de Ação

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 (HJ) 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 de HJ no inseto, resultando em forte supressão da embriogênese, metamorfose, formação do adulto e esterilidade em vários insetos pragas (ABO-ELGHAR; FUJIYOSHI; MATSUMURA, 2004; LIU, 2003).

3.1.2 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). É particularmente eficaz contra esses insetos, apresentando inibição de mais de 95% do surgimento de mosquitos, e não possui efeito sobre as populações de predadores (SULLIVAN; GOH, 2008). O piriproxifeno é um larvicida altamente eficaz com o potencial para ser uma excelente intervenção contra a dengue (e outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*) (SIHUINCHA *et al.*, 2005). O inseticida tem baixa toxicidade para mamíferos e é recomendado pela OMS para o tratamento de água potável contra o mosquito (SULLIVAN; GOH, 2008). Em 2006, foi um dos quatro inseticidas (temephós, metopreno, piriproxifeno e permetrina) e larvicida bacteriano (*Bacillus thuringiensis israelensis*) recomendados pela Organização Mundial da Saúde para ser adicionado à água de bebida com fins de saúde pública, especialmente para controle da dengue, na dose não superior à 0,01 mg/L (0,01 ppm) (WHO,

2006a; 2006b). Atualmente, o WHO *Pesticide Evaluation Scheme* (WHOPES), organização internacional que executa avaliações de pesticidas para uso em saúde pública, avaliou e listou compostos larvicidas (diflubenzuron, metopreno, novaluron, pirimiphos metil, piriproxifeno, spinosad e temephós) e larvicida bacteriano (*Bacillus thuringiensis israelensis*) para o controle de mosquitos em locais de armazenamento de água. Pesticidas utilizados para controle de vetores em água potável devem seguir rigorosamente as recomendações do rótulo e só devem ser os aprovados para esse uso pelas autoridades nacionais, levando em consideração a formulação utilizada na fabricação do produto final. As doenças transmitidas por vetores são causas importantes de morbidade e mortalidade; portanto, mostra-se importante alcançar equilíbrio adequado entre a ingestão dos pesticidas a partir da água potável e o controle de insetos transmissores de doenças. Ressalta-se que todo esforço deve ser feito para 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. O uso de larvicidas deve ser apenas uma parte de um abrangente plano de gestão de resíduos e de armazenamento doméstico de água, o qual não se baseia exclusivamente na aplicação de inseticidas, mas também inclui outras medidas de gestão ambiental e mudança de comportamento social (WHO, 2011).

No Brasil, o Ministério da Saúde incluiu o piriproxifeno como uma das alternativas no controle focal de formas imaturas (larvária) 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, 2009). 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 do Japão, sendo este, portanto o larvicida adquirido para uso no país (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

O piriproxifeno é também eficaz contra outros insetos com importância em saúde pública, como moscas e baratas, 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).

Piriproxifeno protege gatos de recorrência da infestação por pulgas por cerca de seis meses (MAYNARD; HOUFFSCHMITT; LEBREUX, 2001), apesar de não matar pulgas e carrapatos adultos. Isso ocorre porque o produto é um potente agonista do hormônio juvenil e disruptor endócrino (SULLIVAN; GOH, 2008), inibindo o desenvolvimento larval e a maturação (MEOLA *et al.*, 2000). Na agricultura e horticultura, o piriproxifeno tem uso registrado para o controle de mosca branca, pulgões e lagartas (SULLIVAN; GOH, 2008).

No Brasil, são utilizados ainda outros produtos contendo piriproxifeno: *My Pet Plus Spray*®, *My Pet Plus Strip On*® e *Vectra 3D*®, para controle de pulgas e carrapatos em cães e gatos; *Pulgoff Ambiente*®, para controle de pulgas e carrapatos no ambiente doméstico e *Tiger 100 CE*®, utilizado na agricultura, como agrotóxico.

3.1.3 Toxicidade do Piriproxifeno

O grupo científico de especialistas internacionais administrado conjuntamente pela Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (WHO), responsável por conduzir avaliações de risco de pesticidas para fins regulatórios (*Joint Meeting on Pesticides Residues - JMPR*) estabeleceu a IDA (ingestão diária aceitável) de 0-0,1 mg/kg de peso corporal para o piriproxifeno, com base em uma classificação geral da NOAEL (menor dose sem efeito toxicológico detectável) de 10 mg/kg de peso corporal por dia, considerando-se o aumento do peso relativo do fígado e aumento da concentração total de colesterol no plasma em cães machos em dois estudos de 1 ano de toxicidade e usando um fator de segurança 100.

Não é considerado adequado estabelecer valores de referência formais para piriproxifeno utilizado em água potável, no controle de vetores. A dose máxima recomendada em água potável é de 0,01 mg/l, 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. A baixa solubilidade e o coeficiente de partição octanol-água do piriproxifeno indicam que é improvável que permaneça em solução na dose máxima recomendada, o que representa um provável nível de exposição ainda mais baixo do que o calculado (WHO, 2011).

Após revisão da literatura científica disponível sobre os dados toxicológicos do piriproxifeno, para avaliação da segurança do seu uso na água de bebida, a Organização Mundial da Saúde elaborou o documento “*Pyriproxyfenon Drinkind-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sourcesand Containers*” (WHO, 2010, p.2-5), o qual contempla as seguintes informações relevantes sobre o assunto:

Após administração oral, 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 piriproxifeno absorvido é excretado principalmente por via biliar (34-37% da dose administrada em 48 horas). O metabolismo da substância é qualitativamente semelhante em ratos, camundongos, cabras em lactação e galinhas poedeiras. A toxicidade oral aguda de piriproxifeno é baixa, com valores de DL 50 (dose letal mediana - dose necessária para causar a morte 50% da população) superiores a 5000 mg/kg de peso em camundongos, ratos e cães. A toxicidade cutânea aguda também é baixa, com DL 50 superior a 2000 mg/kg em camundongos e ratos. O piriproxifeno é moderadamente irritante para o olho, mas não para pele de coelhos. O piriproxifeno não foi carcinogênico quando administrado na dieta, em doses até 420 mg/kg por dia em camundongos, e em doses até 140 mg/kg 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 por dia. JMPR concluiu que o piriproxifeno não representam um risco cancerígeno para os seres humanos. Piriproxifeno não foi genotóxico em uma variedade de testes de mutagenicidade e citogenicidade *in vitro* e *in vivo*.

A toxicidade reprodutiva de piriproxifeno em ratos foi avaliada em estudo envolvendo o tratamento de machos e fêmeas antes e durante estágios iniciais da gestação (segmento 1) e em outro, com tratamento durante o período pré-natal e lactação (segmento 3). O NOAEL para toxicidade materna foi de 1000 mg/kg, equivalente à 98 mg/kg de peso corporal por dia, no estudo de duas gerações, e 100 mg/kg de peso corporal por dia, no estudo do segmento 3. A toxicidade reprodutiva foi observada apenas no estudo segmento 3, 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 (500 mg/kg de peso corporal por dia). O NOAEL de toxicidade reprodutiva foi de 300 mg/kg de peso corporal por dia. Não foi observada toxicidade reprodutiva no estudo de duas gerações, com NOAEL sendo 5000 mg/kg, equivalente a 340 mg/kg de peso corporal por dia, a dose mais elevada testada, ou no estudo do segmento 1, com NOAEL de 1000 mg/kg de peso corporal por dia, a dose mais elevada testada.

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*”, contemplando informações importantes e dados toxicológicos do piriproxifeno.

Com base em estudos com doses repetidas de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães, concluiu-se que o fígado e os rins são os principais órgãos- alvo, com leve anemia nos roedores. Adicionalmente, redução do peso corporal, ganho de peso e/ou consumo de alimento foram achados comuns em vários estudos. Não houve toxicidade sistêmica em estudo de toxicidade dérmica por 21 dias em ratos. Em estudo de 28 dias de inalação, a LOAEL foi 1 mg/L, com base na ocorrência de salivação em fêmeas e esporádica diminuição do ganho de peso em machos, o que não foi considerado biologicamente relevante.

A recente revisão de estudos de neurotoxicidade aguda e subcrônica indica que o piriproxifeno não é um produto químico neurotóxico. Não foi observada neurotoxicidade em estudos agudos e crônicos até o limite da dose 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 houve evidência de sensibilidade ou aumento da suscetibilidade pré-natal ou pós-natal em estudos desenvolvidos em ratos e coelhos. 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/dia e 300 mg/Kg/dia, respectivamente. Em estudo de toxicidade reprodutiva na 2ª geração, a toxicidade da prole (diminuição do peso corporal) ocorreu juntamente com a diminuição do peso corporal dos animais progenitores, na mesma dose. Quando ratas prenhas foram tratadas em estudo, do 17º dia da gestação até o 20º dia da lactação, a toxicidade resultante foi comparável entre adultos e a prole, na mesma dose (diminuição do peso corporal).

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

O documento informa ainda as doses toxicológicas do piriproxifeno: para 0, 100, 300 ou 1000 mg/Kg/dia do produto, administrado através de gavagem na toxicidade aguda (1-30

dias), a NOAEL para a toxicidade materna foi de 100 mg/Kg/dia e a LOAEL materna, de 300 mg/Kg/dia, com base na redução do peso corporal, do ganho de peso e do consumo de alimentos e no aumento do consumo de água. O NOAEL foi de 300 mg/kg/dia e a LOAEL, 1000 mg/kg/dia, considerando-se o aumento da incidência de alterações esqueléticas no dia 21 da gestação e inespecíficas modificações viscerais no período pós-natal. (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012, p. 10-14; 29-30).

Estudo para avaliação da toxicidade do piriproxifeno em dieta crônica de 6 meses em ratos *Sprague-Dawley*, nas concentrações de 0, 80, 400, 2000 e 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 o nível não causador de efeitos em ambos os sexos foi de 400 ppm (24 mg/kg para machos e 27,5 mg/kg para fêmeas) (KOYAMA *et al.*, 1989).

O impacto da exposição oral crônica (6 semanas) de doses subletais cumulativas de 23 ou 57 ng de piriproxifeno em formas larvais de abelhas foi avaliado em estudo. As abelhas tratadas emergiram antes do que o grupo controle e a dose mais elevada de piriproxifeno conduziu a significativas taxas de adultos mal formados (asas atrofiadas). Abelhas jovens tratadas foram mais frequentemente rejeitadas pelo restante da colônia, induzindo a um menor período de vida. Como conclusão, a exposição das larvas a doses subletais de piriproxifeno afetou diversos traços da história de vida das abelhas. Os resultados especialmente demonstraram mudanças na integração social (aceitação pelas demais abelhas e performance no comportamento social), o que potencialmente pode afetar o crescimento da população e o balanço da colônia (FOURRIER *et al.*, 2015).

Os efeitos do piriproxifeno, em concentrações de 0,1; 0,5 e 1%, foram avaliados em rainhas da formiga Faraó *Monomorium pharaonis*, no que se refere às influências na fecundidade e na reprodução. Piriproxifeno reduziu significativamente a produção de ovos nas rainhas a partir de 3 semanas em diante. Rainhas expostas à concentração de 1% pararam a produção de ovos na oitava semana. Após 8 semanas, os ovários das rainhas das colônias tratadas eram menores do que nas colônias não tratadas, e o número dos ovários nos 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 ovariolos, 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 ovários 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 *Gecarcoide anatalis*. 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 a síntese de proteína da gema imitando a enzima metil farnesoato e assim causando a desregulação endócrina. Diante disso, piriproxifeno não deve ser usado para controlar insetos invasores em ambientes onde o caranguejo *Gecarcoideanatalis* e outras espécies estejam presentes (LINTON *et al.*, 2009).

