

## A exposição ao piriproxifeno causa microcefalia? Uma revisão sistemática de efeitos tóxicos em dois modelos animais

Does exposure to pyriproxyfen cause microcephaly? a systematic review of toxic effects in two animal models

¿La exposición al piriproxifeno causa microcefalia? una revisión sistemática de los efectos tóxicos en dos modelos animales

Renata Meireles Oliveira Padilha<sup>1</sup>, Jadson Freitas da Silva<sup>1</sup>, Amanda Rodrigues dos Santos Magnabosco<sup>1</sup>, Sâmara da Silva Gomes<sup>1</sup>, Marília Sales Ribeiro Cadena<sup>1</sup>, Pabyton Gonçalves Cadena<sup>1</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Este estudo objetivou avaliar os estudos sobre a toxicidade do piriproxifeno em modelos animais de peixe-zebra e murino e sua relação com a microcefalia. **Métodos:** Para busca foram utilizadas as palavras-chave *pyriproxyfen* and *toxicity* nas plataformas Pubmed, Scopus, ScieLo e ScienceDirect. Foram selecionados os artigos que utilizaram as palavras-chaves no título ou resumo. Os critérios de inclusão foram: artigos em inglês ou português que descrevessem um estudo experimental *in vivo* ou *in vitro* com *zebrafish* (*Danio rerio*) e murinos. As informações extraídas foram o ano de publicação, país, modelo animal e desfechos de toxicidade. **Resultados:** Foram selecionados 13 artigos. Exposição a concentrações de aplicação acima da recomendação são tóxicas. Não foi observado evidências de microcefalia. Observamos um aumento no número de publicações após a epidemia, o país com maior número de publicação foi o Brasil e o peixe-zebra foi modelo mais utilizado. **Considerações finais:** Baseado nos estudos o piriproxifeno não está relacionado como causa da microcefalia, entretanto causa efeitos tóxicos. Diante da grande utilização deste larvicida em programas de controles de arboviroses recomendamos sua utilização com cautela.

**Palavras-chave:** Pesticidas, Microcefalia, Toxicidade, Saúde Ambiental.

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to evaluate studies on the toxicity of pyriproxyfen in animal models of zebrafish and murine and its relationship with microcephaly. **Methods:** The keywords pyriproxyfen and toxicity were used for the search on Pubmed, Scopus, ScieLo and ScienceDirect platforms. Articles that used the keywords in the title or abstract were selected. Inclusion criteria were: articles in English or Portuguese that described an experimental study *in vivo* or *in vitro* with zebrafish (*Danio rerio*) and mice. The information extracted were the year of publication, country, animal model and toxicity outcomes. **Results:** 13 articles were selected. Exposure to application concentration above the recommendation is toxic. No evidence of microcephaly was observed. We observed an increase in the number of publications after the epidemic, the country with the highest number of publications was Brazil and the zebrafish was the most used model. **Final considerations:** Based on the studies, pyriproxyfen is not related as a cause of microcephaly, however, it causes toxic effects. Given the wide use of this larvicide in arbovirus control programs, we recommend its use with caution.

**Keywords:** Pesticides, Microcephaly, Toxicity, Environmental Health.

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife - PE.

## RESUMEN

**Objetivo:** Este estudio tuvo como objetivo evaluar los estudios sobre la toxicidad del piriproxifeno en modelos animales de pez cebra y murino y su relación con la microcefalia. **Métodos:** Se utilizaron las palabras clave piriproxifeno y toxicidad para la búsqueda en las plataformas Pubmed, Scopus, ScieLo y ScienceDirect. Se seleccionaron los artículos que utilizaron las palabras clave en el título o resumen. Los criterios de inclusión fueron: artículos en inglés o portugués que describieran un estudio experimental in vivo o in vitro con pez cebra (*Danio rerio*) y ratones. La información extraída fue el año de publicación, país, modelo animal y resultados de toxicidad. **Resultados:** 13 artículos fueron seleccionados. La exposición a una concentración de aplicación superior a la recomendada es tóxica. No se observó evidencia de microcefalia. Observamos un aumento en el número de publicaciones después de la epidemia, el país con mayor número de publicaciones fue Brasil y el pez cebra fue el modelo más utilizado. **Consideraciones finales:** Con base en los estudios, el piriproxifeno no está relacionado como causa de microcefalia, sin embargo provoca efectos tóxicos. Dado el amplio uso de este larvicida en los programas de control de arbovirus, recomendamos su uso con precaución.

**Palabras clave:** Pesticidas, Microcefalia, Toxicidad, Salud Ambiental.

## INTRODUÇÃO

Os pesticidas são produtos químicos naturais ou sintéticos usados no controle preventivo de pragas. Esses compostos são amplamente utilizados no controle de insetos que servem como vetores de doenças (RICHARDSON JR, et al., 2019). Mosquitos vetores do gênero *Aedes* transmitem arboviroses como a Dengue, Chikungunya e Zika (ALAM I, et al., 2022) A estratégia mais utilizada no combate às arboviroses é a utilização de pesticidas para controlar as populações dos mosquitos dentre os quais podemos citar os inseticidas e larvicidas (MAOZ D, et al., 2017; WEEKS ENI, et al., 2021).