Os efeitos do piriproxifeno na reprodução e longevidade das borboletas fêmeas *Bicyclusanyana* foram avaliados em 4 estudos diferentes. As borboletas que receberam piriproxifeno apresentaram aumento da taxa de postura de ovos e fecundidade precoce, mas redução na longevidade em comparação aos animais controle. A duração da fecundidade e o tamanho do ovo, entretanto, não demonstraram consistente resposta ao piriproxifeno, com a duração aumentada ou diminuída, e o tamanho do ovo reduzido em apenas um dos quatro experimentos. As fêmeas foram mais sensíveis ao piriproxifeno em torno do início da oviposição, coincidindo com o aumento natural do título do hormônio juvenil em outra Lepidoptera. Os valores entre 1 e 10 µg de piriproxifeno foram eficazes, com, entretanto, pronunciadas diferenças entre os experimentos. Isto é atribuído a diferenças nas condições dos ensaios. As altas concentrações de piriproxifeno (100 µg) e aplicações repetidas de doses menores não afetaram as características reprodutivas, mas tenderam a reduzir a longevidade (STEIGENGA; HOFFMANN; FISCHER. 2006).

3.2 Avaliação Toxicológica

A legislação brasileira e internacional exige que os pesticidas sejam produzidos e disponibilizados no mercado somente após a avaliação rigorosa de sua qualidade, eficácia e segurança.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável pelo registro de saneantes desinfetantes, nos quais se enquadram os inseticidas. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 34/2010 relaciona as exigências para registro de um novo produto (inseticida, rodenticida ou repelente), o que inclui dados de segurança (toxicológicos e avaliação de risco), provas de eficácia do produto em relação às pragas pretendidas e a comprovação de sua estabilidade pelo prazo de validade pretendido. O processo de avaliação de risco contempla estudos agudos, subcrônicos e crônicos, incluindo avaliação reprodutiva, de carcinogenicidade, neurotoxicidade, metabolismo, etc. e seus valores NOAEL estabelecidos, sendo aceitos estudos científicos disponíveis, com as devidas referências.

Para execução dos estudos de segurança, são realizados testes que determinem a atividade toxicológica do princípio ativo em questão. Os principais protocolos a serem realizados são os emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), pelos Estados Unidos da América através do *Food and Drug Administration* (FDA, 1994), ou ainda, Canadá, Ásia e Japão (SILVA; FONSECA, 2003).

3.2.1 Testes sobre toxicidade reprodutiva

A avaliação da toxicologia 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 do organismo parenteral), 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).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases, impedindo ou inibindo temporariamente a reprodução e/ou causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central, que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes

no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação (ZENICK; KLEGG, 1989).

Exposição pré-natal a produtos tóxicos podem produzir mudanças que não podem ser previstas a partir dos efeitos observados em adultos, e esses efeitos são muitas vezes irreversíveis. Resultados adversos no desenvolvimento, em ambos os sexos, podem resultar de exposição a agentes tóxicos no útero ou no leite (EPA, 1996).

Assim, os estudos de toxicidade reprodutiva adaptados de normas da *Environmental Protection Agency* (EPA), recomendados por OECD/OCDE (2001) e FDA (1994), abrangem três segmentos:

- Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva”, com avaliação dos efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento;
- Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade”, com exposição da progênie durante a fase de organogênese;
- Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal”, com 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” será executado no presente estudo.

Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar, uma linhagem de ratos albinos. São preconizados 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 (EBISUI; FONTES; LAPCHIK, 2009).

Indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK; CLEGG, 1989).

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, um 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 controle negativo. As fêmeas foram tratadas por gavagem, com auxílio de sonda orogástrica, do 6° ao 15° dia de gestação. No 21° 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. O inseticida 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 ratas Wistar possa interferir na gestação de fêmeas tratadas no período organogênico, no que se refere ao desenvolvimento fetal (SARTORI, 2018).

3.3 Vírus Zika e Microcefalia

O vírus Zika (ZIKV), um flavivírus transmitido por mosquitos, é um patógeno que causa febre, erupção cutânea, dor nas articulações e conjuntivite. Embora tenha sido inicialmente pensado resultar em sintomas leves, epidemias recentes têm sido associadas a apresentações mais graves, incluindo síndrome de Guillain-Barre e defeitos congênitos em recém-nascidos. Além da transmissão do vírus Zika por mosquitos também há vários relatos de casos médicos indicando transmissão sexual. A transmissão sexual de vírus transmitidos inicialmente somente por artrópodes antes do ZIKV não foi anteriormente documentada. No entanto, houve várias incidências em que uma infecção confirmada pelo vírus foi encontrada entre parceiros sexuais onde o envolvimento de artrópodes na transmissão não era suspeita. Esses relatos sugerem o ZIKV como único entre os flavivírus tendo esta capacidade de transmissão. Usando um modelo de camundongo foi demonstrado que o ZIKV pode ser sexualmente transmissível e causar restrição de crescimento intrauterino em fetos e filhotes. Semelhante ao vírus Ebola, ZIKV é capaz de persistir no sêmen por um longo período, resultados mostram virions intactos no sêmen, sugerindo que o fluido seminal pode servir como veículo de transmissão (URAKI *et al.*, 2017).

Microcefalia é um sinal clínico que pode refletir alterações no desenvolvimento cerebral, mas também pode ser encontrado em neonatos saudáveis. Por definição, microcefalia é qualquer insulto que perturba o crescimento inicial do cérebro e pode ser causado por variações genéticas, compostos teratogênicos ou outras infecções congênicas (como citomegalovírus, rubéola, herpes ou toxoplasmose) (ASHWAL *et al*, 2009).

No exame físico dos recém-nascidos com síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika, 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 epiléticos, o tipo mais comum (HEYMANNet *et al.*, 2016).

Desde outubro de 2015 houve um aumento no número de crianças com microcefalia no estado brasileiro de Pernambuco. Várias explicações possíveis para esse fenômeno foram propostas, incluindo uma associação com o atual aumento de infecções por ZIKV observado desde março de 2015. A suposta associação entre infecção pelo ZIKV em mães durante a gravidez e filhos microcefálicos é baseada em evidências epidemiológicas e laboratoriais. Isso inclui a associação temporal entre a epidemia do vírus Zika e o aumento concomitante do número de bebês nascidos com microcefalia (BRASIL, 2017b). A transmissão do ZIKV é consequência da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, tendo sido isolado em 1948 a partir de um macerado de mosquitos da espécie *A. africanus* colhidos na floresta de Zika na Uganda (DICK, 1953).

As relações entre os mecanismos moleculares de associação de inseticidas devem ser sempre atualizadas e discutidas, assim como se sabe que atualmente o piriproxifeno, um análogo bioquímico do hormônio juvenil em insetos, tem atividade cruzada com o sistema regulador de ácido retinóico (vitamina A) de mamíferos, e foi demonstrado que a exposição ao ácido retinóico causa microcefalia (TANTIBANCHACHAI, 2014).

O *Aedes aegypti* é um mosquito altamente adaptado ao ambiente humano, e isto facilita obter suas refeições sanguíneas no interior dos ambientes domiciliares. Por ser um dos vetores do vírus Zika, seu controle é de extrema importância e muitas vezes trabalhoso, visto que medidas de controle vetorial baseadas na utilização de inseticidas podem ser complicadas por

restrições financeiras, questões logísticas, regulamentação apertada no uso de inseticidas e/ou disseminação de resistências na população vetorial. Dessa forma, a eliminação dos criadouros de larvas assume um papel importante no controle deste vetor. Medidas de proteção individual também devem ser encorajadas, como uso de repelentes e instalação de telas em janelas e portas. Os órgãos de saúde responsáveis devem priorizar a detecção e a investigação de casos suspeitos com o objetivo de interromper a transmissão em áreas endêmicas (HAYES, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Piriproxifeno e do Material Viral

O piriproxifeno 0,5% (Sumilarv®) foi obtido de fornecedor comercial Sumitomo Chemical Co. Ltd. do Japão, lote n.8501F4, fabricado em maio 2018 com validade de 3 anos, acondicionado em embalagem que garante a manutenção de suas características, com ficha de especificação técnica contendo informações que asseguram suas propriedades, grau de pureza e identificação do produto.

A amostra do vírus Zika de origem brasileira foi multiplicada em células Vero E6 (originariamente ATCC CCL 81), os estoques de vírus foram quantificados seguindo métodos usuais (CUGOLA *et al.*, 2016) e armazenados a -80°C no Laboratório de Virologia do ICBS/UFRGS.

4.2 Protocolo experimental para toxicidade pré-natal- teratogenicidade (Segmento II)

4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos, Wistar (*Rattus norvegicus*) 87 fêmeas prenhes, 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 se justifica pela OECD 414, a qual recomenda que cada grupo teste e controle deva conter quantidade suficiente de fêmeas que resulte em aproximadamente 20 fêmeas com presença de implantes uterinos durante a necropsia (OECD/OCDE, 2001).

Durante todo o período de experimentação, os animais foram mantidos no CREAL, em condição de constante de umidade (30-70%), temperatura (21°C +-2C°) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 7h00min às 19h00min). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 autoclavável (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*.

No período de gestação, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individualmente ventiladas (IVCs) (uma fêmea prenhe/gaiola) contendo maravalh. As dimensões das caixas seguem a Resolução N° 15, de 16 de Dezembro de 2013, do CONCEA (CONCEA, 2013b). Esta disposição permite 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 39602. O alojamento, manejo e eutanásia dos animais seguiram a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2009a). Foram observadas, também, as orientações da Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012) e o “Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais”, elaborado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal do CFMV (2012).

Conforme o Guia de Severidade dos Procedimentos Científicos (CEUA/UFRGS, 2009), estudos de toxicidade crônica com desfecho não letal são caracterizados como de grau moderado. Todos os procedimentos do ensaio foram conduzidos por profissionais habilitados, visando minimização o sofrimento animal.

4.2.2 Delineamento Experimental

A toxicidade do piriproxifeno foi avaliada utilizando-se a dose de 500mg/Kg, que apresentou potencial de interferência no desenvolvimento fetal da progênie de fêmeas tratadas do Segmento II no estudo de Sartori, 2018.

Após o período de adaptação, que de 7 dias (OECD/OCDE, 2001), as fêmeas prenhes foram divididas aleatoriamente em 4 grupos – grupo controle negativo (Grupo I), grupo tratado com de piriproxifeno 500mg/Kg (Grupo II), grupo infectado com vírus Zika (Grupo III) e grupo tratado com piriproxifeno 500mg/Kg e infectado com vírus Zika (Grupo IV).

Todas as fêmeas foram tratadas por gavagem com auxílio de sonda orogástrica flexível, do 6º ao 15º dia de gestação, em volume correspondente a 10 ml/kg, recebendo piriproxifeno ou veículo, conforme segmento II recomendado pelo EPA (1996) e FDA (1994). O procedimento de gavagem foi realizado com os animais acordados para garantir a precisão da via oral.

As ratas prenhas foram infectadas com vírus Zika isolado no Brasil (ZIKV 17). As fêmeas dos grupos infectados receberam 1×10^6 PFU (Unidades formadoras de placas) de ZIKV 17 pela via intraperitoneal, em 500µl de meio de cultivo no 9º dia gestacional (G9). O procedimento de injeção intraperitoneal de ZKV foi realizado com os animais acordados pelo mesmo motivo da gavagem. Os grupos serão assim divididos:

Grupo I. Controle negativo – tratado com veículo da solução de tratamento (3% tween 80 e água destilada) (CN).

Grupo II. tratado com 500 mg.kg-1 de piriproxifeno e veículo (3% tween 80 e água destilada)

Grupo III. Inoculados com vírus Zika, 500µl.

Grupo IV. tratado com 500 mg.kg-1 de piriproxifeno e veículo (3% tween 80 e água destilada, inoculados com vírus Zika

4.2.3 Gestação

As fêmeas recebidas no CREAL para cada fase do estudo, estavam no dia 0 da gestação (lavado vaginal positivo). As fêmeas gestantes tiveram a massa corporal mensurada diariamente e relacionada à massa corporal do dia 0 (zero) de gestação considerada 100% (massa corporal relativa). Durante a gestação, também foram medidos, diariamente, os consumos de água e ração e relacionados à massa corporal do referido dia (consumo relativo à massa corporal individual).

5.2.4 Variáveis avaliadas nas fêmeas durante a gestação

$$\text{Massa corporal relativa} = \frac{\text{massa corporal diária}}{\text{massa corporal do dia zero}} \times 100$$

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

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

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

4.2.4 Eutanásia e Celiotomia

As progenitoras de cada grupo experimental, assim como as do grupo controle negativo, foram eutanasiadas no 21^o dia de gestação para avaliação reprodutiva, teratogênica e de variáveis sistêmicas. O método de eutanásia utilizado foi o inalatório e o agente anestésico usado o isoflurano 100% (1ml/ml). Optou-se pelo uso do isoflurano devido a sua rápida ação. Os animais foram colocados em uma gaiola fechada, juntamente com um recipiente contendo algodão embebido com isoflurano. O algodão foi mantido em um recipiente fechado para que os animais não tenham contato direto com o líquido do algodão. O procedimento garante hipersaturação do compartimento pelo anestésico (FANTONI *et al.*, 2011; CFMV, 2012;). Após a eutanásia os animais foram submetidos à celiotomia.

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 isofluorano (a disposição ocorreu de forma que os animais não obtivessem contato direto com o algodão), de acordo com o que preconiza CONCEA(2018) para a realização da eutanásia. O óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos, sendo a seguir fixados em solução de formalina 5% por um período mínimo de 7 dias para posterior processo de coloração.

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.

Variável avaliada nas fêmeas durante a celiotomia

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

4.3 Processo de coloração de fetos e diagnóstico de alterações ósseas

Os fetos provenientes do procedimento de celiotomia foram submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985), para avaliação de alterações esqueléticas. Os fetos previamente fixados em formalina 5% passaram inicialmente pela 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. Após a desidratação, os cadáveres permaneceram em solução de hidróxido de potássio a 1,5% por 48 horas.

Posteriormente, os fetos foram sexados, eviscerados (através de incisão próxima à cartilagem xifóide) e imersos em solução tampão de borato de sódio a 30% durante 2 dias, esta última foi substituída após as primeiras 24h, pela turbidez da solução no processo de neutralização.

Para a etapa de clarificação, os fetos foram colocados em borato de sódio a 30% acrescido de 1g/L de tripsina, em temperatura ambiente, até a completa digestão da musculatura, que foi observada através da presença da estrutura muscular translúcida. A clarificação deve permitir a visualização da calota craniana e demais estruturas ósseas. A solução foi substituída toda vez que se apresentar turva.

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 ou até que estivessem completamente corados.

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, foram armazenados em glicerina PA 100%.

Os fetos foram avaliados individualmente quanto à presença de alterações ósseas existentes em seu esqueleto, analisados em microscópio estereoscópico com aumento de 0,7 a

4 vezes. A análise das alterações encontradas foi realizada baseada em atlas de anomalias ósseas e externas de ratos (CHAHOUD; FAQI, 1997).

4.3.1 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 incluíram o número de fetos por genitora e as perdas pré e pós-implantação, calculadas conforme segue (LEMONICA; DAMASCENO; DI-STASI, 1996):

Taxa de perdas pós-implantação:

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

Figura 1 - Bandeja aberta contendo filhotes de progenitoras do grupo controle



Fonte: a própria autora.

Taxa de perdas pré-implantação:

$$\text{Perdas pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de sítios de implantação}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

Nos fetos, foram avaliadas, a massa corporal e os índices fetais, que incluíram taxa de natalidade, proporção de sexo, malformações macroscópicas externas e alterações esqueléticas que serão calculadas conforme segue (EPA, 1996):

$$\text{Taxa de vitalidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de fetos removidos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ total de fetos removidos}} \times 100$$

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

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

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

4.4 Análise Estatística

Foram digitados os dados no programa Excel e posteriormente exportados para o programa IBM SPSS versão. 20.0 para análise estatística. Foram descritas as variáveis categóricas por frequências relativas percentuais. Foi avaliada a normalidade das variáveis quantitativas pelo teste de *Kolmogorov Smirnov*. As variáveis quantitativas com distribuição normal foram descritas pela média e o erro padrão e aquelas com distribuição assimétrica pela mediana, o mínimo e o máximo. Para comparar as médias ao longo dos tempos foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) para Medidas Repetidas seguida do teste de Comparações múltiplas com Ajuste de Bonferroni. Variáveis com distribuição assimétrica foram comparadas pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dun-Bonferroni. Variáveis categóricas foram associadas pelo teste de Qui- quadrado e para a comparação de proporções entre categorias foi utilizado o teste Z. Foi considerado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

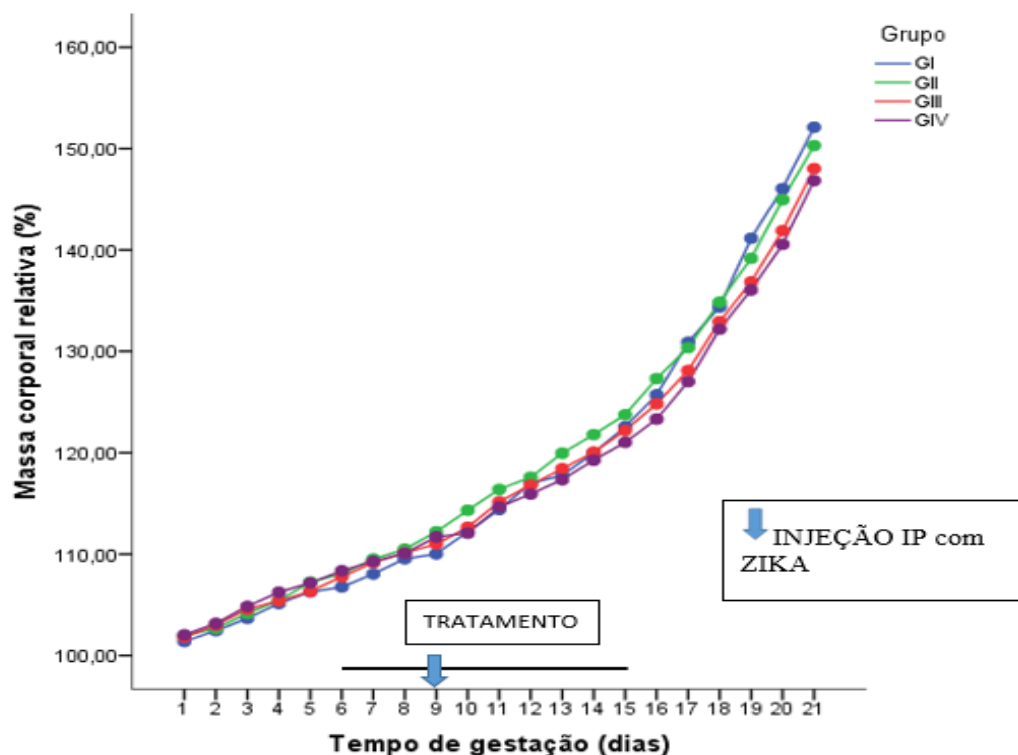
5.1 Avaliação de toxicidade materna

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade aguda nas fêmeas progenitoras dos diferentes grupos. Nenhuma das fêmeas apresentou diarreia, piloereção, apatia, tremores, hemorragia, abortos ou outras alterações sistêmicas

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 2 demonstra o ganho de massa corporal relativo do 1º ao 21º dia de gestação.

Figura 2 - Evolução da massa corporal relativa das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).



Foram comparados 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 nenhum dos dias comparados houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao ganho de massa corporal relativa. 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 ($p < 0,001$).

Tabela 1 - Evolução da massa corporal relativa do 1º ao 21º dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV).

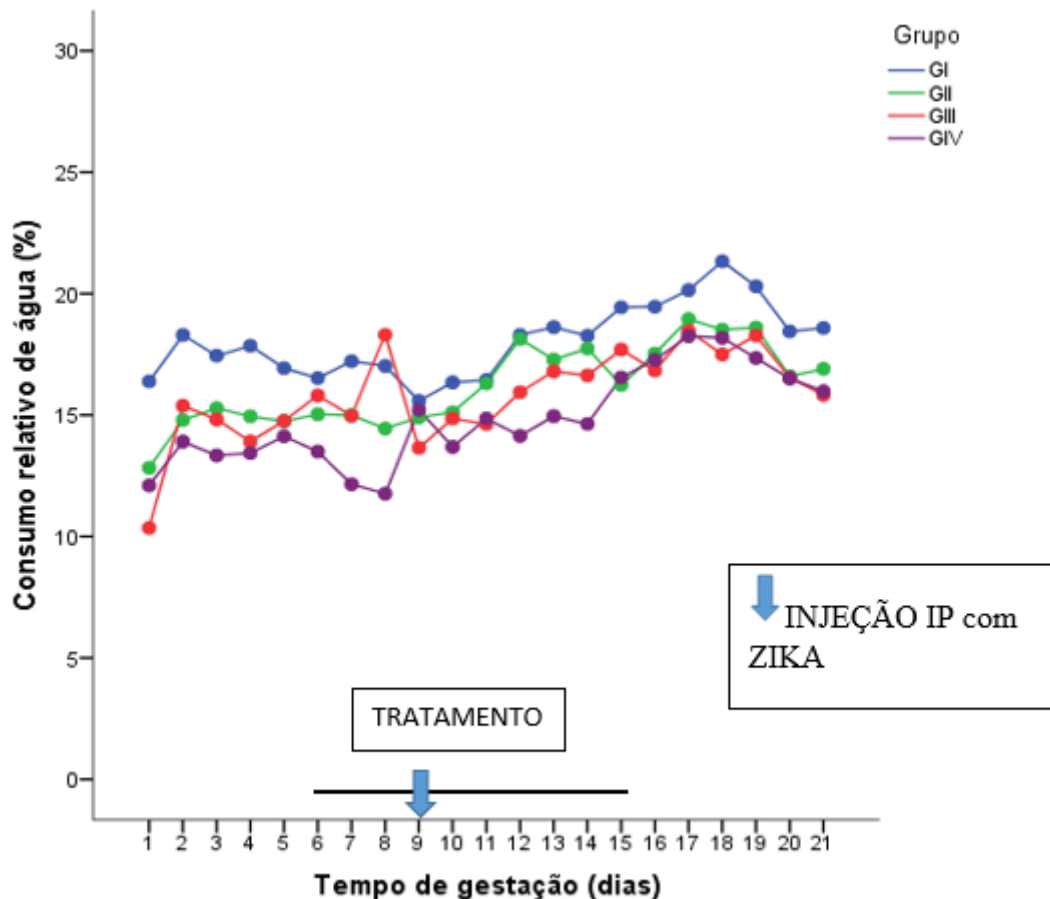
Dias	Grupos			
	GI n=20	GII n=24	GIII n=21	GIV n=22
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
2	102,44±0,47	102,67±0,43	102,99±0,46	103,17±0,45
7	108,04±0,60	109,52±0,55	109,16±0,59	109,28±0,57
14	105,12±0,47	105,42±0,43	105,38±0,46	106,24±0,45
21	152,11±1,91	150,30±1,74	148,03±1,86	146,85±1,82

EP: erro padrão. $p = 0,052$ (ANOVA para Medidas Repetidas/Teste de Comparações Múltiplas com Ajuste de Bonferroni).