O Brasil segue as recomendações do Ministério da Saúde para aplicações de pesticidas e no ano de 2014 foi iniciada a utilização do larvicida piriproxifeno como substituto do larvicida *novaluron* (BRASIL, 2014). O piriproxifeno (2-[1-metil-2-(4-fenoxifenoxi)etoxi]piridina) (PPF) é um pesticida regulador de crescimento que funciona de forma análoga ao hormônio juvenil de insetos e suprime o mecanismo da embriogênese. O PPF é utilizado na agricultura, horticultura e no combate à insetos em campanhas de saúde pública (DEVILLERS J, 2020). É utilizado principalmente como larvicida para combater insetos que apresentam a fase larval em ambientes aquáticos (BRASIL, 2014).

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) o PPF é considerado seguro e de baixa toxicidade para humanos (OMS, 2008). A concentração máxima para aplicação de PPF nas fontes de água potável é de 0,01 mg/L e o valor de instrução para ingestão diária admissível de PPF é de 100 mg por kg de peso corporal por dia (DZIECILOWSKA S, et al., 2017). No Brasil, o produto contendo PPF é aplicado em recipientes de armazenamento de água potável em cidades que não possuem abastecimento de água de qualidade (LUCMANN MR, et al., 2021).

A epidemia de microcefalia que ocorreu no Brasil no final de 2015, coincidiu com o início do uso do PPF no país e hipóteses de que o uso deste larvicida em recipientes de água potável poderia ter sido o agente causador sugeriram em diversos veículos de comunicação (ARAÚJO TVB, et al., 2018).

A microcefalia é definida quando o perímetro cefálico occipital-frontal é 2 desvios padrão menor que a média esperada para outros bebês da mesma idade e sexo (BECERRA-SOLANO LE, et al., 2021). Esta doença pode ocasionar morte do recém-nascido, deficiências cognitivas permanentes, atraso no desenvolvimento, convulsões, dificuldade de alimentação e locomoção (CRISTOFOLI F, et al., 2020).

Segundo Parens R, et al. (2017), o PPF poderia se ligar ao receptor do ácido retinóico alterando a sinalização dos receptores celulares em momentos inapropriados e podendo interferir no desenvolvimento do embrião humano, principalmente o neurodesenvolvimento. Embora não tenha havido correlação entre microcefalia e a exposição ao PPF (ARAÚJO TVB, et al., 2018) e que, por si só, o larvicida não tenha sido o

causador de fato de microcefalia (DZIECIOLOWSKA S, et al., 2017), há evidências de toxicidade em vertebrados (SARTORI AS, et al., 2020). Além disso, sua toxicidade não se restringe apenas a insetos e pode afetar organismos não-alvo (MAHARAJAN K, et al., 2018; GUSSO D, et al., 2020).

Os modelos de animais de laboratório são utilizados com o objetivo de comparação de processos biológicos com os seres humanos. Os modelos murinos são bastante utilizados e apresentam vantagens em relação seu tamanho pequeno, semelhança genética com humanos (99% de genes homólogos), reprodução confiável e vida curta e vem sendo utilizado como modelo para várias doenças humanas, produção de medicamentos e toxicidade (KOHNKEN R, et al., 2017).

O modelo peixe-zebra vem ganhando espaço nos últimos vinte anos em diversas áreas de pesquisas e tem sido utilizado como uma alternativa aceitável aos modelos de mamíferos (GONÇALVES IFS, et al., 2020). Suas vantagens estão relacionadas à alta taxa de fertilidade, embriões transparentes, prole numerosa, rápido desenvolvimento embrionário, homologia fisiológica (LI M, et al., 2019) e 70% de similaridade genética com humanos (HOWE K, et al., 2013).

Os modelos animais descritos acima foram escolhidos para essa revisão sistemática, pois é possível realizar a avaliação da ocorrência de microcefalia através da medicação do perímetro cefálico ou pela análise da massa cerebral nos estágios iniciais de vida (SARTORI AS, et al., 2020; DZIECIOLOWSKA S, et al., 2017).

Assim, esta revisão sistemática tem como objetivo analisar a literatura recente sobre a toxicidade do larvicida piriproxifeno em modelos animais de peixe-zebra (*Danio rerio*) e murinos nos últimos 12 anos e se houve relação da exposição do piriproxifeno com a microcefalia utilizando as informações disponíveis na literatura com estes modelos.

## MÉTODOS

Uma revisão sistemática da literatura foi realizada por meio da busca de artigos científicos publicados entre 2010 e 2022. As plataformas eletrônicas *Pubmed*, *Science Direct*, *Scopus* e *Scielo* foram utilizadas para a pesquisa dos artigos científicos. O Protocolo (nº CRD42022365664) foi registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews* (PROSPERO).

Foram escolhidos dois grupos comando, o primeiro com o composto de interesse (*pyriproxyfen*) e o segundo relacionado a toxicidade do composto (*toxicity*). Para combinação dos termos foi utilizado o operador booleano "AND".

Foram selecionados artigos científicos originais que descreveram estudos experimentais *in vivo* ou *in vitro* sobre a toxicidade do PPF em modelos de animais de peixe-zebra e murinos. Os artigos foram selecionados em duas etapas.