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 2 demonstra o consumo relativo de água das progenitoras do 1º ao 21º dia de gestação.

Figura 3 - Consumo relativo de água de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).



Para análise 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). Houve diferenças significativas entre os distintos grupos das progenitoras nos diferentes períodos ($p=0,005$). No 1º período, o GI teve uma média de consumo maior que os outros três grupos ($p<0,05$), no 2º, o GIV teve uma média de consumo menor que os outros três grupos ($p<0,05$) e no 3º período o GI volta a ter uma média de consumo maior que os outros três grupos ($p<0,05$). Em relação aos tempos, o GI teve médias de consumo similares até o 2º período ($p=0,988$), mas aumentou significativamente no 3º ($p<0,001$). O GII teve um aumento do consumo, havendo diferença entre os três períodos ($p<0,001$), assim como aconteceu com o GIII ($p<0,05$). O GIV, assim

como o GI teve médias de consumo similares até o 2° período ($p=0,069$), mas aumentou significativamente no 3° ($p<0,001$). A média e o erro padrão do consumo relativo de água podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Evolução do consumo relativo de água das fêmeas nos grupos do 1° ao 21° dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV).

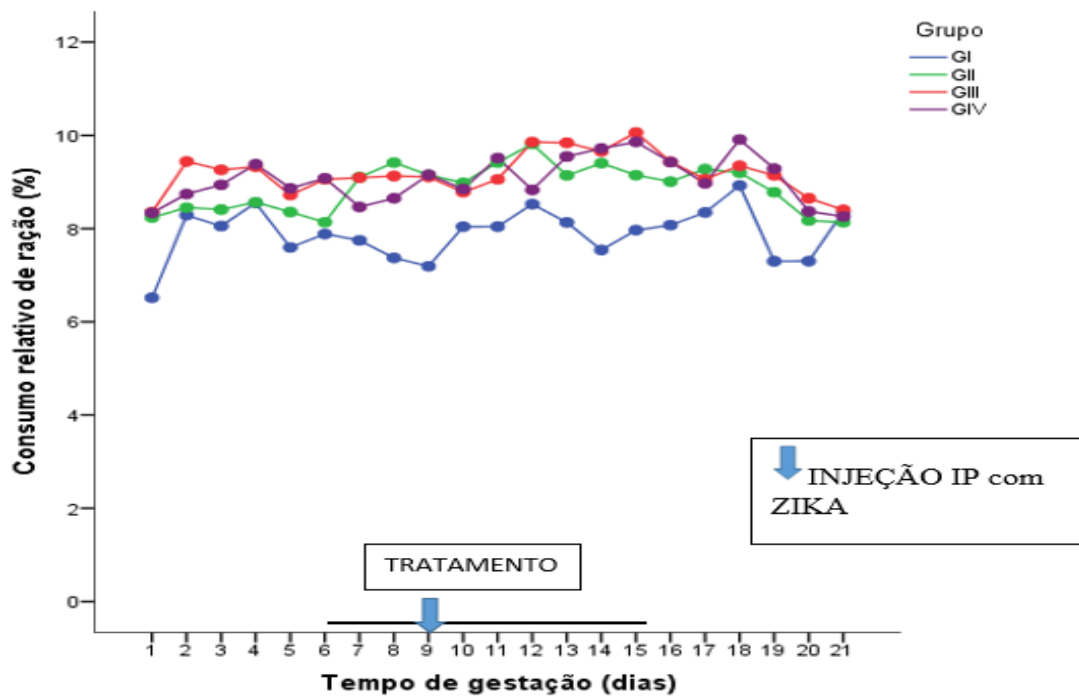
Períodos	Grupos			
	GI n=20	GII n=24	GIII n=21	GIV n=22
	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
1° (dias 1-5)	17,38±0,51 ^{aA}	14,52±0,47 ^{bA}	13,85±0,50 ^{bA}	13,38±0,49 ^{bA}
2° (dias 6-15)	17,38±0,61 ^{aA}	16,02±0,56 ^{aB}	15,93±0,59 ^{aB}	14,15±0,58 ^{bA}
3° (dias 16-21)	19,71±0,56 ^{aB}	17,85±0,51 ^{bC}	17,24±0,55 ^{bC}	17,26±0,54 ^{bB}

EP: erro padrão. $p = 0,005$ (ANOVA para Medidas Repetidas/Teste de Comparações Múltiplas com Ajuste de Bonferroni). Letras minúsculas sobrescritas diferentes (^{a,b}) representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e letras maiúsculas (^{A,B,C}) diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos.

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 3 demonstra o consumo relativo de ração das progenitoras, do 1° ao 21° dia de gestação.

Figura 4 - Consumo relativo de ração de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).



Da mesma forma que na avaliação do consumo relativo de água, para a avaliação estatística do consumo relativo de ração, 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 ($p=0,054$). O GI teve globalmente médias mais baixas que os outros três grupos ($p<0,05$). A média e o erro padrão podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 - Evolução do consumo relativo de ração das fêmeas nos grupos do 1° ao 21° dia de gestação das progenitoras tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9° dia gestacional com vírus Zika (GIV).

Dias	Grupos			
	GI n=20	GII n=24	GIII n=21	GIV n=22
1° (dias 1-5)	Média±EP 7,80±0,20	Média±EP 8,40±0,18	Média±EP 9,02±0,20	Média±EP 8,85±0,19
2° (dias 6 -15)	Média±EP 7,85±0,19	Média±EP 9,17±0,17	Média±EP 9,37±0,19	Média±EP 9,17±0,18
3° (dias 16-21)	Média±EP 8,05±0,15	Média±EP 8,76±0,13	Média±EP 9,01±0,14	Média±EP 9,04±0,14

EP: erro padrão. p =0,054 (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 rins direito e esquerdo entre os diferentes grupos ($p=0,259$ e $p=0,450$ respectivamente) nem no peso do útero gravídico ($p=0,104$). O peso do coração foi maior no grupo GI, em relação aos grupos GIII e GIV ($p<0,05$). O fígado apresentou uma diferença no limite da significância estatística escolhida entre os grupos GI e GIV ($p=0,050$). O baço, teve um peso maior no GI que no GIV ($p=0,005$). A Tabela 4, que apresenta a média e o erro padrão mostra estes resultados.

Tabela 4 - Massa relativa dos órgãos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

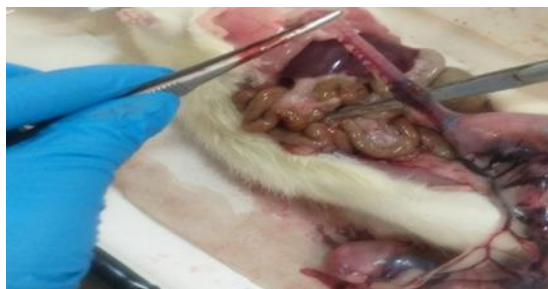
	Grupos			
	GI n=20	GII n=24	GIII n=21	GIV n=22
Órgãos	Média±EP	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Rim direito	0,46±0,019	0,45±0,012	0,44±0,010	0,42±0,009
Rim esquerdo	0,42±0,007	0,42±0,006	0,41±0,010	0,41±0,007
Coração*	0,35±0,006 ^a	0,33±0,004 ^{a,b}	0,32±0,005 ^b	0,32±0,005 ^b
Baço*	0,30±0,008	0,29±0,006	0,27±0,006	0,26±0,009
Fígado*	6,18±0,13 ^a	6,08±0,12 ^{a,b}	5,81±0,11 ^{a,b}	5,74±0,10 ^b
Útero gravídico	84,54±2,93	76,51±4,20	83,88±3,63	72,14±4,96

EP: erro padrão. *p<0,05. ANOVA uma via/Teste de Comparações Múltiplas com Ajuste de Bonferroni). Letras sobrescritas (^{a,b}) diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos

5.1.5 Índices reprodutivos

Não houve diferenças significativas no número de fetos por genitora (p=0,067). Houve diferença estatisticamente significativa no número de perdas de pré-implantação (p=0,010), havendo mais perdas no GII que no GI, conforme a Tabela 5.

Figura 5 – Perda pré-implantação observada na fêmea de número 94 do grupo GII tratado com piriproxifeno.



Fonte: Própria autora (2022).

Tabela 5 - Índices reprodutivos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

Índices reprodutivos	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Número de progenitoras	20	24	21	22
Número total de fetos	216	230	224	196
Nº fetos/progenitora ¹	10,80±0,40	9,58±0,58	10,67±0,52	8,91±0,70
Número de perdas pós-implantação ²	0,05±0,05 ^a 0(0-1)	0,58±0,13 ^b 0,5 (0-2)	0,24±0,10 ^{a,b} 0(0-1)	0,73±0,27 ^{a,b} 0(0-5)

¹Apresentadas as médias± erro padrão e comparados pela ANOVA uma via/Teste de Comparações Múltiplas com Ajuste de Bonferroni. Letras sobrescritas (^{a,b}) diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ²variável com distribuição assimétrica, apresentada media e EP e abaixo mediana, (mínimo-máximo); teste de Kruskal Wallis seguido do teste de Dun-Bonferroni.

Nos grupos GII e GIV, conforme a Tabela 5, ocorreu uma redução do número de fetos por progenitora, evidenciando que sempre que o piriproxifeno esteve presente houve redução do número de fetos por ninhada. As perdas pós implantações foram consideradas quando havia identificação de implante uterino sem desenvolvimento fetal.

5.2 Avaliação da embriotoxicidade

5.2.1 Avaliação dos fetos

O estudo de embriotoxicidade dos diferentes grupos tratados durante a organogênese avaliou um total de 866 fetos, sendo 216 do grupo GI, 230 do grupo GII, 224 do grupo GIII e 196 do grupo GIV.

Os dados obtidos demonstram que não houve diferença entre os grupos na média da massa corporal dos fetos (p=0,182). 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.

Não houve diferenças significativas na proporção entre os sexos (macho:fêmea) (p=0,576) entre os grupos experimentais. Os índices fetais estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6- Índices fetais de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

	Grupos			
	GI	GII	GIII	GIV
Índices fetais				
Número total de fetos	216	230	224	196
Massa corporal ao nascimento ¹	5,27±0,03	5,31±0,03	5,32±0,03	5,36±0,03
Proporção de sexo (macho:fêmea) ²	0,98:1	1,09:1	0,90:1	1,15:1
Número de fetos danificados, n(%) ²	1 (0,5)	5 (2,2)	3 (1,3)	2 (1,0)
Número de fetos pouco corados, n(%) ²	2 (0,9) ^{a,b}	- ^b	15 (6,7) ^c	10 (5,1) ^{a,c}

¹Dados apresentados pela média± erro padrão; ANOVA uma via.²Teste Z/ Qui-Quadrado Valores com a mesma letra não apresentam diferença significativa.

Não houve diferenças significativas na frequência de fetos danificados entre os grupos (p>0,05). Entretanto houve diferença em relação à frequência de feto pouco corado, que foi maior no grupo GIII (6,7%) quando comparado com os grupos GI (0,9%) e GII (0%). Entre os grupos GI e GII não houve diferença estatística considerando o número de fetos pouco corados. O grupo GIV (5,1%) teve maior frequência de feto pouco corado do que o grupo GII (0%) (p<0,05).

Figura 6 - Fêmea 55 GIII tratada com veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika. Ninhada com 13 filhotes, sendo o oitavo da esquerda para a direita desproporcionalmente pequeno em comparação com os demais.



Fonte: Própria autora(2021)

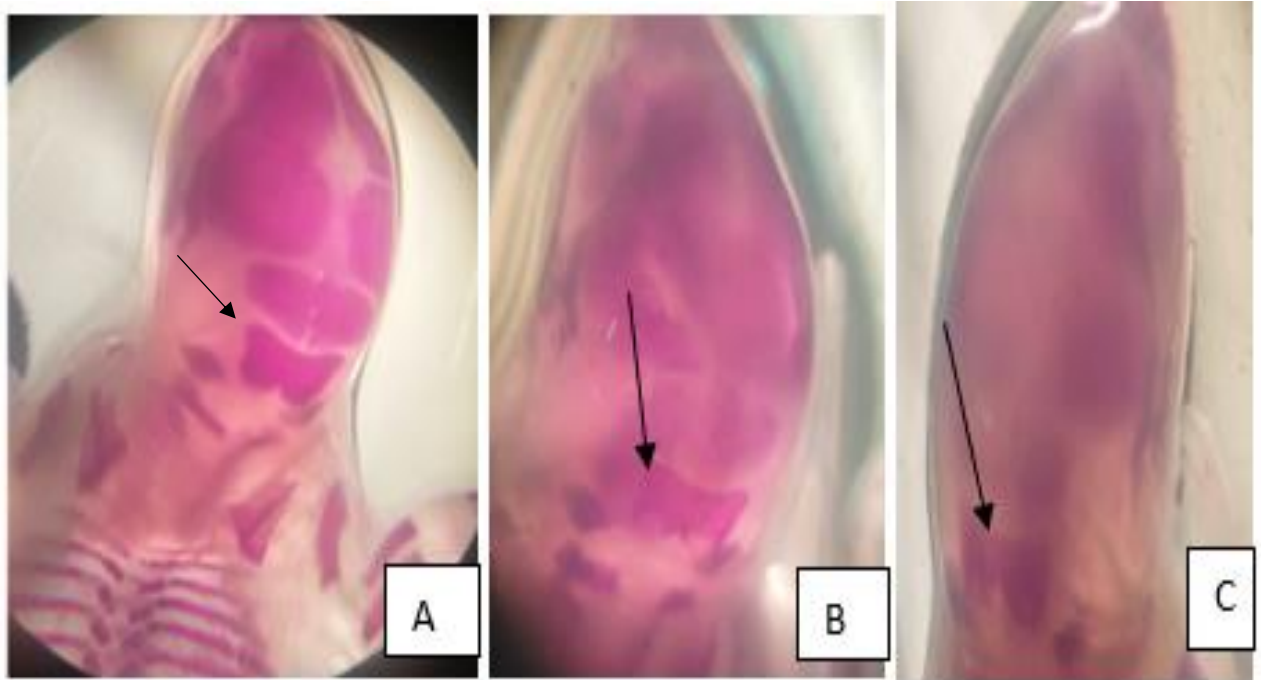
5.2.2 Alterações esqueléticas

A exposição de progenitoras a diferentes tratamentos durante o período de organogênese, resultou em alterações esqueléticas significativas estatisticamente nos fetos avaliados ($p < 0,05$). As alterações ósseas estão apresentadas 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 e calota não ossificada.

A detecção de alargamento de fontanela mostrou-se superior nos fetos do grupo GIII em relação aos demais grupos tratados. No que se refere à detecção de ossificação incompleta do supraoccipital, houve aumento nos grupos GII e GIV, em relação aos grupos GI e GIII. O grupo GIV tem aumento na detecção de calota pobremente ossificada em comparação com os outros três grupos. Estes resultados são apresentados na Tabela 7.

A Figura 7 mostra fetos de progenitoras do grupo GIII e GIV tratadas com 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno durante a organogênese, evidenciando crânio com ossificação incompleta de supraoccipital, ao lado de feto de progenitora do grupo controle apresentando supraoccipital considerado normal.

Figura 7 - Fetos diafanizados tratados e do grupo controle submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor e Van Dyke (1985)



A: Feto de progenitora tratada com veículo (GI), do 6º ao 15º dia de gestação, apresentando supraoccipital com ossificação considerada normal; B: Feto de progenitora tratada com piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ (GII); C: Feto de progenitora tratada com piriproxifeno 500 mg.kg⁻¹ e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV)

Tabela 7 - Ocorrência de anormalidades nos ossos da cabeça dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

Alterações	GI	GII	GIII	GIV
Alargamento de fontanela*	1,9 ^a	2,2 ^a	10,3 ^b	0,5 ^a
Redução de fontanela	0	0	0	1,5
Supraoccipital				
Formato irregular	5,6	4,3	4,5	9,7
Ossificação Incompleta*	14,8 ^a	34,3 ^b	21,4 ^a	33,2 ^b
Centro Adicional de Ossificação	0	0	0	0
Interparietal				
Ossificação Incompleta	6,5	6,1	6,2	4,1
Centro Adicional de Ossificação	0	0	0	0
Parietal				
Formato irregular	0	0	1,3	0
Ossificação Incompleta	6,9	5,2	4,0	2,6
Centro Adicional de Ossificação	0	0	0	0
Frontais				
Formato irregular	0	0,4	0	0
Ossificação Incompleta	0	0	0	1,0
Nasal				
Ossificação Incompleta	0	0	0,4	0,5
Incisivo				
Ossificação Incompleta	0	0	0	0
Zigomático				
Ossificação Incompleta	0	0	0,4	0
Fusão	0,5	1,3	0	2,6
Mandíbula				
Ossificação Incompleta	0	0	0	0
Encurtada	0	0	0	0
Basisfenóide				
Formato irregular	0	0	0	0
Ossificação Incompleta	0	0	0	0
Axis				
Formato irregular	0	0	0	0
Calota Pobremente Ossificada*	0 ^a	1,7 ^a	2,2 ^a	9,7 ^b

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

A Tabela 8 apresenta alterações ósseas de forma, localização, número e de calcificação nos ossos da região cervical, torácica, lombar e pelvica, juntamente com sua porcentagem de ocorrência entre os diferentes grupos. Identificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na detecção das seguintes alterações: costelas 14 rudimentar e vestigial, esternobras com tamanho reduzido, formato irregular e/ou pobremente ossificadas e vertebrae lombares com ossificação incompleta. No GII houve maior frequência de costela 14 vestigial do que nos GI e GIII ($p < 0,05$), e no GIII houve maior 14 rudimentar do que no GI ($p < 0,05$). No grupo GIV houve maior frequência de esternobras de tamanho reduzido que nos demais grupos ($p < 0,05$), no GII houve maior frequência de esternobras com formato irregular do que no GI ($p < 0,05$), e no GIV houve maior frequência de esternobras pobremente ossificadas que no GI ($p < 0,05$). Em relação as vertebrae lombares, a ossificação incompleta foi mais frequente no GIV que no GI e GII ($p < 0,05$).

Figura 8 - Feto de progenitora grupo GII apresentando esternobra de tamanho reduzido



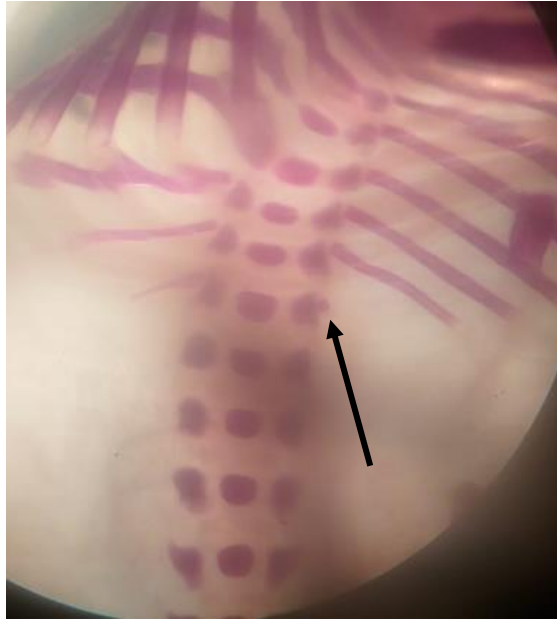
Fonte: Própria autora (2022)

Tabela 8 - Ocorrência de anormalidades nos ossos da região cervical, tórax, lombar e pélvica dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

Alterações	GI	GII	GIII	GIV
Vertebras cervicais				
Pobremente Ossificadas	0	0	0	0
Clavícula				
Posição Irregular	0	0	0	0
Escápula				
Formato irregular	0	0	0	0
Ossificação Incompleta	0	0	0	0
Vértebras Torácicas				
Ossificação Incompleta	0,5	0	0	0
Centro Bipartido	0	0	0	0
Costelas				
Onduladas	0	0	0	0
Ausentes	0	0	0	0
14 vestigial*	8,8 ^a	21,3 ^b	10,3 ^a	11,7 ^{a,b}
14 rudimentar*	0 ^a	0,4 ^{a,b}	3,6 ^b	0,5 ^{a,b}
Esternébras				
Tamanho reduzido*	0,5 ^a	3,0 ^a	3,6 ^a	12,8 ^b
Formato irregular*	3,7 ^a	18,7 ^b	11,2 ^{b,c}	6,1 ^{a,c}
Pobremente Ossificadas*	0 ^a	2,2 ^{a,b}	2,2 ^{a,b}	6,6 ^b
Ausentes	0	0,9	0	0,5
Vértebras Lombares				
Ossificação Incompleta*	4,2 ^a	4,8 ^a	8,9 ^{a,b}	13,8 ^b
Pobremente Ossificadas	0	0	0	0
Ílio				
Pobremente Ossificado	0	0	0	0
Ísquio				
Pobremente Ossificado	0	0	0	0
Púbis				
Pobremente Ossificado	0	0	0	0
Vértebras Sacrais				
Pobremente Ossificadas	0	0	0	0

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

Figura 9 - Feto de progenitora grupo GII
apresentando costela vestigial



Fonte: Própria autora (2022)

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. Não identificou-se diferença significativa ($p > 0,05$) na detecção de alterações.

Tabela 9 - Ocorrência de anormalidades nos ossos dos membros torácicos e pélvicos dos fetos de fêmeas tratadas com veículo (GI), piriproxifeno 500 mg.kg-1 (GII), veículo e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIII), e piriproxifeno 500 mg.kg-1 e injetados IP no 9º dia gestacional com vírus Zika (GIV) do 6º ao 15º dias de gestação, indicado pela média dos animais por grupo (n= 20, 24, 21 e 22 respectivamente).

Alterações	GI	GII	GIII	GIV
Úmero	0	0	0	0
Rádio e Ulna	0	0	0	0
Metacarpos				
Pobremente Ossificados	0	0	0	0
Falanges (membros torácicos)				
Não ossificadas	0	0	0	0
Fêmur				
Pobremente Ossificado	0,9	0	0	0
Tíbia e Fíbula				
Pobremente Ossificadas	0,5	0	0	0
Metatarsos				
Pobremente Ossificado	0	0	0	0
Falanges (membros pélvicos)	0	0	0	0

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

6 DISCUSSÃO

Entre as ameaças de saúde pública mais desafiadoras em todo o mundo estão as doenças transmitidas por mosquitos (ABAD-FRANCH *et al.*, 2015). Os vetores urbanos são especialmente problemáticos pois podem transmitir patógenos em populações humanas suscetíveis, desencadeando epidemias (WEAVER; REISEN, 2010; IOM, 2008).