Na primeira, foi realizada a leitura do título e do resumo e foram selecionados os artigos que apresentavam as palavras de busca no título ou resumo. Esses artigos selecionados compuseram a base de dados para a pesquisa.

Na segunda etapa, foram analisados os critérios de inclusão e exclusão dos artigos. Foram incluídos neste estudo artigos publicados em inglês ou português, que descreviam um estudo experimental *in vivo* ou *in vitro* e que utilizaram como modelo animal o peixe-zebra ou roedores expostos ao PPF. Os critérios de exclusão foram estudos experimentais que não utilizam os modelos animais escolhidos, artigos de revisão, dissertações e teses.

Os artigos selecionados foram analisados para a extração dos seguintes dados: autores, ano de publicação, país, tipos de modelo animal, concentrações tóxicas e efeitos tóxicos. Também foi analisado nessa revisão sistemática, a quantidade de artigos sobre a toxicidade do PPF antes e depois da epidemia de microcefalia no Brasil, qual o país que apresentou maior número de publicações, qual o modelo animal mais

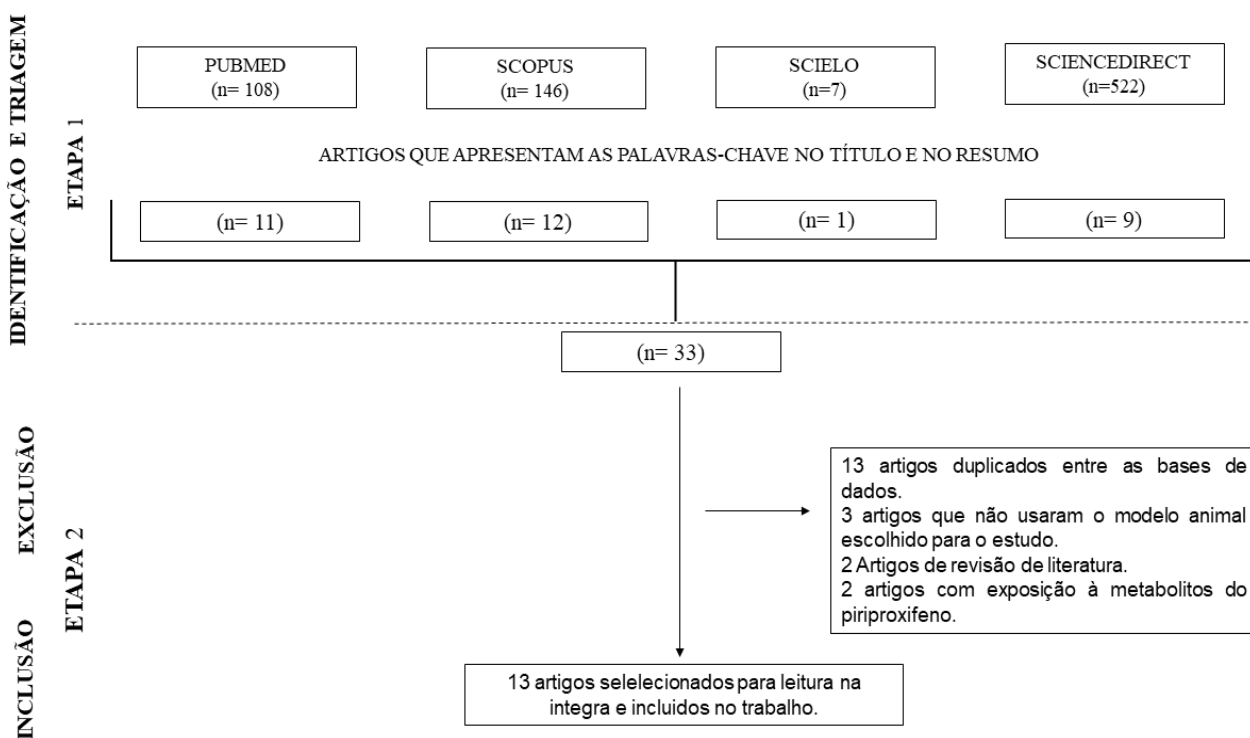
utilizado para avaliar os possíveis efeitos tóxicos e se houve artigos que relacionassem o PPF com a microcefalia.

Foram utilizados filtros para o período de publicação e para a seleção dos idiomas nas bases de dados utilizadas. Além disso, para a realização desta revisão sistemática foi utilizado a verificação manual. Os gráficos foram gerados no programa Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA, EUA).

## RESULTADOS

Foram encontrados 108 artigos no PubMed, 7 no SciELO, 146 no *Scopus* e 522 no *Science Direct*, totalizando 783 artigos (**Figura 1**). Deste total, 33 artigos atenderam a todos os critérios de inclusão. Após critérios de exclusão, foram selecionados 13 artigos (**Figura 1**). Destes 13 estudos experimentais, 10 foram *in vivo*, 2 foram *in vivo* e *in vitro* e 1 foi *in vitro*. Finalmente, apenas 5 artigos avaliaram a microcefalia, sendo 3 com murino e 2 com peixe-zebra.