Os inseticidas tem sido frequentemente usados para o controle dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* no combate à dengue, Zika, chikungunya e febre amarela. Em decorrência disso, vêm sendo detectadas populações de *Aedes aegypti* resistentes aos inseticidas mais comumente utilizados, como os organofosforados, piretroides, carbamatos e organoclorados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), o que acarretou a necessidade do uso de outras substâncias químicas com o objetivo de aprimorar o controle dos vetores (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* (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).

Malformações congênitas, dentre elas a microcefalia, têm etiologia complexa e multifatorial, podendo decorrer de processos infecciosos durante a gestação. As evidências disponíveis até o momento indicam fortemente que o vírus Zika está relacionado à ocorrência de microcefalias. Como tal condição pode depender de diversos fatores como a carga viral, fatores do hospedeiro, momento da infecção e/ou presença de outros fatores, é indispensável dar continuidade aos estudos para melhor entender a doença. (BRASIL, 2015).

O presente estudo objetivou a avaliação da toxicidade pré-natal (Segmento II), através da exposição de ratas Wistar ao piriproxifeno e ao vírus Zika, de forma a avaliar possíveis efeitos no desenvolvimento fetal e efeitos teratogênicos na progênie exposta durante o período de organogênese (6º ao 15º dia de gestação). A realização desse estudo é de extrema importância para atestar que a substância em avaliação e a exposição concomitante ao vírus não exerça atividade tóxica durante a fase de organogênese nos animais testados. Foi buscada de forma inédita uma possível interação entre o piriproxifeno e o vírus Zika na etiologia de anomalias craniocerebrais observadas na doença viral.

6.1 Toxicidade materna

A avaliação da toxicidade materna pode ser realizada mediante a constatação de redução de ingesta de água ou alimento, diminuição do peso corporal e do ganho de massa corporal das progenitoras, pela mortalidade materna ou ainda pela presença de sinais clínicos evidentes de toxicidade (EUROPEAN COMMISSION, 2008; 2015).

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 no presente estudo.

Avaliando os possíveis efeitos no desenvolvimento fetal, decorrentes da administração de três doses do inseticida piriproxifeno (100 mg.kg^{-1} , 300 mg.kg^{-1} e 500 mg.kg^{-1}) em ratas Wistar durante o período de organogênese, SARTORI *et al.* (2020) não registraram sinais de toxicidade aguda em nenhum dos grupos tratados com o inseticida.

Segundo HOLLENBACH *et al.*, (2015), as variações diárias da massa corporal das fêmeas durante o experimento devem ser coletadas para o monitoramento do estado de saúde dos animais, podendo, dessa forma, serem avaliadas informações importantes a respeito da toxicidade da substância química testada.

No presente estudo foram comparados 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 nenhum dos dias comparados houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao ganho de massa corporal relativa. Conforme esperado para o período de gestação, verificou-se aumento no ganho de massa corporal das progenitoras ao longo de toda a gestação.

No estudo de SARTORI *et al.* (2020), considerando os mesmos quatro momentos de avaliação do ganho de massa corporal das progenitoras (2º, 7º, 14º e 21º dias de gestação), foi observado que, no período inicial (2º dia), a massa corporal relativa não diferiu entre os diferentes grupos; já nos dias em que houve tratamento (7º e 14º dias), as fêmeas do grupo que recebeu a dose de 500 mg.kg^{-1} de piriproxifeno apresentaram redução no ganho de massa corporal relativa; entretanto, ao final da gestação, no 21º dia, a evolução da massa corporal voltou a ser equivalente entre os diferentes grupos, sem diferir estatisticamente.

A WHO (2010) registra 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. Relata

ainda redução do peso corporal, do ganho de peso e/ou do consumo de alimento em vários estudos com uso de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães.

A *Environmental Protection Agency* (2012), cita que estudo de toxicidade pré-natal em ratas desencadeou toxicidade materna, levando em conta a 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 por dia.

Segundo Valadares (2006), a toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações nos consumos de água e ração, sendo esses, importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornecem informações do estado geral de saúde dos animais. Nas avaliações de consumo relativo de água e ração 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). A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre períodos e diferentes grupos das progenitoras em relação ao consumo de ração, entretanto GI teve globalmente médias mais baixas que os outros três grupos. Já nas medidas de consumo relativo de água houve diferenças significativas entre os distintos grupos das progenitoras nos diferentes períodos. No 1º período, o GI teve uma média de consumo maior que os outros três grupos, no 2º período, o GIV teve uma média de consumo menor que os outros três e no 3º período o GI volta a ter uma média de consumo maior que os outros três grupos. Em relação aos tempos, o GI teve médias de consumo similares até o 2º período, mas aumentou significativamente no 3º. O GII teve um aumento do consumo, havendo diferença entre os três períodos assim como aconteceu com o GIII. O GIV, assim como o GI teve médias de consumo similares até o 2º período, mas aumentou significativamente no 3º. As flutuações de consumo de água e ração durante o período gestacional podem ser observadas quando há administração de substâncias testes. Este fato pode estar ligado aos efeitos da própria substância testada e também à situações fisiológicas e nutricionais próprias da gestação (SEBERINO, 2020).

Alterações no peso relativo dos órgãos são parâmetros indicadores de toxicidade materna (BERNARDI & SPINOSA, 2017; LOURENÇO *et al.* 2009). No presente estudo o fígado apresentou diferença no limite de significância estatística entre os grupos GI e GIV; o baço teve um peso menor no GIV comparado com o GI, a massa relativa do coração foi menor nos grupos GIII e GIV comparado com GI. A massa relativa de rins direito e esquerdo, útero gravídico não evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Testes realizados sobre a toxicidade do piriproxifeno na década de 1980 em diferentes espécies de indivíduos adultos como camundongos, ratos, coelhos e cães, demonstraram diferentes respostas conforme o grupo animal estudado. Em camundongos, ratos e cães observou-se aumentos no peso do fígado e alterações nas concentrações plasmáticas de lipídios; em coelhos observou-se irritação ocular, e baixa toxicidade dérmica; em camundongos foi observado aumento das taxas de mortalidade, alterações histopatológicas nos rins e diminuição do peso corporal (SILVA, 2020; SAEGUSA *et al.*, 1988).

Diversos estudos sobre a 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). Há, todavia, relatos de estudos com administração de doses repetidas de piriproxifeno em camundongos, ratos e cães, que concluíram que o fígado e rins seriam os principais órgãos alvo (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012). Estudo de toxicidade subcrônica, com administração oral de 300 mg.kg⁻¹ de piriproxifeno, durante 90 dias, acarretou o aumento do peso relativo do fígado, com aumento de hepatócitos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2012).

O aumento do peso do fígado, dos rins, da tireoide, e a redução do peso da hipófise foram observados após a administração crônica de piriproxifeno na dieta (2000 a 10000 ppm), por 6 meses, em ratos *Sprague-Dawley*. 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).

A interpretação das alterações nas taxas reprodutivas pode identificar o período no qual os efeitos tóxicos reprodutivos produzidos por xenobióticos se estabeleceram nos animais (LOURENÇO *et al.*, 2009). Além disso, tendo em vista que a organogênese é relativamente longa nos animais, os estudos de teratogenicidade podem identificar com certa precisão o período ou fase na qual o teratígeno pode induzir os defeitos congênitos e possíveis anomalias ósseas (BERNARDI & SPINOSA, 2017; ROGERS; KALVLOCK, 2012; MOORE & PERSAUD, 2016).

Em relação aos índices reprodutivos obtidos nesse estudo, pode-se observar que não houve diferenças estatisticamente significativas no número de fetos por progenitora entre os grupos. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa no número de perdas de pré-implantação, havendo mais perdas no GII que no GI. As perdas pré-implantação nos grupos

GIII e GIV também foram superiores aos do GI, todavia sem significância estatística. Além disso, nos grupos GII e GIV ocorreu uma redução do número de fetos por progenitora, evidenciando que sempre que o piriproxifeno esteve presente houve redução do número de fetos por ninhada. Esses resultados divergem dos relatados por SARTORI *et al.*(2020), no qual as três doses de piriproxifeno estudadas não acarretaram em diferenças significativas nos índices reprodutivos estudados nas progenitoras. Alterações nas taxas de perdas pré-implantação e redução do número de fetos por ninhada podem ser indicativos de toxicidade reprodutiva / materna (BERNARDI & SPINOSA, 2017).

Estudos relatam a interferência do piriproxifeno em índices reprodutivos e na ocorrência de abortos e partos prematuros. A WHO (2010) registra estudo de toxicidade reprodutiva com piriproxifeno em ratos, tratados durante os períodos pré-natal e de lactação, evidenciando 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, com a utilização da dose de 500 mg.kg⁻¹ por dia. Resultado semelhante é relatado em estudo realizado em coelhas tratadas com doses de piriproxifeno superiores a 300 mg.kg⁻¹ por dia, apresentando sinais de toxicidade materna, como aborto e parto prematuro.

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.

Estudo realizado por Vani *et al.* (2020) avaliou os efeitos do piriproxifeno no desempenho reprodutivo, desenvolvimento embriofetal, medições da cabeça e integridade do DNA em um modelo pré-clínico. Trinta camundongas prenhes foram divididos em três grupos (n = 10): controle (água potável - 0,1 ml/10 g (corpo peso – peso corporal, gavagem)) e tratados com piriproxifeno 0,0002 mg/kg e 0,0021 mg/kg (peso corporal, gavagem) durante o período gestacional. Análise dos parâmetros biométricos, desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal relacionados ao controle não mostraram diferenças significativas, não sugerindo

toxicidade materna ou embriofetal. As medidas da cabeça não mostraram diferenças, exceto um aumento da medida anterior/posterior e glabella/protuberância occipital externa. A análise da integridade do DNA mostrou aumento de micronúcleos apenas em 72 h para o grupo de dose mais baixa. Sugerindo assim que o piriproxifeno não está relacionado à ocorrência da microcefalia, nem altera o desempenho reprodutivo, o desenvolvimento embriofetal ou a integridade do DNA.

6.2 Toxicidade Fetal

Os testes de teratogenicidade e embriofetotoxicidade são realizados com o intuito de estudar as possíveis anomalias estruturais dos animais, especialmente as ósseas, tendo em vista que o período da organogênese do esqueleto é relativamente 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).

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).

O presente estudo avaliou de forma inédita os efeitos do inseticida piriproxifeno e sua possível interação com o vírus Zika no desencadeamento de anomalias ósseas, particularmente as no crânio, durante o período de gestação de ratas Wistar. A avaliação dos fetos foi realizada a partir dos dados obtidos dos diferentes grupos tratados durante a organogênese. Foram

avaliados um total de 866 fetos, 216 do grupo GI (controle), 230 do grupo GII (piriproxifeno 500mg/Kg), 224 do grupo GIII (Zika) e 196 do grupo GIV (piriproxifeno + Zika).

Os dados obtidos demonstram que não houve diferença entre os grupos na média da massa corporal dos fetos ao nascer. No estudo de SARTORI *et al.*, 2020 foi relatado que o piriproxifeno 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).

As proporções entre fetos machos e fêmeas analisadas no presente trabalho, não mostraram diferenças significativas entre os grupos experimentais. Tal situação também foi observada por SARTORI *et al.*, (2020).

As alterações macroscópicas externas e esqueléticas dos fetos foram utilizados na avaliação do potencial teratogênico do piriproxifeno, do vírus Zika e da utilização concomitantes de ambos. De particular interesse foi a análise das estruturas ósseas do crânio. Ocorreu diferença estatisticamente significativa em alargamento de fontanela, ossificação incompleta de supraoccipital e calota pobremente ossificada. A detecção de alargamento de fontanela mostrou-se superior nos fetos do grupo GIII (Zika) em relação aos demais grupos tratados. No que se refere à detecção de ossificação incompleta do supraoccipital, houve aumento nos grupos GII (piriproxifeno) e GIV (piriproxifeno + Zika), em relação aos grupos GI (controle) e GIII (piriproxifeno). O grupo GIV (piriproxifeno + Zika) apresentou aumento na detecção de calota pobremente ossificada em comparação com os outros três grupos, o que pode indicar um aumento de anomalias de ossificação craniana quando o animal é inoculado com Zika vírus e recebe a substância inseticida analisada.

Há relatos de estudos que demonstram que o Zika vírus pode infectar diretamente diferentes linhagens de células precursoras neurais e neurônios imaturos *in vivo* no início da infecção e se replica nessas células com alta eficiência. Após infecção experimental o vírus se replica eficientemente no cérebro embrionário de camundongos, principalmente visando células progenitoras neurais. Assim também mostram que os cérebros infectados são menores com ventrículos aumentados e córtex mais fino, compatível com um fenótipo de microcefalia. (LI, CUI *et al.*, 2016).

No exame físico dos recém-nascidos com síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika, 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 (HEYMANN *et al.*, 2016).

SARTORI *et al.*, (2020) concluíram que o piriproxifeno utilizado isoladamente 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. Também concluíram que o inseticida não produziu efeitos teratogênicos, malformações externas ou alterações sugestivas de microcefalia nos fetos dos diferentes grupos avaliados. Na avaliação dos ossos da cabeça relataram 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.

Segundo Solecki *et al.* (2011), a ossificação incompleta no rato habitualmente é considerada como retardo de crescimento, independente da estrutura afetada. No entanto, 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 corporal ou outros sinais de imaturidade esquelética. Portanto, no caso do crânio, a classificação como 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.

As alterações ósseas de forma, localização, número e de calcificação nos ossos da região cervical, torácica, lombar e pélvica dos fetos apresentaram diferença estatística significativa quanto as seguintes características: costelas 14^o rudimentar e vestigial, esternebras com tamanho reduzido, formato irregular e/ou pobremente ossificadas e vertebrae lombares com ossificação incompleta. No GII (piriproxifeno) houve maior frequência de costela 14^o vestigial do que nos GI (controle) e GIII (Zika), e no GIII (Zika) houve maior ocorrência de 14^o rudimentar do que no GI (controle). No grupo GIV (piriproxifeno + Zika) houve maior frequência de esternebras de tamanho reduzido que nos demais grupos, no GII (piriproxifeno)

houve maior frequência de esternebras com formato irregular do que no GI (controle), e no GIV (piriproxifeno + Zika) houve maior frequência de esternebras pobremente ossificadas que no GI (controle). Em relação as vertebrae lombares, a ossificação incompleta foi mais frequente no GIV (piriproxifeno + Zika) que no GI (controle) e GII (Zika).

No trabalho desenvolvido buscando caracterizar o efeito neurotóxico do larvicida piriproxifeno (PPF), através da análise de parâmetros macromorfológicos dos embriões e micromorfológicos das vesículas encefálicas, utilizando *Gallus domesticus* como modelo de estudo, os embriões foram expostos ao PPF na idade embrionária. Os dados apresentados nesse trabalho, demonstram que as concentrações utilizadas de PPF não foram letais para os embriões expostos, no entanto promoveram redução significativa nas medidas do embrião, da região cefálica e do encéfalo. Além disso, o PPF causou redução na espessura das camadas celulares do telencéfalo e do mesencéfalo, acompanhada da redução na proliferação celular, do aumento do dano ao DNA e do aumento na morte celular por apoptose. Em conjunto, esses resultados mostram o efeito neurotóxico do larvicida PPF durante o desenvolvimento embrionário (SILVA, 2020).

Um experimento em que foram inoculadas ratas grávidas e não grávidas por via subcutânea com três doses de Zika vírus (ZIKV 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 PFU/dose) avaliaram-se sinais de infecção nas fêmeas, incluindo temperatura corporal, comportamento de doença, alterações no consumo de alimentos e água, bem como a mortalidade materna e neonatal. Na parte 2 do experimento, foi avaliado o impacto da dose mais alta de ZIKV (1×10^7). Os resultados demonstram que filhotes nascidos de mães inoculadas com ZIKV exibiram um aumento na morte celular no hipocampo e córtex, uma redução nos volumes hipocampal e cortical e evidências preliminares de displasia cerebrocortical. A capacidade de uma inoculação materna de ZIKV de produzir essas malformações cerebrais e a morte de células neurais associadas nos filhotes afetados sugere que o vírus não é eliminado pelo sistema imunológico materno e foi capaz de interromper o desenvolvimento normal do cérebro no feto (SHERER *et al*, 2019).

No trabalho desenvolvido em camundongos por FERNANDES *et al* (2017), os animais foram inoculados intracerebralmente, no lado direito no lobo parietal, ou por via subcutânea, na região lombar, com Zika vírus. Todos os camundongos recém-nascidos inoculados exibiram sinais neurológicos incluindo letargia, ataxia, paralisia e “running movement”. (FERNANDES *et al*, 2017).

A microcefalia é talvez o mais marcante dos defeitos congênitos relatados em recém-nascidos infectados pelo Zika vírus. Modelos em ratos geralmente falham em reproduzir o tamanho cerebral severamente reduzido e as alterações patológicas encontradas em pacientes humanos, provavelmente devido a diferenças no tempo de gestação e no desenvolvimento cerebral entre as duas espécies. No entanto, após uma inspeção cuidadosa de camundongo infectado foi notado malformações corticais nos animais sobreviventes, com número reduzido de células e espessura da camada cortical, sinais associados à microcefalia em humanos. A nível celular, o neurônios no córtex, tálamo e hipotálamo exibiam uma aparência de “núcleos vacuolares”. Essa morfologia foi caracterizada por vazio e padrão de cromatina marginalizado com detritos nucleares, sugerindo morte celular em curso. (CUGOLA *et al*, 2016).

Na investigação da possível participação do piriproxifeno como causa da microcefalia, Dzieciolowska *et al.* (2017) investigaram os efeitos do larvicida no neurodesenvolvimento embrionário do zebrafish como modelo vertebrado. Embora letal em altas doses, o piriproxifeno não causou malformação cerebral nem alterações significativas no número de células tronco no sistema nervoso central em desenvolvimento, sugerindo que o larvicida por si só, não parece estar correlacionado com o aumento de casos de microcefalia.

Um estudo recente identificou que o ZIKV infecta e se replica de maneira eficiente em células progenitoras neurais humanas no prosencéfalo. Essas células, quando infectadas, podem liberar novas partículas de vírus, levando a uma infecção disseminada, com até 90% das células sendo positivas para o vírus. Entretanto, o vírus parece ser menos infeccioso para células neurais mais desenvolvidas, o que pode sugerir que os cérebros fetais são provavelmente muito mais suscetíveis ao ZIKV do que cérebros adultos (PETRIBU, 2018).

Microcefalia é um sinal importante, no entanto, não está presente em todos os casos de síndrome congênita por ZIKV, não sendo um fator de exclusão a circunferência cefálica normal para a idade gestacional e sexo. Existem alguns achados tomográficos predominantes na tomografia computadorizada de crânio em recém-nascidos com síndrome congênita pelo ZIKV, não patognomônicos, mas fortemente sugestivos de um padrão: redução volumétrica do encéfalo, malformação do desenvolvimento cortical, calcificações, predominantemente na junção corticossubcortical dos lobos frontais, ventriculomegalia (sobretudo com colpocefalia) e proeminência do osso occipital.(PETRIBU, 2018).

Importante de se enfatizar que a ausência de microcefalia ao nascimento não exclui a possibilidade de infecção congênita pelo vírus Zika. Estudos demonstram que a perda de volume do parênquima está significativamente associada à dismorfologia da abóbada craniana. Como a gravidade da microcefalia está diretamente relacionada ao dano neurológico

subjacente, também pode ser usado como um indicador prognóstico da gravidade do dano neurológico (SILVA, 2020).

7 CONCLUSÕES

O objetivo do presente estudo foi investigar os potenciais riscos toxicológicos da utilização do piriproxifeno concomitante a infecção por vírus Zika, no que se refere à toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade (Segmento II de avaliação de toxicidade reprodutiva), contribuindo para a elucidação de questões relacionadas à segurança do seu uso durante a fase da organogênese em ratos Wistar, e a possível interação de ambos. Para tanto foram avaliados efeitos do piriproxifeno sobre as possíveis alterações no desenvolvimento fetal da progênie exposta durante a fase de organogênese, os efeitos do piriproxifeno quanto à possibilidade de produzir efeitos teratogênicos nas progênies expostas durante a organogênese concomitantemente ao vírus Zika, e buscar uma possível interação entre ambos na etiologia de anomalias craniocerebrais observadas na doença viral.

O protocolo utilizado durante o período de organogênese fetal em ratos Wistar, para avaliação da toxicidade pré-natal, nos permite concluir que:

- Não foi observada toxicidade materna sistêmica em nenhum dos grupos testados, não sendo observadas alterações de massa corporal relativa das progenitoras, no consumo de água e ração;
- Não foi constatada a presença de diarreia, piloereção, estresse, tremores, hemorragia, aborto, óbito ou outras alterações nos grupos tratados e no grupo controle, evidenciando reduzido potencial de toxicidade;
- Em relação as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie e seus efeitos teratogênicos, todos os grupos tratados apresentaram alterações sugestivas de retardo no desenvolvimento ósseo dos fetos;
- Os três tratamentos testados durante a organogênese não provocam malformações externas;
- Pela análise dos fetos dos diferentes grupos é possível identificar alterações ósseas na cabeça e nas regiões cervical, torácica, lombar e pélvica;
- Com relação às alterações na cabeça é possível inferir na interação entre piriproxifeno e Zika (GIV) administrados concomitantemente pelo aumento da ocorrência de supraoccipital com formato irregular, supraoccipital com ossificação incompleta, zigomático com fusão e calota pobremente ossificada, em relação ao tratamento isolado com piriproxifeno (GII) e Zika (GIII);

- Nas alterações cervicais, torácicas, lombares e pélvicas a interação entre piroxicam e Zika pode ser inferida pelo aumento de ocorrências de esternebras de tamanho reduzido e pobremente ossificada, além de ossificação incompleta de vértebras lombares, em relação ao tratamento isolado;

- É possível identificar interação entre piroxicam e Zika no aumento do número de perdas pré-implantação em relação ao tratamento isolado;

- Os achados observados não parecem estar relacionados com a ocorrência de microcefalia.

Tendo em vista os resultados obtidos e as inferências que os mesmos suscitaram, sugere-se os seguintes desdobramentos de pesquisa:

1. aumento no número de doses do piroxicam;
2. aumento na carga viral injetada bem como o número de administrações;
3. teste das possíveis interações entre piroxicam e Zika administrados concomitantemente em outros segmentos de análise da toxicidade reprodutiva (segmentos I e III).