**Figura 1** - Fluxograma ilustrando os artigos que foram incluídos e excluídos na revisão.



**Fonte:** Padilha RMO, et al., 2023.

Os resultados encontrados quanto aos trabalhos experimentais que avaliaram os efeitos tóxicos da exposição ao PPF utilizando o modelo animal de peixe-zebra estão sintetizados no **Quadro 1** e utilizando modelo animal de roedores no **Quadro 2**.

O PPF apresentou efeitos tóxicos em diferentes estágios de vida no modelo peixe-zebra: embrião, larva e adulto. Os principais efeitos tóxicos observados foram mortalidade, efeitos teratogênicos, alterações bioquímicas e histopatológicas (**Quadro 1**). Já em modelo murino, os principais efeitos observados foram mortalidade, atraso de desenvolvimento, diminuição do ganho do peso e alterações histopatológicas (**Quadro 2**).

**Quadro 1** - Síntese dos artigos que avaliaram a os efeitos tóxicos da exposição ao piriproxifeno no modelo animal de peixe-zebra (*Danio rerio*).

Referência	Estágio de vida	Renovação do PPF	Concentrações com efeitos tóxicos	Avaliação	Principais efeitos tóxicos encontrados
PADILLA S, et al., 2012	Embriões e larvas	Renovação diária	26,13 µM	144 hpf	Mortalidade.
TRUONG L, et al., 2016	Embriões e larvas	Renovação diária e exposição estática.	6,4 e 64,0 µM	120 hpf	Mortalidade, alterações morfológicas, efeitos subletais e hipoatividade natatória.
DZIECIOLOWSKA S, et al., 2017	Embriões e larvas	Renovação a cada dois dias.	1, 10 e 100 µg/mL	7 dpf	Baixa taxa de sobrevivência e Mortalidade.
HORIE Y, et al. 2017	Embriões	Renovação a cada dois dias.	0,23 e 0,66 mg/L	4 dpf e 8 dpf	Mortalidade e efeitos subletais.
MAHARAJAN K, et al., 2018	Embriões e larvas	Renovação diária.	0,33 e 1,66 µg/mL	48, 72, e 96 hpf	Efeitos subletais, alterações bioquímicas e histopatológicas, genotoxicidade e cardiotoxicidade
GUSSO D, et al., 2020	Adultos	96h de exposição.	0,125, 0,675, e 1.750 mg/L	96h	Redução no nível de cortisol e de memória de fuga.
MAHARAJAN K, et al., 2020	Adultos	Renovação diária.	10 e 100 µg/L	21 dias	Alterações na histologia das gônadas, nível hormonal e transcrições de genes.
AZEVEDO RD, et al., 2021	Adultos	16h de exposição.	0.001, 0.010 e 0.1000 mg/mL	16 h	Inibição da AChE, neurotoxicidade e alteração na homeostase do cálcio em células do cérebro.
DE OLIVEIRA VS, et al., 2021	Adultos e testículo	Renovação diária.	10 <sup>-3</sup> e 10 <sup>-9</sup> M	30 minutos e 7 dias	Diminuição da capacidade antioxidante, stress oxidativo, alteração histopatológica no testículo e na capacidade estrogênica.

**Legenda:** PPF: piriproxifeno; AChE: acetilcolinesterase; hpf: horas pós-fertilização; dpf: dias pós-fertilização.

**Fonte:** Padilha RMO, et al., 2023.

**Quadro 2** - Síntese dos artigos que avaliaram a os efeitos tóxicos da exposição ao piriproxifeno (PPF) durante a gravidez em modelo murino.

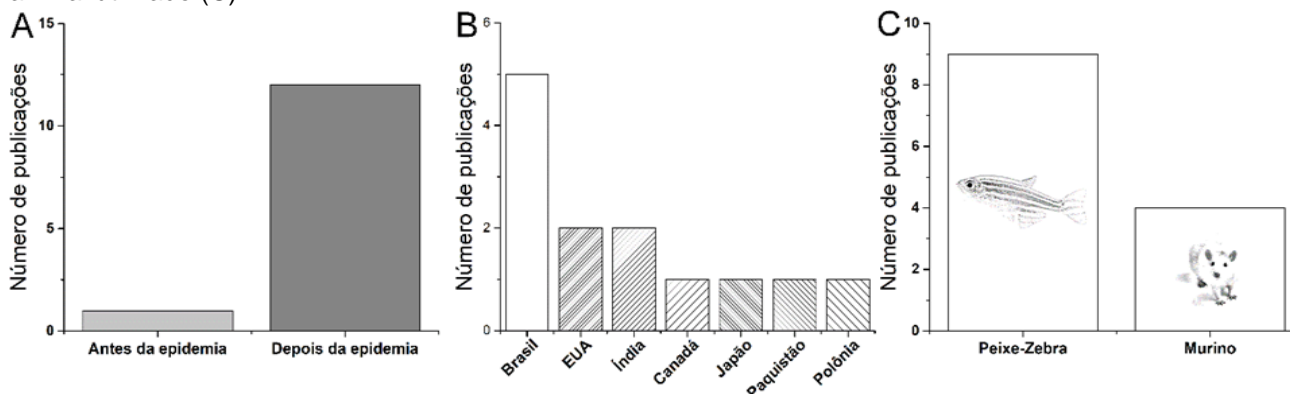
Referências	Modelo animal	Exposição do PPF	Tempo de exposição	Concentração tóxica	Principais efeitos
SARTORI AS, et al., 2020	Ratos Wistar	Administração oral diariamente	6º ao 15º dia	300 e 500 mg/kg	Alteração esquelética indicativo de atraso no desenvolvimento.
VANI JM, et al., 2020	Camundongos suíços	Administração oral diariamente	1º ao 18º dia	Não observado	Não observado.
SHAHID A e SAHER M, 2020	Camundongos suíços	Administração oral diariamente	7º ao 17º dia	30, 100, 300 e 1000 mg/kg	Mortalidade, diminuição do ganho de peso corporal, alterações histopatológicas e neurotoxicidade.
CHLOPECKA M, et al., 2018	<i>In vitro</i> Ratos Wistar	Tecido de duodeno e jejuno de ratos.	6 minutos	100, 20, 4 e 0,8 M	Alteração na atividade muscular espontânea.

Fonte: Padilha RMO, et al., 2023.

Após análise dos estudos *in vivo*, se observou que os estudos ocorreram sempre nas fases iniciais do desenvolvimento do animal com embriões de peixe-zebra e roedores pré-natais para análise de possíveis efeitos de microcefalia. Também observamos, que a exposição ao larvicida não causou microcefalia nas fases iniciais da vida, tanto na concentração de aplicação recomendada pela Organização Mundial de Saúde, quanto nas concentrações acima da concentração recomendada. Os resultados mostraram que após a epidemia de microcefalia houve um aumento no número de estudos sobre a toxicidade do PPF a partir de 2016 (**Figura 2A**).

O país com maior número de publicações foi o Brasil (**Figura 2B**), seguido de Estados Unidos e Índia, mesmo não tendo sido divulgado pelos veículos de comunicação destes países possíveis casos de microcefalia. O modelo animal mais utilizado para analisar os efeitos de toxicidade do PPF foi o peixe-zebra (**Figura 2C**) mesmo não sendo um mamífero.

**Figura 2** - Artigos publicados avaliando a toxicidade do piriproxifeno antes e depois da epidemia de microcefalia (**A**), distribuição geográfica dos artigos (**B**) e número de publicações de acordo com o modelo animal utilizado (**C**).



Fonte: Padilha RMO, et al., 2023.



## DISCUSSÃO

Foi observado um aumento no número de publicações avaliando a toxicidade do PPF a partir do ano de 2016. Isto pode ser atribuído à epidemia de microcefalia no Brasil. Este evento tem impulsionado pesquisas até o presente momento sobre a toxicidade do larvicida PPF. Dos cinco estudos experimentais *in vivo* encontrados nesta revisão sistemática, não houve evidência de que a exposição ao PPF na concentração de aplicação recomendada (0,01 mg/L) e em concentrações acima da recomendação, cause microcefalia nas fases iniciais da vida (TRUONG L, et al., 2016; DZIECIOLOWSKA S, et al., 2017; MAHARAJAN K, et al., 2018; SARTORI AS, et al., 2020; SHAHID A e SAHER M, et al., 2020; VANI JM, et al., 2020).

A utilização de modelos animais pode permitir uma avaliação dos riscos ambientais e para a saúde humana à pesticidas e químicos. O peixe-zebra foi o modelo animal mais utilizado para analisar os efeitos de toxicidade do PPF durante o período de busca. Um total de 9 artigos utilizaram este modelo animal. O modelo peixe-zebra tem sido amplamente utilizado para investigar os efeitos de pesticidas, além disso, tem sido utilizado como uma alternativa aceitável aos modelos de mamíferos (GONÇALVES IFS, et al., 2020).

Além disso outras características estão relacionadas a utilização desse modelo animal, tais como alta taxa de fertilização, fácil manipulação, rápido desenvolvimento embrionário e embriões transparentes que permite o acompanhamento embrionário (REGALDIE AS, et al., 2021). Essas características citadas acima, contribuíram para a escolha do modelo peixe-zebra para a investigação da microcefalia e da toxicidade do PPF, principalmente após a epidemia de microcefalia no Brasil.

O primeiro artigo publicado durante o período de busca foi de Padilla S, et al. (2012). O modelo de peixe-zebra foi utilizado em testes de toxicidade de produtos químicos no programa ToxCast™, incluindo o PPF para determinar o valor de AC50 (valor de dose-resposta capaz de provocar algum efeito tóxico em 50% da população). Neste estudo, foi determinado o valor de 26,13 µM em embriões de peixe-zebra expostos ao PPF. No entanto, outro estudo semelhante, também com renovação diária do PPF, apresentou valor inferior para AC50 com o valor de 5,2 µM (TRUONG L, et al., 2016). Adicionalmente, HORIE Y et al. (2017) observaram que os valores de CL50 (Valor dose-resposta capaz de provocar a morte de 50% da população) foram de 0,66 mg/L em embriões e 0,22 mg/L em larvas de peixe-zebra. Neste estudo, não foi avaliado se PPF causava microcefalia.

A exposição de embriões de peixe-zebra em concentração de aplicação utilizada na prática conforme recomendado pela OMS não resultou em anormalidades de desenvolvimento incluindo a microcefalia (TRUONG L, et al., 2016; DZIECIOLOWSKA S, et al., 2017; MAHARAJAN K, et al., 2018). No entanto, quando expostos as concentrações acima da recomendação (0,01 mg/L), causaram mortalidade e efeitos teratogênicos diversos. Dzieciolowska S, et al. (2017) observaram que embriões expostos a 1 µg/mL em 4 dias pós-fertilização (dpf) apresentaram baixa sobrevivência. Ainda, a exposição a altas concentrações (10 e 100 µg/mL) causou 100% de mortalidade em 2 dpf.

A exposição das larvas de peixe-zebra ao PPF em altas concentrações resultou em efeitos letais e subletais. Truong L, et al. (2016) observaram que a exposição a 6,4 µM em teste de toxicidade aguda com renovação diária do PPF levou a alta taxa de mortalidade e efeitos subletais como edema de saco vitelino, focinho e mandíbula anormais, eixo dobrado e alterações comportamentais como falta de resposta ao toque físico. Além disso, quando os animais foram expostos a 6,4 e 64 µM, sem renovação do PPF (teste estático), os mesmos autores observaram atividade de natação hipoativa em larvas do peixe-zebra. Este resultado foi indicativo de neurotoxicidade do composto desde baixas concentrações. A presença de efeitos teratogênicos também foi observada por HORIE Y et al. (2017), além da presença de edema de pericárdio, edema de saco vitelino e curvatura da coluna vertebral, também se observou a ausência de insuflação da bexiga natatória.

A exposição a concentrações de 0,33 µg/mL de PPF causou edema pericárdico em 72 hpf e 96 hpf em larvas de peixe-zebra. Na concentração de 1,66 µg/mL, o peixe-zebra apresentou em 72 hpf escoliose, edema pericárdico, edema do saco vitelino, e em 96 hpf foram observados edema pericárdico e do saco vitelino, alongamento do coração e atraso na eclosão. Além disso, essa exposição ao PPF apresentou efeitos tóxicos

relacionados ao estresse oxidativo, baixa atividade da acetilcolinesterase, danos no DNA, apoptose e alterações na histopatologia do coração, com afinamento dos músculos cardíacos (MAHARAJAN K, et al., 2018).

Em indivíduos do peixe-zebra em fase adulta, a exposição subcrônica de PPF na concentração de 100 µg/L em machos e fêmeas, causaram alterações histopatológicas nos órgãos reprodutivos com redução da maturação dos óvulos e espermatozoides. Também foi observado alterações no conteúdo plasmático de viletogenina, hormônios sexuais circulatórios e alterações nos transcritos de genes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em concentrações mais altas (MAHARAJAN K, et al., 2020).

Gusso D, et al. (2020) avaliaram os efeitos cognitivos, comportamentais e endócrinos da exposição ao PPF em adultos de peixe-zebra. Os peixes foram expostos às concentrações de 0,125, 0,675 e 1,75 mg/L por 96 horas em teste de toxicidade aguda. Após a exposição ao PPF, não foram observadas alterações comportamentais e de locomoção. No entanto, a exposição dos peixes a todas as concentrações mostrou uma memória de fuga prejudicada e redução no nível de cortisol.

Os efeitos do PPF também parecem ter efeito nos níveis de acetilcolinesterase e em mitocôndrias. Os machos adultos de peixe-zebra foram expostos em concentração de PPF a 0,001, 0,01 e 0,1 mg/L por 16 horas. Os resultados mostraram *in vitro* e *in vivo* que a exposição ao em concentrações mais baixas PPF podem causar redução nos níveis de acetilcolinesterase. Além disso, o PPF interferiu no funcionamento da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), cadeia de transporte de elétrons e homeostase do cálcio nas mitocôndrias do cérebro do peixe-zebra, sugerindo potencial neurotóxico (AZEVEDO RD, et al., 2020).

Adicionalmente, o PPF pode interferir no equilíbrio iônico de testículos, causar stress oxidativo e alterações na histopatologia do fígado em peixes-zebra adultos. Para isso os testículos foram incubados *in vitro* com concentrações ( $10^{-12}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  M) por 30 minutos para análises e exposição de 7 dias de PPF a  $10^{-9}$  M em adultos do sexo masculino para análises *in vivo*. Os resultados do estudo de toxicidade *in vitro* mostraram elevação do cálcio intracelular nos testículos, alterações nos cistos de espermatogônias, aumento do estresse oxidativo e diminuição da capacidade antioxidante nos testículos. Esses resultados sugerem que o PPF pode contribuir para interrupção da espermatogênese. Na análise *in vivo* a exposição causou dilatação dos vasos sanguíneos do fígado e indução da basofilia dos hepatócitos no estudo *in vivo*. (DE OLIVEIRA VS, et al., 2021)

Dos 4 artigos que utilizaram modelos animais de roedores para avaliação do PPF, um destes artigos avaliou a toxicidade do PPF *in vitro* e observaram sua capacidade de interferir na atividade de tecido muscular do intestino de murinos (CHLOPECKA M et al., 2018). Esse estudo, avaliou o potencial efeito tóxico na atividade muscular do intestino. Tecidos isolados de jejuno e duodeno (15 mm) de ratos após tratamento (retirada do tecido conjuntivo e circundante) em condições isométricas foram expostas a 0,032; 0,16; 0,8; 4; 20 e 100 µM de PPF por 6 min. O PPF interferiu na atividade espontânea nas amostras de duodeno e jejuno, causando relaxamento muscular em concentrações acima de 0,8 µM.

Os outros três artigos Sartori AS, et al. (2020), Vani JM, et al. (2020), Shahid A e Saher M (2020) investigaram a toxicidade pré-natal do PPF. Sartori AS, et al. (2020) utilizaram ratas grávidas para serem expostas a três doses 100, 300 e 500 mg/kg administradas por via oral, do 6º ao 15º dia de gestação. Após o nascimento, os fetos foram analisados e não foram encontradas malformações como a microcefalia. No entanto, houve alteração esquelética indicativa de atraso no desenvolvimento nas doses mais altas. Os efeitos do PPF também foram analisados por Vani JM, et al. (2020) que estudaram o desenvolvimento reprodutivo e embriofetal, integridade do DNA e medições da cabeça usando o modelo de camundongo. Camundongos suíços gestantes ingeriram por gavagem 0,0002 mg/kg e 0,00021 mg/kg de produto comercial que contém 0,5 G de PPF, durante a gestação (1º ao 18º). Os dados mostraram que o PPF não causou toxicidade materna e teratogenicidade e genotoxicidade no feto e que o larvicida não foi a causa para microcefalia.

Diferentemente dos estudos citados acima, a exposição ao piriproxifeno comercial apresentou toxicidade na fase pré-natal. Shahid A e Saher M (2020) investigaram as anomalias em camundongos fêmeas grávidas



e seus neonatos. Os camundongos fêmeas foram expostos ao produto comercial no Paquistão que contém 0,5% WDG de PPF a 30, 100, 300 e 1000 mg/kg por via oral diária de 7 a 17 dias de gestação. Os animais exibiram uma diminuição no ganho de peso corporal em todos os grupos tratados. Nas duas doses mais altas de PPF foram observados aumento da duração gestacional e não nasceram filhotes vivos. Além disso, alterações histopatológicas e os pesos relativos do cérebro do filhote foram diminuídos, entretanto não se caracterizou como microcefalia. Também foram observadas alterações histopatológicas de órgãos e redução da espessura cortical radial em 30 e 100 mg/kg.

De acordo com os nossos resultados, não foi observado que a exposição ao PPF causou microcefalia em modelo peixe-zebra e murinos. Os estudos que avaliaram a ocorrência de microcefalia não mostraram alterações relacionadas a redução do perímetro cefálico ou redução da massa cerebral. Apesar de que isso pode ser feito nestes modelos animais. Além disso, a microcefalia também não foi relatada nos outros estudos que avaliaram este efeito nos modelos animais. Todavia, o PPF é um pesticida bastante utilizado em muitos países e com capacidade de provocar efeitos tóxicos em modelos animais que apresentam semelhança genética com os seres humanos, como o peixe-zebra e murinos. Finalmente, ressaltamos a importância de novos estudos sobre a toxicidade do PPF relacionados a saúde humana.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O piriproxifeno é um regulador de crescimento de insetos utilizado no Brasil principalmente pela saúde pública para controlar populações de mosquitos do gênero *Aedes*. Após a epidemia de microcefalia, observou-se um aumento gradativo no número de publicações que avaliaram a toxicidade do piriproxifeno. O Brasil foi o país com maior número de artigos publicados e o animal modelo vertebrado mais utilizado tem sido desde então o peixe-zebra. O piriproxifeno não causou microcefalia em embrião de peixe-zebra e filhotes de camundongos ou ratos. Entretanto, a exposição a concentrações acima da dose de aplicação recomendada pela Organização Mundial de Saúde causou efeitos tóxicos nos modelos animais utilizados em diferentes fases da vida. A aplicação de piriproxifeno na água potável continua a representar o risco de exposição a inseticidas para organismos humanos e não-alvos. Recomendamos novos estudos para avaliação de toxicidade crônica e de toxicidade conjunta com outros pesticidas, pois no Brasil, o piriproxifeno não é utilizado de forma isolada no controle de arboviroses podendo ser um risco potencial para saúde pública.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelas bolsas concedidas à Renata Padilha, Jadson Silva, Amanda Magnabosco e Sâmara Silva. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa a Pabyton Cadena (306947/2020-0) e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

## REFERÊNCIAS

1. ALAMI I, et al. Role of Lectin in the Response of *Aedes aegypti* Against Bt Toxin. *Frontiers in immunology*, 2022; 13: 898198.
2. ARAÚJO TVB, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *The Lancet infectious diseases*, 2018; 18(3): 328-336.
3. AZEVEDO RD, et al. Effects of pyriproxyfen on *zebrafish* brain mitochondria and acetylcholinesterase. *Chemosphere*, 2020; 263: 128029.
4. BRASIL. Boletim Epidemiológico: Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika, situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios de 2015 a 2019, 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes>. Acessado em: 26 de junho de 2021.
5. BRASIL. Orientações técnica para utilização do larvicida pyriproxyfen (0,5 G) no controle de *Aedes aegypti*, 2014. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/.../Instrucoes-para-uso-de-pyriproxifen-maio-2014.pdf>. Acessado em: 20 de março de 2021.

6. BREETA RE, et al. Non-toxic and non teratogenic extract of *Thuja orientalis* L. inhibited angiogenesis in zebrafish and suppressed the growth of human lung cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018; 106: 699–706.
7. CAMPOS KB, et al. Assessment of the susceptibility status of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations to pyriproxyfen and malathion in nation-wide monitoring of insecticide resistance performed in Brazil from 2017 to 2018. *Parasites Vectors*, 2020; 13: 531.
8. CHŁOPECKA M, et al. The effect of pyriproxyfen on the motoric activity of rat intestine-*In vitro* study. *Environmental Pollution*, 2018; 241: 1146-1152.
9. DEVILLERS J. Fate and ecotoxicological effects of pyriproxyfen in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020; 27(14): 16052-16068.
10. DZIECIOŁOWSKA S, et al. The larvicide pyriproxyfen blamed during the Zika virus outbreak does not cause microcephaly in zebrafish embryos. *Scientific Reports Nature*, 2017; 7: 40067.
11. CRISTOFOLI F, et al. Variantes de novo em LMNB1 causam microcefalia sindrômica pronunciada e ruptura da integridade do envelope nuclear. *The American Journal of Human Genetics*, 2020; 107(4): 753-762.
12. GONÇALVES ÍFS, et al. Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020; 27(10): 10185-10204.
13. GUSSO D, et al. Pyriproxyfen Exposure Impairs Cognitive Parameters and Alters Cortisol Levels in Zebrafish. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2020; 14: 103.
14. BECERRA-SOLANO LE, et al. Microcephaly, an etiopathogenic vision. *Pedi Neo*, 2021; 62(4): 354-360.
15. HORIE Y, et al. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. *Journal of Applied Toxicology*, 2017; 37(10): 245-1253.
16. KOHNKEN R, et al. A. Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research. *Frontiers in oncology*, 2017; 7(22).
17. LI M, et al. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 2019; 219: 155-164.
18. MAHARAJAN K, et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): a multi-biomarker study. *Aquatic Toxicology*, 2018; 196: 132–145.
19. MAHARAJAN K, et al. "Pyriproxyfen induced impairment of reproductive endocrine homeostasis and gonadal histopathology in zebrafish (*Danio rerio*) by altered expression of hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis genes." *Science of The Total Environment*, 2020; 139496.
20. MAOZ D, et al. Community effectiveness of pyriproxyfen as a dengue vector control method: a systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017; 11(7): 1–20.
21. MOURA JAA e SOUZA-SANTOS LP. Environmental risk assessment (ERA) of pyriproxyfen in non-target aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 2020; 222: 1-9.
22. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Pyriproxyfen in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers*. 2008. Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/pyriproxyfen-background.pdf?sfvrsn=ef4b9372\\_4](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/pyriproxyfen-background.pdf?sfvrsn=ef4b9372_4). Acessado em: 30 de Junho de 2021.
23. PARENS R, et al. Possible link between pyriproxyfen and microcephaly. *PLOS Currents*, 2017; 1.
24. PADILLA S, et al. Zebrafish developmental screening of the ToxCast Phase I chemical library. *Reproductive Toxicology*, 2012; 33: 174-187.
25. REGALDIE AG, et al. Zebrafish Models of Autosomal Recessive Ataxias. *Cells*, 2021; 10(4): 836.
26. RICHARDSON JR, et al. Neurotoxicity of pesticides. *Acta neuropathologica*, 2019; 138(3): 343-362.
27. ROPER C e TANGUAY RL. *Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology*. 2ª Edition. Oregon: Oregon State University, Handbook of developmental neurotoxicology; 2018.
28. HUSTEDT JC, et al. Use of pyriproxyfen in control of *Aedes* mosquitoes: A systematic review. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2020; 14(6): e0008205.
29. SARTORI AS, et al. Avaliação da toxicidade pré-natal: estudo de teratogenicidade do inseticida piriproxifeno em ratos Wistar. *Arq Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2020; 72(3): 719-728.

30. SHAHID A e SAHER M. Repeated exposure of pyriproxyfen to pregnant female mice causes developmental abnormalities in prenatal pups. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020; 27(21): 26998-27009.
31. SCHMIDT HR, et al. Quaternary and tertiary aldoxime antidotes for organophosphate exposure in a zebrafish model system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015; 284(2): 197-203.
32. SPIRHZANOVA P, et al. The pyriproxyfen metabolite 4'OH-pyriproxyfen disrupts thyroid hormone signaling and enhances Musashi-1 levels in neuro progenitor. *bioRxiv*, 2018; 352088.
33. TRUONG L, et al. Assessment of the developmental and neurotoxicity of the mosquito control larvicide, pyriproxyfen, using embryonic zebrafish. *Environmental Pollution*, 2016; 1-5.
34. VAN DER LINDEN H, et al. Epilepsy and EEG Abnormalities in Congenital Zika Syndrome. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 2022; 39(4): 248-252.
35. VANI JM, et al. Pyriproxyfen does not cause microcephaly or malformations in a preclinical mammalian model. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020; 28(4): 4585-4593.
36. WEEKS ENI, et al. Novel effective mosquito larvicide DL-methionine: Lack of toxicity to non-target aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021; 213: 102013.