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. *et al.* Mosquito - disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003702>. Acesso em: 11 jul 2022
- 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.
- ASHWAL, S.; MICHELSON, D.; PLAWNER, L.; DOBYNS, WB. Practice parameter: diagnostic assessment 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* 2009; 73: 887–97.
- 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretrizes nacionais para a prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: DF, 2009
- 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: 20 dez 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 49p. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/PROTOCOLO%20DE%20ATENDIMENTO%20PARA%20MICROCEFALIA.pdf> . Acesso em: 28 jun. 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. 2017. Orientações técnicas para a utilização do larvicida piriproxifeno (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*. BRASIL, 2017a Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/15.%20Of%C3%ADcio%20Circular%2014.2017.GAB.SVS.MS_Nota%20Informativa%20n%C2%BA%20013-2017.pdf Acesso em: 17 de julho 2022.
- 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. BRASIL, 2017b. Disponível em: <https://saude.rr.gov.br/cgvs/index.php/sport/technology/boletins-epidemiologicos/category/11-boletim-epidemiologico-microcefalia?download=10:boletim-epidemiologico-microcefalia-n-01>. . Acesso em: 9 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS. 1. ed. Brasília, DF, 2017. BRASIL, 2017c. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf Acesso em: 13 julho 2022.

CHAHOU, I.; FAQI, A. S. Atlas of external and skeletal anomalies in rats. Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Berlin, v.1, n.20, 1997

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.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Brasília: CONCEA, 2013a.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 15, de 16 de dezembro de 2013. Brasília: CONCEA, 2013b.

_____. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Brasília: CONCEA, 2013c

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: <https://www.nature.com/articles/nature18296> . Acesso em: 01 set 2022.

DICK, G. W. A. et al. Zika Virus (D): Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Oxford, v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952.

DICK, G.W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1953;47:13-48.

DZIECIOLOWSKA, S. et al. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika vírus 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: 22 mar. 2022.

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

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/document/EPA-HQ-OPP-2011-1012-0005> . Acesso em: 19 dez. 2022.

EPA – Environmental Protection Agency. Guidelines for reproductive toxicity risk assessment. *Federal Register*, Washington, v.61, n.212, p.56274-56322, Oct. 1996.

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation (EC) nº 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures. *Official Journal of the European Union*, Bruxelas, 31 dez 2008..

EUROPEAN COMMISSION (EC). Regulation (EC) nº 1272/2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures: last amended by regulation (EU) Nº 2015/1221. *Official Journal of the European Union*, Bruxelas, 25 jul 2015.

FANTONI, DT; CORTOPASSI, SRG; BERNARDI, MM. Anestésicos Inalatórios. In: Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária. 5 ed. Rio de Janeiro: Guannabara Koogan;2011.p. 118-28.

FERNANDES, N. C.; NOGUEIRA, J. S.; RESSIO, R. A.; CIRQUEIRA, C. S.; KIMURA, L. M.; FERNANDES, K. R.; CUNHA, M. S.; SOUZA, R. P.; GUERRA, J. M. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 69, n. 2, p. 63-71, 2017.

FOURRIER, J. et al. Larval exposure to the juvenile hormone analog pyriproxyfen disrupts acceptance of and social behavior performance in adult honeybees. *PloS One*, v. 10, n. 7. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132985> . Acesso em: 10 abr. 2022.

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: 13 julho 2022

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.

HAYES, Edward B. Zika Virus Outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*. Georgia, USA., v. 15, n. 9, p. 1347-1350. set. 2009.

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://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26876373/> . Acesso em: 02 jul. 2020

HOLLENBACH, C. B., BING, R. S., STEDILE, R., DA SILVA MELLO, F. P., SCHUCH, T. L., RODRIGUES, M. R. A., ... & DE MELLO, J. R. B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43, 1295. 2015.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). *Vector-borne diseases: understanding the environmental, human health, and ecological connections*. Washington: The National Academies Press, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21452451/> . Acesso em: 15 out. 2021.

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

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; 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.

LESSER, Jeffrey; KITRON, Uriel. A geografia social do zika no Brasil. *Estudos Avançados*, São Paulo- Brasil, v. 30, n. 88, p. 167-175, dez 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/ea/v30n88/0103-4014-ea-30-88-0167.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2020.

- LI, Cui 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.
- LINTON, S.; BARROW, L.; DAVIES, C.; HARMAN, L. Potential endocrine disruption of ovary synthesis in the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* by the insecticide pyriproxyfen. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1748-5827.2001.tb02454.x> . Acesso em: 2 abr. 2020.
- 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: . Acesso em: 19 dez. 2022.
- 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.
- 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: . Acesso em: 15 mar. 2022.
- MELLO, M. S. C. Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifetil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007
- 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.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- OECD/OCDE. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. 2001. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl414.pdf. Acesso em: 23 abril 2022.
- OHBA, S. Y.; OHASHI, K.; PUJIYATI, E.; HIGA, Y.; KAWADA, H.; MITO, N.; TAKAGI, M. The Effect of Pyriproxyfen as a “Population Growth Regulator” against *Aedes albopictus* under Semi-Field Conditions. 2013.
- PADILLA-TORRES, S. D.; FERRAZ, G.; LUZ, S. L. B.; ZAMORA-PEREA, E.; ABAD-FRANCH, F. Modeling dengue vector dynamics under imperfect detection: three years of site-occupancy by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban Amazonia. 2013. Disponível em: . Acesso em: 18 jun. 2020.
- PETRIBU, N. C. Common findings on head computed tomography in neonates with confirmed congenital Zika syndrome. **Radiologia Brasileira**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 366-371, 14 nov. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2017.0119>.
- PORTAL DA SAÚDE. Orientações para uso do larvicida pyriproxifen no controle do *Aedes aegypti*. 2014.
- 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->

sobremicrocefalia-e-doencas-vetoriais-relacionadas-ao-aedes-aegypti-os-perigos-das-abordagenscom-larvicidas-e-nebulizacoes-quimicas-fumace/>. Acesso em: 30 abr. 2022;

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.

SAEGUSA, T; KITAJIMA, S.; NARAMA, I. SUMILARV - Study of 5-31183 by oral administration during the period of fetal organogenesis in rats. Submitted to WHO by Sumitomo Chemical Co., Ltd. 1988

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.

SARTORI, A.S. Avaliação da toxicidade pré-natal: estudo de teratogenicidade do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar. 2018. 102 f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

SARTORI, A.S. Avaliação da toxicidade pré-natal: estudo de teratogenicidade do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar. 2020. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 72, n.3, p. 719-728, 2020.

SEBERINO, G.B. Avaliação da toxicidade pré natal: estudo de teratogenicidade (segmento II) da oleuropeína em ratos Wistar.2020.88 f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

SHERER, Morgan L.; KHANAL, Pragyan; TALHAM, Gwen; BRANNICK, Erin M.; PARCELLS, Mark S.; SCHWARZ, Jaclyn M.. Zika virus infection of pregnant rats and associated neurological consequences in the offspring. **Plos One**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-16, 20 jun. 2019.

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. 2022.

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.

SILVA, L.F. Caracterização inovadora da morfologia da cabeça de bebês nascidos com o vírus zika: uma inovação metodológica para amplas aplicações clínicas Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista São Paulo 2020. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/191803/silva_lf_dr_araca_int.pdf?sequence=8&isAllowed=y Acesso em 23 ago. 2022.

SILVA, M. R. NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA EXPOSIÇÃO AO PIRIPROXIFENO DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *Gallus domesticus*. 2020. 92 p. Dissertação (MESTRADO) - Universidade Federal de Santa Catarina, FLORIANÓPOLIS, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/216050/PBCD0119-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 1 ago. 2022.

SOLECKI, R., BARBELLION, S., BERGMANN, B., BÜRGIN, H., BUSCHMANN, J., CLARK, R., ... & GROTE, K. Harmonization of description and classification of fetal observations: achievements and problems still unresolved: report of the 7th Workshop on the Terminology in Developmental Toxicology Berlin, 4–6 May 2011. *Reproductive Toxicology*, 35, 48-55. 2013.

STEIGENGA, M. J.; HOFFMANN, K. H.; FISCHER, K. Effects of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on female reproduction and longevity in the butterfly *Bicyclus anynana*. *Entomological Science*, Melbourne, v.9, n.3, p.269-279, set. 2006

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: https://www.researchgate.net/publication/298194551_Pyriproxifen_and_microcephaly_an_investigation_of_potential_ties_to_the_ongoing_Zika_epidemic . Acesso em 2 de jun. 2022.

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: <https://bioone.org/journals/journal-of-economic-entomology/volume-98/issue-6/0022-0493-98.6.2169/Effects-of-Juvenile-Hormone-Analogs-on-New-Reproductives-and-Colony/10.1603/0022-0493-98.6.2169.full> . Acesso em: 28 mar. 2022.

TAYLOR, W. R.; VAN DYKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, v. 9, n. 2, p. 107-119. 1985. Disponível em: <http://sfi.mnhn.fr/cybiurn/numeros/1985/92/01-Taylor%5b92%5d107-119.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

TANTIBANCHACHAI, C. Retinoids as Teratogens. *Embryo Project Encyclopedia*. Arizona State University. fev. 2014. Disponível em: <https://embryo.asu.edu/handle/10776/7566> Acesso em: 12 jul. 2020.

THIEL et al. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 8. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 981-998

URAKI, R.; JURADO, K. A.; HWANG, J.; SZIGETI-BUCK, K.; HORVATH, T. L.; IWASAKI, A.; FIKRIG, E. Fetal Growth Restriction Caused by Sexual Transmission of Zika Virus in Mice. **J Infect Dis**, v. 215, n. 11, p. 1720-1724, 2017.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VANI, J.M.; SCHWEICH-ADAMI, L.C.; AUHAREK, S.A. et al.. Pyriproxyfen does not cause microcephaly or malformations in a preclinical mammalian model. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 4585-4593, 18 set. 2020.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354209004951?via%3Dihub> . Acesso em: 5 out. 2021

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). Pesticides and their application - for the control of vectors and pests of public health importance. Geneva: WHO, 2006a. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69795/WHO_CDS_NTD_WHOPEP_GCDPP_2006.1_eng.pdf;jsessionid=80D2B8C0642F9CC5F6CA4FA03BF9F8F1?sequence=1 . Acesso em: 5 abr. 2022

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

WHO – World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Disponível em: <https://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf> . Acesso em: 28 mar. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for Drinking-water quality. Geneva: WHO, 2011.

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.

ZENICK, H.; CLEGG, E. D. Assessment of male reproductive toxicity: A risk of assessment approach. In: HILES, Richard A. Principles and methods of toxicology. New York: Raven Press, 1989.



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 39602

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRE-NATAL - ESTUDO DE TERATOGENICIDADE (SEGMENTO II) DO INSETICIDA PIRIPROXIFENO EM RATAS WISTAR INFECTADAS LABORATORIALMENTE COM VIRUS ZIKA

Vigência: 01/08/2020 à 30/12/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

JOAO ROBERTO BRAGA DE MELLO - coordenador desde 01/08/2020
ALESSANDRA SANTOS WEISS - desde 01/08/2020
RAQUEL LUÍSA BREUNIG - desde 01/08/2020
MURIEL RODRIGUES FERRAZ DE OLIVEIRA - desde 01/08/2020
Gisele Barcelos Seberino - desde 01/08/2020
Branda Katelyn Viegas da Rosa - desde 01/08/2020
Wellington de Almeida - desde 01/08/2020
Adriana Souza dos Santos - desde 01/08/2020
PAULO MICHEL ROEHE - pesquisador desde 01/08/2020
FERNANDA BASTOS DE MELLO - pesquisador desde 01/08/2020
LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA - pesquisador desde 01/08/2020

Equipe Externa:

Ana Paula Muterle Varela - pesquisador desde 01/08/2020
Thais Furnaco Teixeira - pesquisador desde 01/08/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 26/10/2020 - Reunião via webconferência - Mconf UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 120 ratas Wistar de 90 dias de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório-CREAL / UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 5 de Novembro de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética