

# **Avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva de agrotóxicos**

*Guia nº 67/2023 – versão 2*



Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa

2024

# **Avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva de agrotóxicos**

**VIGENTE A PARTIR DE 23/12/2024**

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pelos marcos legislativo e regulatório da Agência.<sup>1</sup>

Trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições aqui dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto. A inobservância ao conteúdo deste documento não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação.

<sup>1</sup>[Portaria nº 162, de 12 de março de 2021](#), que dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

## SUMÁRIO

1.	ESCOPO.....	5
2.	INTRODUÇÃO.....	5
3.	BASE LEGAL.....	12
4.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE AGROTÓXICOS POR AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS .....	15
4.1.	Agência de Proteção Ambiental Americana ( <i>United States Environmental Protection Agency – USEPA</i> ).....	15
4.2.	Autoridade Europeia para Segurança Alimentar ( <i>European Food Safety Authority – EFSA</i> ).....	16
5.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE AGROTÓXICOS PELA ANVISA .....	16
5.1.	Análise do peso da evidência (WoE) .....	17
5.2.	Modo de ação (MoA) .....	20
5.3.	Via de efeito adverso (AOP) .....	21
6.	USO DE AVALIAÇÕES DE AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS COMO PARTE DA AVALIAÇÃO DO PESO DA EVIDÊNCIA .....	24
7.	CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: AVALIAÇÃO DE ESTUDOS EM HUMANOS .....	24
8.	CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: ABORDAGENS ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS .....	35
8.1	Bateria de testes <i>in vitro</i> de neurotoxicidade para o desenvolvimento – OECD 377 .....	37
9.	CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: AVALIAÇÃO DE ESTUDOS EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	38
9.1.	ESTUDOS DE TRIAGEM EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS (OECD 421 E 422) .....	41
9.1.1.	Estudo de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento – Diretriz OECD 421 .....	41
9.1.2.	Estudo combinado de toxicidade de dose repetida e triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento – Diretriz OECD 422 .....	45
9.2.	ESTUDOS DE UMA GERAÇÃO ESTENDIDA OU DE DUAS GERAÇÕES .....	48
9.2.1.	Estudo de toxicidade reprodutiva de duas gerações - Diretriz OECD 416 .....	49
9.2.2.	Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida – Diretriz OECD 443 .....	54
9.2.3.	Interpretação geral dos dados obtidos nos estudos multigeracionais (Diretrizes OECD 416 e 443) .....	62
9.2.3.1.	Efeitos adversos na reprodução/ fertilidade .....	63
9.2.3.2.	Efeitos adversos no desenvolvimento intrauterino .....	63
9.3.	ESTUDOS QUE AVALIAM A TOXICIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO .....	64
9.3.1.	Estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal – Diretriz OECD 414 .....	64
9.3.2.	Estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento (DNT) – Diretriz OECD 426 ou USEPA 870.6300 .....	69
10.	CARACTERIZAÇÃO DE PERIGO: ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS.....	76

<b>10.1. EFEITOS SOBRE FERTILIDADE E REPRODUÇÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>10.1.1. Desfechos mediados pelo par.....</b>	<b>77</b>
<b>10.1.2. Desfechos específicos para o sexo masculino.....</b>	<b>82</b>
<b>10.1.3. Desfechos específicos para o sexo feminino .....</b>	<b>85</b>
<b>10.1.4. Influência da toxicidade sistêmica/parental na interpretação do estudo.....</b>	<b>89</b>
<b>10.1.5. Classificação quanto ao nível de preocupação dos efeitos adversos sobre fertilidade e reprodução .....</b>	<b>89</b>
<b>10.2. EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PROLE.....</b>	<b>90</b>
<b>10.2.1. Fatores prévios a serem considerados na interpretação geral dos dados de toxicidade para o desenvolvimento .....</b>	<b>90</b>
<b>10.2.2. Influência da toxicidade materna na interpretação do estudo.....</b>	<b>94</b>
<b>10.2.3. Detalhamento dos desfechos de toxicidade no desenvolvimento .....</b>	<b>97</b>
<b>10.2.3.1. Alteração na sobrevivência e no crescimento .....</b>	<b>99</b>
<b>10.2.3.2. Alteração no desenvolvimento morfológico .....</b>	<b>99</b>
<b>10.2.3.3. Verificação de déficits funcionais .....</b>	<b>102</b>
<b>10.2.4. Classificação quanto ao nível de preocupação dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento.....</b>	<b>103</b>
<b>10.3. EFEITOS NA LACTAÇÃO OU NA VIA DE LACTAÇÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>10.4. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA NA CARACTERIZAÇÃO DO PERIGO ..</b>	<b>105</b>
<b>10.5. ABORDAGEM ESTRUTURADA PARA A AVALIAÇÃO DE ESTUDOS E CLASSIFICAÇÃO QUANTO À TOXICIDADE REPRODUTIVA .....</b>	<b>106</b>
<b>10.5.1. Atribuição de nível de preocupação às evidências obtidas em cada estudo .....</b>	<b>107</b>
<b>10.5.2. Caracterização da base de dados e classificação do perigo .....</b>	<b>108</b>
<b>11. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
<b>12. LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....</b>	<b>115</b>
<b>13. GLOSSÁRIO .....</b>	<b>117</b>
<b>14. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>128</b>

## **1. ESCOPO**

Este guia fornece orientações sobre a avaliação conduzida pela Anvisa acerca da toxicidade reprodutiva dos ingredientes ativos de agrotóxicos e seus produtos técnicos. O objetivo deste guia é indicar os princípios fundamentais dessa avaliação, bem como detalhar o protocolo experimental dos estudos relevantes e a abordagem adequada para análise e interpretação dos dados relativos aos desfechos reprodutivos e para o desenvolvimento.

Dessa forma, a Anvisa dá transparência quanto aos parâmetros importantes na apresentação desses estudos, quais sejam: qualidade da descrição do estudo, desenho experimental (como exemplo, para estudos *in vivo*: número de animais, doses, controle negativo e positivo, avaliação cega, período de exposição e acasalamento, desfechos avaliados), uso de dados fornecidos por abordagens não-animais e adequada análise e interpretação dos resultados. Adicionalmente, é exposta a abordagem que será utilizada pela Anvisa da análise baseada no peso da evidência (WoE - sigla do inglês para *Weight of Evidence*), em alinhamento a diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão.

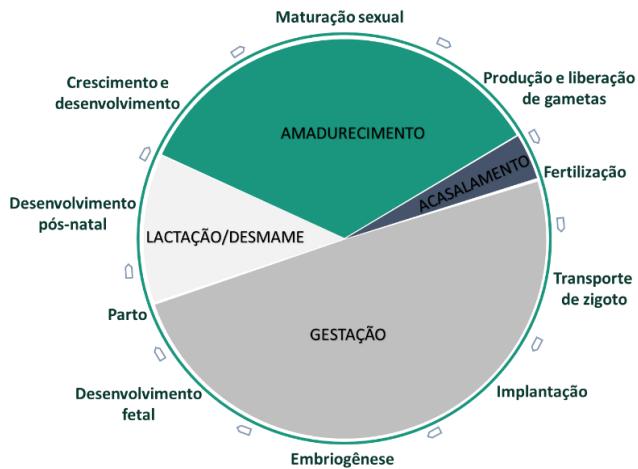
Na reanálise de ingredientes ativos de agrotóxicos, são considerados os dados e evidências disponíveis, não sendo mandatária a observação de outros dados como pré-requisito para a tomada de decisão regulatória. Embora este guia busque detalhar a avaliação e uso da maior parte das evidências que podem estar disponíveis, considera-se que a tomada da decisão regulatória independe da disponibilização de mais dados, sendo possível alcançá-la com a informação disponível no momento da avaliação. Para produtos técnicos novos, a avaliação toxicológica será realizada com base no WoE, conforme legislações vigentes.

É importante ressaltar que as orientações fornecidas no referido guia se limitam às etapas necessárias para identificação e caracterização do perigo, não abrangendo as demais etapas de avaliação do risco para os seres humanos.

Dado que a toxicidade reprodutiva pode estar associada a distúrbios endócrinos, sugere-se consultar o guia específico de avaliação do potencial de desregulação endócrina de agrotóxicos.

## **2. INTRODUÇÃO**

A reprodução é um processo cíclico que pode ser dividido, de modo geral, em quatro fases, as quais englobam as várias etapas do desenvolvimento pré e pós-natal, o amadurecimento e o acasalamento (Figura 1). Cada uma dessas fases pode ser afetada negativamente pela exposição a substâncias químicas, incluindo os agrotóxicos. Esse processo pode culminar em um dano à reprodução e/ou ao desenvolvimento em humanos e, portanto, seu potencial de ocorrência precisa ser avaliado (ECETOC, 2002).



**Figura 1.** Ciclo reprodutivo  
Adaptada de ECETOC (2002).

Os estudos de toxicidade reprodutiva (TR) constituem uma parte importante da avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos. Esse termo engloba múltiplos desfechos, os quais podem ser divididos em dois subgrupos:

- I. Efeitos adversos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina (fertilidade). Isso inclui alterações no (a): maturação sexual, ciclo estral, libido e comportamento sexual, espermatogênese ou ovogênese; atividade hormonal ou resposta fisiológica com potencial interferência na capacidade de fertilizar, na fertilização propriamente dita ou no desenvolvimento do óvulo fertilizado – incluindo a implantação; parto e outras funções dependentes da integridade dos sistemas reprodutivos (por exemplo, lactação) (OECD, 2008).
- II. Efeitos adversos não hereditários sobre a progênie (toxicidade no desenvolvimento). Isso inclui qualquer efeito no desenvolvimento pré e/ou pós-natal do conceito, resultante da exposição parental previamente à concepção ou da exposição da prole durante o desenvolvimento pré ou pós-natal até o período de maturação sexual. Esses efeitos podem se manifestar em qualquer ponto da vida do animal estudado e incluem, de modo geral: aborto/morte, malformações morfológicas (efeitos teratogênicos), distúrbios funcionais (efeitos reprodutivos, hormonais, neurológicos, imunológicos), crescimento e amadurecimento (OECD, 2008).

Além desses, há ainda os efeitos sobre ou mediados pela lactação, os quais são avaliados separadamente com a finalidade de se indicar frases de alerta específicas para mães lactantes. A TR induzida por meio da lactação pode ocorrer das seguintes formas: 1) exposição do recém-nascido pelo aleitamento devido à excreção do composto no leite; 2) comprometimento da qualidade e quantidade do leite, decorrente da exposição materna ao composto, resultando em efeitos nutricionais no recém-

nascido. Três fatores devem ser considerados na avaliação de perigo a partir de efeitos na lactação (ECHA, 2017):

- Concentração da substância excretada no leite. Deve-se considerar parâmetros toxicocinéticos e propriedades físico-químicas do composto, bem como a fase e a duração da exposição.
- Maior sensibilidade do recém-nascido em comparação ao adulto. Isso decorre tanto do fato de o composto afetar eventos específicos do desenvolvimento, quanto de uma ingestão possivelmente maior da substância por quilograma de peso corporal e da imaturidade das vias de desintoxicação e barreiras fisiológicas. Além disso, alguns efeitos podem se tornar perceptíveis apenas em fases mais tardias da vida.
- Efeitos na qualidade e/ou quantidade do leite, que podem ser detectados com a análise do impacto no crescimento/desenvolvimento do recém-nascido. Além disso, o efeito principal pode ser verificado em alterações na anatomia e histologia da glândula mamária, investigadas por meio de exame histológico.

Uma vez que a TR pode resultar de exposições a doses únicas ou repetidas da substância teste (ST), e que ambos são cenários possíveis para a exposição humana, os protocolos dos estudos que avaliam os desfechos relacionados à TR devem considerar essas duas situações. De modo geral, os objetivos dessa categoria de estudos é estabelecer (ECHA, 2017):

- Se a exposição de seres humanos à ST está associada a efeitos adversos na função ou capacidade reprodutiva; e/ou
- Se, em estudos em animais, a administração da ST a machos e/ou fêmeas antes da concepção e durante a gestação e lactação, causa efeitos adversos na função ou capacidade reprodutiva; e/ou
- Se, em estudos em animais, a administração da ST durante o período de desenvolvimento pré ou pós-natal induz efeitos adversos não hereditários na progênie;
- Se a fêmea prenhe é potencialmente mais suscetível à toxicidade geral;
- A relação dose-resposta para quaisquer efeitos adversos na reprodução/desenvolvimento.

Assim, os estudos de TR devem ser capazes de identificar efeitos adversos relativos aos marcos e desfechos associados às diferentes fases do ciclo reprodutivo, apresentados no Quadro 1 (ECETOC, 2002).

**Quadro 1.** Marcos e desfechos relevantes em cada fase do ciclo reprodutivo.

FASE	MARCOS E DESFECHOS
<b>Maturação sexual</b>	Libido Comportamento sexual e acasalamento Função endócrina (hormônio luteinizante – LH, hormônio folículo estimulante – FSH, testosterona, estrogênio, prolactina, TSH, T <sub>4</sub> ).
<b>Produção e liberação de gametas</b>	Sexo masculino (espermatozogênese) – Produção de gametas pós-natal. Sexo feminino (ovogênese) – Início durante o desenvolvimento intrauterino, com produção do ovócito I; interrupção em meiose I antes do nascimento; continuação na puberdade, com maturação em ovócito II antes da ovulação.
<b>Fertilização e desenvolvimento embrionário precoce (pré-implantação)</b>	Intervalo entre a fecundação do ovócito II e a implantação do conceito no útero. Clivagem do zigoto até a formação da mórula.
<b>Transporte do zigoto</b>	Migração do oviduto ao útero: Zigoto → Mórula → Blastocisto
<b>Implantação</b>	Implantação do blastocisto no útero Perfil hormonal materno (progesterona, estrogênio) Desenvolvimento placentário Sobrevivência dos implantes
<b>Embriogênese</b>	Sobrevivência do embrião Crescimento e diferenciação Desenvolvimento de órgãos
<b>Desenvolvimento fetal</b>	Sobrevivência do feto Crescimento e diferenciação Funcionamento dos órgãos
<b>Parto</b>	Comportamento materno Duração do parto, distocia Capacidade de amamentar
<b>Desenvolvimento pós-natal (pré e pós-desmame)</b>	Sobrevivência da prole Peso ao nascer, crescimento Funcionamento dos órgãos Função hormonal e imunológica Funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC) e do Sistema Nervoso Periférico (SNP) Distância anogenital (DAG) Desenvolvimento sexual masculino e feminino (normalidade da genitália externa, abertura vaginal, citologia do esfregaço vaginal, descida dos testículos, descolamento do prepúcio e produção espermática)

Vale ressaltar a importância de, sempre que possível, distinguir entre um efeito específico na reprodução ou no desenvolvimento da prole como consequência de uma propriedade intrínseca da ST; e um efeito adverso que é uma consequência secundária da toxicidade sistêmica/materna (ingestão reduzida de alimentos ou água e consequente perda de peso, estresse e falta de cuidado materno, deficiências alimentares específicas, entre outros). Por essa razão, a natureza, gravidade e relação dose-resposta de todos os efeitos observados em progêneres e animais parentais devem ser considerados e analisados em conjunto, no mesmo estudo (ECHA, 2017).

É importante destacar que uma série de dados – tanto informações gerais da ST quanto dados provenientes de diferentes estudos experimentais, conduzidos em animais, *in vitro* ou em espécies

alternativas e em humanos – são relevantes na avaliação desses efeitos por meio da abordagem de peso da evidência. Com relação às informações gerais, destacam-se as propriedades físico-químicas e os modelos de relação quantitativa estrutura/atividade (QSAR), os quais serão descritos a seguir (ECHA, 2017):

- Propriedades físico-químicas: avaliar a probabilidade e o grau de absorção após exposição por uma via específica; avaliar a biotransformação e distribuição, a fim de determinar se a ST ou um metabólito ativo é capaz de atravessar as barreiras placentária, hematoencefálica (BHE) e hematotesticular (BHT), bem como se há excreção pelo leite materno.
- Agrupamento químico ou modelos QSAR: Por meio da comparação entre compostos com semelhança estrutural, é possível estender o potencial de toxicidade de substâncias bem investigadas àquelas para as quais não há dados disponíveis ou estes são incompletos. Uma vez que as abordagens por sistemas QSAR ainda não estão bem validadas para TR, eles não são rotineiramente utilizados para a análise de produtos técnicos novos ou na reavaliação de agrotóxicos. Por outro lado, na avaliação de produtos técnicos equivalentes, resultados positivos em um modelo QSAR validado podem direcionar testes subsequentes mais apropriados para essa avaliação toxicológica; enquanto resultados negativos podem ser interpretados como a ausência de perigo para TR, quando há outras evidências capazes de reforçar isso.

Quanto aos estudos experimentais, o desenvolvimento de métodos alternativos para ensaios *in vivo* de TR, é especialmente desafiador, tendo em vista a complexidade do processo reprodutivo e o grande número de possíveis alvos/mecanismos associados. Desse modo, na análise vigente de TR associada aos agrotóxicos, não são adotadas oficialmente diretrizes de testes *in vitro* da OECD. Decorrente das limitações presentes nessa categoria de estudo – como a impossibilidade de refletir as etapas de biotransformação da ST que ocorriam *in vivo*, seu uso exclusivo – em alternativa aos estudos em animais – ainda não é recomendável. Eles são úteis quando combinados a outros estudos, em uma abordagem de avaliação sequencial por exemplo, para a triagem de compostos com estruturas químicas relacionadas e em investigações mecanicistas. Ou seja, na análise do WoE, os métodos alternativos podem dar suporte a decisões regulatórias (ECHA, 2017). A utilização de abordagens alternativas ao uso de animais é detalhada no item 8.

Com relação aos estudos *in vivo*, é possível a obtenção de dados relevantes a partir de estudos experimentais não específicos para os desfechos de TR – como o estudo de dose repetida, no qual, dentre outros efeitos, também se pode avaliar a fisiologia reprodutiva, possibilitando inclusive a definição de um valor de NOAEL ou LOAEL. No entanto, cabe destacar que a sensibilidade desse tipo de estudo na detecção de efeitos de TR é menor, quando comparado aos estudos delineados especificamente para essa finalidade. Isso decorre do menor número de animais por grupo e da possibilidade de ocorrência desses efeitos em doses inferiores àquelas administradas a animais

adultos, caso fossem avaliados durante o desenvolvimento de fetos e animais jovens (ECHA, 2017). Em uma abordagem de WoE, esses dados são úteis no direcionamento da investigação, indicando a necessidade de ampliar a análise para incluir neurotoxicidade e/ou imunotoxicidade do desenvolvimento. Assim, atualmente os estudos *in vivo* em animais experimentais específicos para a investigação de desfechos de reprodução ou sobre o desenvolvimento (estudos multigeracionais e de desenvolvimento pré e pós-natal) ainda recebem maior peso na avaliação do WoE e, por essa razão, serão amplamente discutidos nos itens posteriores desse guia. No entanto, eles devem ser avaliados juntamente com os demais dados, incluindo os que utilizam abordagens alternativas ao uso de animais, cada vez mais disponíveis.

Por fim, há ainda os dados provenientes de estudos epidemiológicos, os quais envolvem cenários reais de exposição e, portanto, dispensam a etapa de extração de doses, como necessário tratando-se de estudos em animais. A exposição humana pode ocorrer por meio de múltiplas vias (ingestão de alimentos e água, contato com a pele ou olhos, pelo ar e em ambientes internos e externos). Os estudos epidemiológicos investigam a relação entre exposição e efeitos adversos à saúde na população em geral e em subpopulações específicas (exposição ocupacional, por exemplo) e podem ser úteis na determinação do perigo, como também na comparação com dados obtidos em outros tipos de estudos (*in vitro* e *in vivo* em animais experimentais), possibilitando uma melhor avaliação da coerência e da plausibilidade biológica quando da análise do WoE (ECHA, 2017).

Além das informações específicas dos desfechos de TR, fornecidas pelas linhas de evidência supracitadas, dados de toxicocinética e toxicodinâmica (modo de ação – MoA) – especialmente relativos aos estágios mais críticos de desenvolvimento ou aos tecidos/órgãos reprodutivos de interesse – são bastante úteis não só na etapa de delineamento dos estudos, mas também na análise dos dados obtidos.

Os dados toxicocinéticos, principalmente referentes à biotransformação e à bioacumulação, podem auxiliar na seleção dos níveis de dose, levando-se em consideração as diferenças interespécie. Essa etapa é bastante relevante no delineamento dos estudos experimentais, pois é necessário garantir que os efeitos tóxicos observados não estejam associados à exposição a doses excessivas da ST, capazes de causar saturação dos mecanismos de absorção e desintoxicação (biotransformação e excreção). Os resultados provenientes de estudos conduzidos nessas circunstâncias apresentam frequentemente um valor limitado na definição do risco associado a exposições mais realistas, nas quais a ST pode ser facilmente biotransformada e eliminada do corpo (ECHA, 2017).

A partir de estudos de toxicocinética, também é possível o desenvolvimento de modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK), os quais levam em consideração alterações ocorridas durante a gestação em roedores, em primatas não humanos e em humanos; bem como a transferência lactacional e o perfil toxicocinético em crianças. Essa abordagem possibilita uma melhor extração de informações entre espécies, pois é capaz de adaptar as alterações anatômicas e fisiológicas ocorridas com o avanço da gestação em espécies diferentes (Hood, 2012).

Por sua vez, a avaliação conjunta de dados de toxicodinâmica na etapa de caracterização do perigo pode auxiliar bastante na interpretação dos resultados, conforme será discutido mais adiante no item 5.3, referente à via do efeito adverso (AOP). Os dados mecanísticos podem ser obtidos de uma variedade de estudos de curto prazo *in vitro* ou *in vivo*, como também de estudos comparativos em diferentes espécies. Nos últimos anos, um número crescente de estudos tem buscado investigar a base mecanicista associada aos efeitos de compostos desreguladores endócrinos, principalmente aqueles que atuam por meio da ativação de receptores de estrogênio ou androgênio e sobre a esteroidogênese e antagonismo do hormônio tireoidiano. Então, a maior disponibilidade de dados toxicocinéticos e mecanicistas possibilita uma avaliação mais exata deste efeito, por meio da incorporação desses dados em modelos de dose-resposta de base biológica, os quais consistem em modelos preditivos capazes de descrever processos biológicos no nível celular e molecular para vincular uma exposição externa a um efeito adverso apical (Hood, 2012).

O processo de análise e interpretação dos dados de TR requer um julgamento científico bem embasado, em decorrência não apenas da natureza intrínseca dos dados biológicos, mas também da possibilidade de lacuna de dados que aumentam as incertezas em uma avaliação de risco. Desse modo, deve-se adotar alguns pressupostos padrão (Quadro 2) quando da ocorrência de informações limitadas ou inexistentes sobre toxicocinética, modo de ação, relações dose-resposta em baixa dose e padrões de exposição humana. Alguns desses pressupostos se referem à extração de dados de toxicidade de animais para humanos, enquanto outras são específicas para TR (USEPA, 1996; Hood, 2012).

**Quadro 2.** Pressupostos padrão adotados na avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva.

Pressuposto para avaliação da toxicidade reprodutiva
I. À ST que causa efeito adverso na reprodução e/ou no desenvolvimento em estudos com animais experimentais se atribui um potencial de causar TR em humanos, após a ocorrência de exposição suficiente durante estágios críticos de reprodução e desenvolvimento.
II. Efeitos de xenobióticos nos processos reprodutivos masculino e feminino e/ou nos desfechos do desenvolvimento são, em geral, considerados preditivos de efeitos semelhantes entre as espécies, embora os desfechos observados em animais experimentais não sejam necessariamente os mesmos verificados em humanos.
III. Na indisponibilidade de dados (toxicocinética e toxicodinâmica, por exemplo) suficientes para se determinar a espécie mais relevante a ser utilizada nos estudos experimentais, deve-se optar pelas espécies mais sensíveis.
IV. Na ausência de evidências em contrário, presume-se que uma ST capaz de causar TR em um sexo também afeta adversamente a função reprodutiva/desenvolvimento no outro sexo.
V. Se houver disponibilidade de informações detalhadas acerca do modo de ação e da toxicocinética de uma ST, estas devem ser utilizadas na predição do formato da curva dose-resposta em doses baixas. Na ausência de tais dados, geralmente se presume a ocorrência de um limiar (cinética não linear) para a curva dose-resposta de uma ST associada à TR.

Então, a partir da análise integrada de toda a base de dados disponível – por meio da abordagem do WoE – e efetuada a classificação quanto ao perigo de TR, deve-se seguir para as etapas de avaliação dose-resposta e da exposição, para posterior caracterização do risco. O detalhamento dos estudos mais relevantes, a abordagem estruturada para analisar e interpretar o conjunto de dados disponíveis, a definição de pontos de partida (PoDs) adequados para a obtenção das doses de referência e a classificação quanto ao perigo serão aprofundados em itens posteriores do presente guia, a fim de embasar uma conclusão quanto ao potencial de TR associada a determinada ST.

### **3. BASE LEGAL**

O arcabouço legal que embasa as considerações aqui apresentadas são: a Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023; a RDC nº 294, de 29 de julho de 2019; a RDC nº 296, de 29 de julho de 2019; e a RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

A Lei nº 14.785, de 2023 revogou a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Entre as alterações legais destaca-se a proibição do registro de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental e afins que apresentem risco inaceitável para os seres humanos ou para o meio ambiente, por permanecerem inseguros, mesmo com a implementação das medidas de gestão de risco. Adicionalmente, o termo reavaliação é substituído por reanálise em adequação ao disposto na nova Lei.

A RDC nº 294, de 29 de julho de 2019, em seu Art. 29, estabelece como consequências da TR os danos ao aparelho reprodutor, alterações na função reprodutiva, os efeitos teratogênicos e neonatais e os efeitos sobre a lactação ou decorrentes da lactação. Os artigos 30 e 31 desse mesmo dispositivo legal detalham as condições nas quais os produtos são associados a cada uma dessas categorias de efeitos adversos (toxicidade à fisiologia reprodutiva e ao desenvolvimento), conforme trechos abaixo destacados:

Art. 30. É considerado que um produto provoca danos ao aparelho reprodutor quando causar efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva de seres humanos ou quando houver evidências suficientes em estudos com animais, a partir das quais se presume que tal produto causa efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva de seres humanos.

Art. 31. Considera-se que um produto provoca efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal quando houver evidências em seres humanos ou quando houver evidências em estudos com animais, a partir das quais se presume que tal produto causa efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal de seres humanos.

§1º Um produto é considerado teratogênico quando causar alteração estrutural permanente ou deficiência funcional que impactam na sobrevida ou qualidade

de vida, resultantes da exposição durante o período de desenvolvimento embrionário.

§2º Os efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal que ocorrerem na presença de toxicidade materna serão considerados evidência da ação direta do produto no organismo em desenvolvimento, a menos que possa ser demonstrado que o efeito adverso no conceito ou neonato é considerado secundário à toxicidade materna.

Aqui, cabe esclarecer que os efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva, sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal e sobre a lactação são analisados separadamente e que o item 6.3 da Seção 6 no Anexo IV estabelece que eles serão considerados de forma independente para fins de comunicação do perigo.

Essa resolução detalha ainda, no item 11 da seção 2 no Anexo I, os estudos a serem apresentados nas análises de produto técnico; e, na seção 6 do Anexo IV, estabelece a classificação toxicológica dos ingredientes ativos de agrotóxicos, em função da TR, nas categorias 1A, 1B ou 2. Essa classificação está detalhada no Quadro 3 desse guia e é feita de acordo com a avaliação baseada no WoE. Os produtos que não se enquadram nas categorias 1A, 1B ou 2 não são classificados quanto à TR. Adicionalmente, a RDC nº 296, de 29 de julho de 2019, em seu Anexo IV, estabelece os dados de rotulagem de acordo com a TR, conforme detalhado no Quadro 4.

**Quadro 3.** Classificação toxicológica em função da toxicidade reprodutiva.

CATEGORIAS	CRITÉRIOS
<b>Categoria 1A</b> <b>Produto conhecido por apresentar toxicidade reprodutiva para seres humanos.</b>	Essa classificação é baseada em evidência em seres humanos de que o produto causa efeito adverso: a. na fisiologia reprodutiva; ou b. sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal.

**Quadro 3.** Classificação toxicológica em função da toxicidade reprodutiva.

<b>Categoria 1B</b> <b>Produto que presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva para seres humanos.</b>	<p>Essa classificação é baseada em:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. evidência suficiente em animais experimentais de que o produto causa efeito adverso:           <ul style="list-style-type: none"> <li>1. na fisiologia reprodutiva de seres humanos; ou</li> <li>2. sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal de seres humanos; ou</li> </ul> </li> <li>b. evidência limitada em seres humanos, complementada com evidência suficiente em estudos com animais experimentais de que o produto causa efeito adverso:           <ul style="list-style-type: none"> <li>i. na fisiologia reprodutiva de seres humanos; ou</li> <li>ii. sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal de seres humanos.</li> </ul> </li> </ul> <p>Os dados devem fornecer evidência clara de efeito adverso, na ausência de outros efeitos tóxicos na fisiologia reprodutiva ou sobre desenvolvimento embriofetal ou neonatal. Caso ocorram em conjunto com outros efeitos tóxicos, os efeitos adversos não devem ser considerados como consequência secundária não específica dos outros efeitos.</p>
<b>Categoria 2</b> <b>Produto suspeito de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos.</b>	<p>Essa classificação é baseada em evidência limitada, para classificar os produtos na Categoria 1, de que o produto causa efeito adverso:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. na fisiologia reprodutiva em seres humanos ou em animais experimentais; ou</li> <li>b. sobre o desenvolvimento embriofetal ou neonatal em seres humanos ou em animais experimentais.</li> </ul> <p>Os dados devem fornecer evidência de efeito adverso, na ausência de outros efeitos tóxicos na fisiologia reprodutiva ou sobre desenvolvimento embriofetal ou neonatal. Caso ocorram em conjunto com outros efeitos tóxicos, os efeitos adversos não devem ser considerados como consequência secundária não específica dos outros efeitos.</p>
<b>Categoria adicional para efeitos na lactação ou na via de lactação.</b> <b>Produto suspeito de causar efeito adverso na lactação ou na via de lactação.</b>	<p>Essa classificação é baseada em:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. evidência em seres humanos indicando perigo aos lactentes durante o período de lactação; ou</li> <li>b. evidência clara de efeito adverso nos descendentes a partir dos resultados dos estudos de uma ou duas gerações devido à transferência de substância através do leite materno ou aos efeitos adversos sobre a qualidade do leite materno; ou</li> <li>c. estudos de toxicocinética que indiquem a possibilidade de o ingrediente ativo, os componentes, as impurezas ou os metabólitos estarem presentes em níveis potencialmente tóxicos no leite materno.</li> </ul>

**Quadro 4.** Classificação e dados de rotulagem em função da toxicidade reprodutiva.

CLASSIFICAÇÃO		ROTULAGEM		
Categoria	Pictograma GHS	Palavra de advertência	Frase de Perigo	

<b>Categorias 1A e 1B</b>		Perigo	Pode prejudicar a fertilidade ou o feto (indicar o efeito específico, se conhecido) se ... (indicar a via de exposição, se for conclusivamente comprovado que nenhuma outra via de exposição provoca o dano).
<b>Categoria 2</b>		Atenção	Suspeita-se que prejudique a fertilidade ou o feto (indicar o efeito específico, se conhecido) se ... (indicar a via de exposição, se for conclusivamente comprovado que nenhuma outra via de exposição provoca o dano).
<b>Categoria adicional para efeitos na lactação ou na via de lactação.</b>	Sem pictograma	Sem palavra de advertência	Pode ser nocivo às crianças alimentadas com leite materno.

#### **4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE AGROTÓXICOS POR AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS**

##### **4.1. Agência de Proteção Ambiental Americana (*United States Environmental Protection Agency – USEPA*)**

Na análise de TR conduzida pela agência reguladora americana (USEPA), adota-se uma abordagem para julgar e categorizar todas as evidências disponíveis – provenientes de múltiplas linhas de evidências (in vitro, in vivo, in silico) e indicativas ou não de potencial toxicidade. Nesse processo, são priorizados os estudos em humanos, se disponíveis, e os estudos em animais experimentais destinados à investigação dos desfechos específicos de TR. Após análise da qualidade geral dos dados, as evidências são enquadradas em duas categorias amplas: "Suficiente" e "Insuficiente", com base nos seguintes parâmetros: poder dos estudos (por exemplo, tamanho da amostra e variabilidade dos dados); número e tipos de desfechos avaliados, bem como a replicação dos efeitos encontrados; relevância da via e do período de exposição, tanto para humanos quanto para animais experimentais; e adequabilidade das espécies e dos níveis de dose selecionados para os estudos em animais. Além disso, também são considerados dados de farmacocinética, de relação estrutura-atividade, de outros estudos de toxicidade, bem como outros fatores que podem afetar a decisão geral sobre a evidência (USEPA, 1996, 2016).

A fim de organizar e integrar dados provenientes de diferentes fontes, a USEPA utiliza a abordagem de peso da evidência (WoE) para considerar a qualidade, consistência, relevância, coerência e plausibilidade biológica, por meio da utilização dos critérios de Bradford Hill modificados.

A partir do conjunto de dados obtidos, a USEPA define as doses de referência a serem utilizadas na etapa posterior de avaliação do risco, para os diferentes cenários de exposição (USEPA, 1996, 2016).

#### **4.2. Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority – EFSA*)**

Em sua avaliação de perigo quanto à TR, a agência europeia também utiliza todas as evidências disponíveis, indicativas ou não de potencial toxicidade, por meio da abordagem de WoE. Para tanto, a qualidade e a consistência dos estudos devem utilizados para conferir peso às evidências, de forma que resultados positivos e negativos sejam avaliados conjuntamente para uma conclusão final. Essa avaliação segue as diretrizes do Guia para Aplicação dos Critérios de Classificação, Rotulagem e Embalagem de Substâncias Químicas e Misturas (Guia CLP) elaborado pela Agência Europeia de Químicos – ECHA (ECHA, 2017). Assim como na análise da USEPA, também são priorizados os estudos em humanos, se disponíveis, e os estudos em animais experimentais destinados à investigação dos desfechos específicos de TR. As demais categorias de estudo – *in vitro*, estudos mecanísticos, de toxicocinética, dentre outros – são utilizadas como complementação para melhor interpretação dos dados e direcionamento de estudos adicionais. A recomendação dos estudos de TR em animais experimentais inclui aqueles recomendados pela OECD – estudos de triagem, multigeracionais e de toxicidade no desenvolvimento, conforme será detalhado no item específico desse guia.

Com relação à classificação do perigo das substâncias quanto à TR, a União Europeia adotou, na normativa EC nº 1107/2009, a classificação do GHS (EU, 2019). Assim, a Europa possui as mesmas categorias de classificação do Brasil, descritas no item 3 desse Guia: Categoria 1A – Produto conhecido por apresentar toxicidade reprodutiva para seres humanos; Categoria 1B – Produto que presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva para seres humanos; e Categoria 2 – Produto suspeito de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos. Adicionalmente, também há a categoria para enquadrar compostos com efeitos na lactação ou na via de lactação.

É importante mencionar que a EFSA, ao contrário da USEPA, não realiza a avaliação de risco para agrotóxicos que apresentem TR classificada nas categorias 1A e 1B, consideradas proibitivas de registro, segundo a normativa da União Europeia EC nº 1107/2009 (EU, 2009). Ou seja, nesses casos a EFSA conclui a sua análise sobre toxicidade reprodutiva na etapa de identificação do perigo e não avança para a etapa de avaliação dose-resposta para derivação de doses especificamente para esse desfecho toxicológico.

### **5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE AGROTÓXICOS PELA ANVISA**

Na identificação e caracterização de perigo relacionado à exposição a agrotóxicos, em geral, dispõe-se de uma base de dados bastante heterogênea e, portanto, de difícil comparação. Isso decorre

de uma variabilidade quanto à validade e à precisão de estudos, quanto às linhas de evidências disponíveis (estudos observacionais em humanos, estudos em animais experimentais, dados *in vitro* e de modelos computacionais); e quanto ao delineamento dos estudos em si (espécies, modelos, desfechos avaliados, vias de exposição, regime de doses). Então, a fim de se alcançar uma interpretação conjunta das evidências obtidas em um mesmo estudo e entre diferentes estudos, faz-se necessária a utilização de um processo estruturado para a integração de evidências – a análise do peso de evidência (WoE) (EFSA, 2017).

### **5.1. Análise do peso da evidência (WoE)**

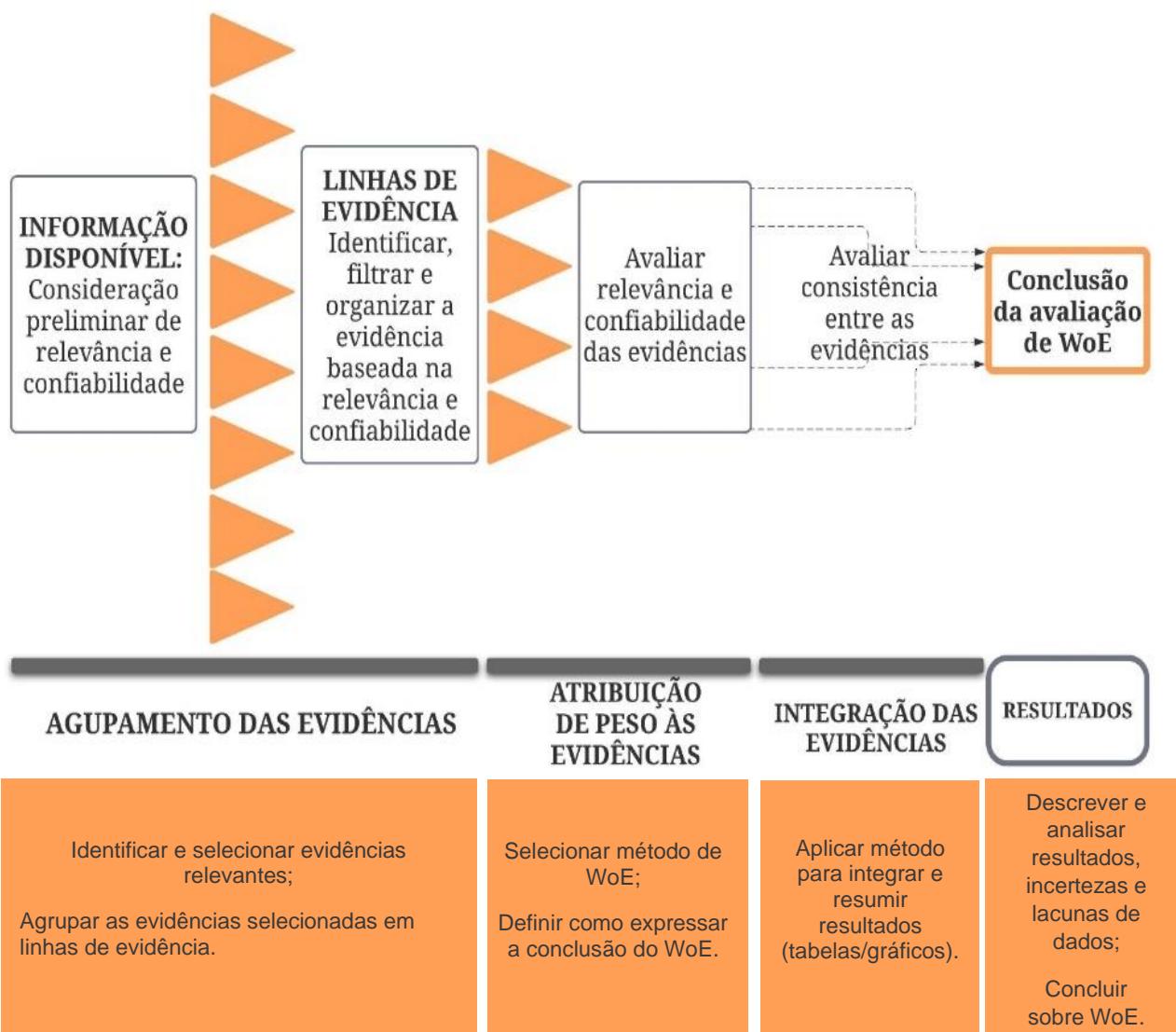
A abordagem de WoE, utilizada pela Anvisa para a avaliação do potencial de TR de agrotóxicos, segue o mesmo racional adotado pelas agências americana e europeia. Nesse tipo de abordagem, é dado peso apropriado à qualidade e à consistência dos dados, e estudos menos robustos são complementados com várias fontes de informação independentes e confiáveis para alcançar uma conclusão. A RDC nº 294/2019 define peso da evidência como a “interpretação dos dados toxicológicos no contexto de todas as informações disponíveis em que são avaliadas a força e a qualidade das evidências relacionadas a uma decisão;” e a força da evidência é definida como o “grau de confiabilidade sobre o resultado de um determinado experimento com base em seu nível de significância estatística e/ou biológica e em seu delineamento experimental”.

Esse processo ocorre em três etapas, quais sejam: 1) agrupamento de evidências em linhas de evidência de tipo semelhante; 2) atribuição de peso às evidências; e 3) integração das evidências. Além disso, ele se embasa em três considerações fundamentais – confiabilidade, relevância e adequabilidade dos dados disponíveis – a fim de concluir se essas evidências combinadas são suficientes para responder a uma dada questão. Confiabilidade consiste no quanto corretas são as informações que compõem uma linha de evidência e inclui os critérios de exatidão (grau de erro sistemático ou viés) e precisão (grau de erro aleatório). Relevância é a contribuição fornecida por determinada linha de evidência para responder a uma pergunta específica, considerando que as informações compreendidas nessas evidências são totalmente confiáveis. Isso abrange a relevância biológica, como também a relevância em relação a outras considerações, por exemplo temporal, espacial, química, dentre outros. Consistência se refere ao grau de compatibilidade entre as contribuições de diferentes linhas de evidência para responder à pergunta especificada (EFSA, 2017).

A Figura 2 ilustra como esses três conceitos estão relacionados entre si, como também com as três etapas básicas da avaliação do WoE e com a sua conclusão. É importante destacar que a relevância e a confiabilidade podem ser consideradas na primeira e na segunda etapas. Primeiramente, a relevância é considerada na identificação das evidências; e tanto relevância quanto confiabilidade podem ser consideradas na seleção das evidências identificadas que devem ser incluídas na avaliação. No entanto, as evidências selecionadas irão variar quanto a esses dois

parâmetros e isso será considerado na segunda etapa, na atribuição de peso às evidências (EFSA, 2017).

Em sua avaliação do WoE, a ANVISA considera os dados provenientes de todos os estudos regulatórios disponíveis, como também da literatura científica (no processo de reavaliação). Cada um deles é avaliado quanto aos seguintes parâmetros: força (magnitude) e especificidade da associação observada; consistência (reprodutibilidade dos achados); concordância e relação exposição-efeito; temporalidade (exposição deve ser anterior ao efeito observado); plausibilidade biológica e coerência (verificação de exposição-efeito em diferentes tipos de evidências – *in vitro*, *in vivo* em animais e em humanos); seleção de eventos-chave ou parâmetros mensuráveis, quando o mecanismo de ação ou a via do efeito adverso (MoA/AOP) é conhecido.



**Figura 2.** Relação de relevância (incluindo relevância biológica), confiabilidade e consistência com as três etapas básicas da avaliação do WoE e com a conclusão sobre identificação e caracterização de perigo de TR (Adaptado de EFSA, 2017).

Aos dados provenientes de estudos não-regulatórios pode-se atribuir grande peso de evidência quando as seguintes condições forem atendidas (ECHA, 2017):

- Adequabilidade para fins de classificação e/ou avaliação de risco;
- Análise adequada e confiável dos principais parâmetros previstos para serem investigados nas diretrizes correspondentes;
- Período de exposição à ST de duração compatível ou mais prolongada do que aquela prevista na metodologia da diretriz correspondente;
- Apresentação de relatório de estudo adequado e confiável.

Nas demais situações, estudos não-regulatórios podem contribuir para a análise geral do peso da evidência, mas é inadequada a sua utilização como único embasamento para se concluir quanto ao potencial de TR de determinada ST. Na avaliação de WoE, o conjunto de informações existentes é considerado suficiente quando é possível: 1) Identificar o(s) efeito(s) crítico(s) e o(s) órgão(s) e tecido(s) alvo(s); 2) Estabelecer a(s) relação(s) dose-resposta(s) e NOAEL(s) e/ou LOAEL(s) para o(s) efeito(s) crítico(s); 3) Avaliar a relevância dessas evidências para os seres humanos (ECHA, 2017). No item referente à análise e interpretação dos resultados, esse tópico será aprofundado ao ser discutida a abordagem para caracterização da base de dados disponível.

Na determinação do potencial de TR, será conferido maior peso aos estudos que descrevem efeitos adversos significativos referentes ao comportamento sexual, fertilidade ou desenvolvimento, bem como a outros parâmetros diretamente relacionados à função reprodutiva – ciclo menstrual (estral), parâmetros espermáticos, peso e análise histopatológica de órgãos reprodutivos e dosagem hormonal e bioquímica. Assim, os dados provenientes da análise de todos esses desfechos serão considerados coletivamente na determinação das doses de referência a serem utilizadas na etapa de AR. Isso significa que, ainda que individualmente alguns estudos possam apresentar deficiências – carência de detalhamento dos relatórios, grupos de análise pequenos, abrangência limitada de desfechos avaliados, níveis de dose ou regime de exposição inadequado – ao serem analisados em conjunto, em termos de reprodutibilidade e relevância dos resultados, podem embasar satisfatoriamente uma decisão regulatória.

Por outro lado, um menor peso será conferido aos dados provenientes de estudos *in vitro* ou *in vivo* quando conduzidos em outras espécies (que não sejam mamíferos); bem como dados de relação estrutura-atividade. Esses tipos de dados servem geralmente para fornecer informações mecanísticas, que são muitas vezes importantes na avaliação do peso da evidência para embasar a decisão

regulatória. Estudos *in vitro*, por exemplo, devem ser realizados sempre que possível em bateria, já que um único teste geralmente fornece informação limitada. Os resultados de uma combinação de testes aumentam o WoE (OECD, 2018).

Além disso, com o avanço do conhecimento sobre avaliação toxicológica, ensaios ou abordagens avaliativas alternativas para determinados desfechos, validadas, que se mostrem suficientemente robustas e sejam aceitas internacionalmente no contexto regulatório também podem fazer parte da avaliação substituindo a necessidade de evidências em animais ou humanos.

É importante mencionar que o WoE deve ter como base a análise dos dados disponíveis à época da avaliação e deve culminar na classificação dos agrotóxicos quanto à TR, conforme os critérios das categorias de classificação toxicológica da RDC nº 294/2019 (Quadro 3).

## 5.2. Modo de ação (MoA)

Define-se MoA como uma sequência de eventos-chave e processos, que se inicia a partir da interação de um composto com uma célula, o que ocasiona alterações anatômicas e funcionais e, por fim, resulta no efeito adverso para a reprodução ou desenvolvimento. Um evento-chave é uma etapa precursora observável, a qual pode ser um elemento necessário do MoA ou um marcador para esse elemento. O MoA difere do mecanismo de ação, pois este implica uma maior compreensão e detalhamento na descrição dos eventos, geralmente no nível molecular (USEPA, 2003). Assim, as informações mecânicas podem incluir dados bioquímicos, moleculares, celulares e/ou de sistemas de órgãos. Já o termo modo de ação com frequência é usado para se referir à identificação de etapas críticas associadas à ocorrência dos efeitos tóxicos e geralmente se refere a uma descrição menos detalhada do processo geral de TR (Hood, 2012).

O entendimento do MoA é capaz de esclarecer como a exposição a alguns compostos pode desencadear efeitos mais críticos em determinado subgrupo populacional ou em certas fases da vida (USEPA, 2003). Além disso, uma maior compreensão do MoA de determinada substância é muito útil para esclarecer possíveis efeitos equívocos na reprodução ou desenvolvimento, como também para obter uma melhor avaliação do grau em que os dados provenientes dos estudos experimentais representam um perigo para a saúde humana (Hood, 2012).

Estudos que investigam o MoA de determinada ST podem ser conduzidos para comprovar que os desfechos de TR observados ocorrem especificamente na espécie avaliada, ou seja, para descartar a relevância para humanos. O delineamento desse tipo de estudo, em geral, busca abordar questões específicas, ou efeitos de classe, sem necessariamente requerer a utilização de animais ou exposição por tempo prolongado (Hood, 2012).

Na ausência de informações sobre o MoA, serão adotados posicionamentos conservadores em relação à interpretação dos dados obtidos em animais, considerando que os testes disponíveis para

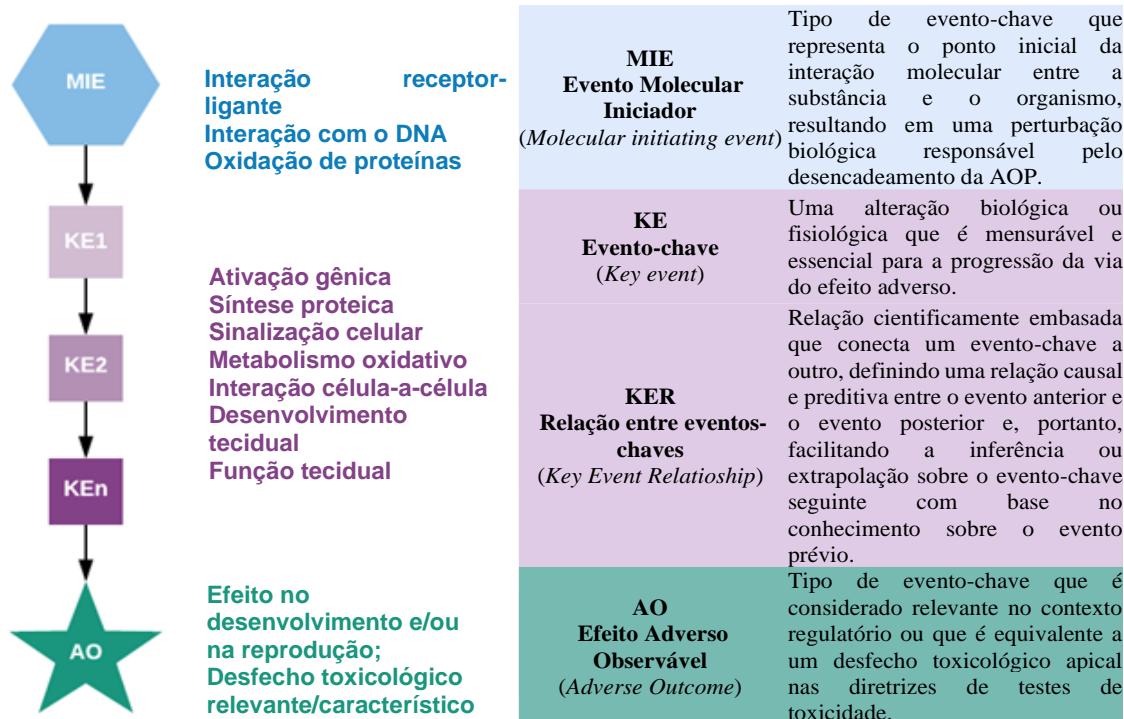
desfechos reprodutivos ainda possuem sensibilidade limitada, devido a questões como a existência de janelas críticas de sensibilidade (concepção, gestação, período neonatal, puberdade e adolescência), a severidade e irreversibilidade dos efeitos e possível existência de efeitos tardios (EC, 2017). Isto é, as evidências de TR serão consideradas relevantes para humanos e a ST será enquadrada na Categoria 1B.

### **5.3. Via de efeito adverso (AOP)**

A via de efeito adverso descreve uma sequência de eventos causalmente relacionados em diferentes níveis de organização biológica após a exposição a uma substância e que leva a um efeito adverso. Essa sequência de eventos se inicia com a interação da substância com uma biomolécula do organismo, causando uma perturbação biológica. Essa interação inicial é denominada Efeito Molecular Iniciador (MIE). O MIE pode progredir por meio de uma série de eventos-chaves (KE) intermediários, culminando em um efeito adverso observável (AO) relevante para a decisão regulatória. Espera-se a ocorrência das alterações biológicas mensuráveis na AOP quando a perturbação inicial é suficiente (potência, duração, frequência) para desencadear toda a via até o AO.

As AOPs não descrevem detalhadamente todo o processo biológico envolvido e sim as etapas críticas para que um efeito adverso seja desencadeado. As etapas críticas, ou seja, os KE correspondem a alterações biológicas mensuráveis e essenciais para a progressão de um MIE a um AO, indicando a relação causal da exposição à substância e a ocorrência da AOP (Figura 3). Logo, quando um evento-chave pode ser prevenido, não há ocorrência dos eventos-chaves posteriores e nem do AO. Embora o KE seja essencial, a ocorrência de um único evento chave não é suficiente para concluir que o AO ocorre, sendo necessária uma caracterização mais robusta das relações entre os diferentes KEs da AOP (OECD, 2018).

As AOPs podem ser utilizadas tanto para a tomada de decisão regulatória como também para identificar lacunas de dados, propor ensaios e facilitar extrapolações. A utilização de AOP no contexto regulatório é importante para o suporte do racional mecanístico da toxicidade das substâncias químicas, pois organiza de forma sistemática a informação toxicológica para embasar relações causais, previsíveis e, até mesmo, quantitativas entre uma perturbação decorrente da exposição a uma substância e a ocorrência de um efeito adverso relevante para a tomada de decisão regulatória. A AOP permite que dados mecanísticos possam ser usados para complementar e, até mesmo, substituir a identificação de desfechos toxicológicos apicais (em maior nível de organização biológica, que geralmente apenas são identificados em estudos de longa duração). Nesse contexto, o efeito adverso observável não precisa ser efetivamente uma doença, podendo corresponder a uma alteração biológica relevante (USEPA, 2017).



**Figura 3.** Representação da abordagem de AOP utilizada em contexto regulatório.

Quando existir informação suficiente disponível, a análise qualitativa da AOP também deve integrar a avaliação da plausibilidade biológica dos achados de estudos epidemiológicos, pois confere importante força à inferência sobre a causalidade da exposição (EFSA, 2017).

Outra vantagem das AOPs é que elas não são específicas para uma substância. Uma vez que a exposição à substância desencadeie o MIE, espera-se que toda a via ocorra, desde que haja tempo e concentração suficientes dessa substância para a progressão da via (USEPA, 2017). Essa é a principal diferença em relação ao MoA, que é específico para cada substância e não necessariamente envolve a caracterização de todos os eventos-chaves críticos, focando principalmente no efeito adverso específico da substância avaliada e em alguns eventos intermediários. A AOP deve ser utilizada, quando disponível, na análise do MoA de uma substância (USEPA, 2017).

As AOPs já caracterizadas e em fase de caracterização estão disponíveis na plataforma dinâmica AOP knowledgebase (AOP-KB, <http://aopkb.org>, <https://aopkb.oecd.org/> ou <https://aopwiki.org/>). Publicações de algumas AOPs também podem ser encontradas no domínio [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways\\_2415170x](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways_2415170x), mas é importante lembrar que as AOPs são dinâmicas e essas publicações podem estar desatualizadas.

Cabe ressaltar, que a AOP não substitui a entrega de documentos ou necessidade de dados adicionais para caracterização aprofundada dos efeitos toxicológicos, sendo sua utilização avaliada no contexto dos dados disponíveis e das evidências encontradas. Entretanto, ressalta-se que o padrão é assumir a relevância para

humanos dos efeitos toxicológicos observados, MoA e AOP na ausência de dados científicos que demonstrem a não relevância.

Com relação à toxicidade para a reprodução, os principais mecanismos associados incluem disfunções no eixo HHG, na maturação e funcionalidade dos sistemas reprodutivos masculino e feminino, e nas fases de gestação (fertilização, implantação, placentação e desenvolvimento de embrião a feto), parto e lactação. Os principais mecanismos envolvidos na toxicidade para o desenvolvimento causada pela exposição a um composto são: interferência mitótica (alteração na taxa de proliferação celular), alteração na fonte de energia, inibição enzimática (principalmente enzimas críticas para o crescimento e proliferação celular), mutação, alteração na expressão gênica e morte celular programada (Hood, 2012).

Em razão da complexidade do processo de desenvolvimento, ainda há muito a ser compreendido acerca dos eventos subjacentes à teratogenicidade. Um avanço nesse campo pode ser obtido por meio de investigações em vários níveis biológicos e construção de uma AOP, conforme disposto acima. O Quadro 5 lista esses níveis de investigações mecanísticas aplicáveis à toxicidade no desenvolvimento (Hood, 2012).

**Quadro 5.** Níveis de investigação mecanística para toxicidade no desenvolvimento.

NÍVEIS DE INVESTIGAÇÃO MECANÍSTICAS	DESCRÍÇÃO
<b>Eventos intracelulares</b>	Mecanismos de ação bioquímicos e moleculares definem os eventos-chave intracelulares para resposta de desenvolvimento normal e anormal.
<b>Eventos intercelulares</b>	Interações e atividades específicas célula a célula definem comportamentos de populações celulares especializadas.
<b>Eventos em nível de órgão</b>	Especialização nas funções dos órgãos define o seu desenvolvimento.
<b>Eventos em nível do organismo</b>	Respostas embrionárias e fetais são definidas pelas respostas conjuntas de órgãos e eventos intra e intercelulares.
<b>Respostas da ninhada</b>	A combinação de respostas embiofetais de uma ninhada são definidas dentro da unidade materna individual.

O reconhecimento desses níveis é crítico pela seguinte razão: se um mecanismo de ação for definido somente no nível celular, de modo isolado dos demais eventos que ocorrem em níveis superiores do organismo, é possível que, em análises posteriores feitas no nível fetal, ocorra o descarte dessas evidências mecanicistas, uma vez que as relações temporais ou dose-resposta podem não ser evidenciadas nesse nível mais alto de investigação. Por outro lado, se ambos os níveis forem avaliados em conjunto, as evidências iniciais poderão ser confirmadas e, assim, pode-se obter uma apreciação mais ampla da complexidade mecanicista envolvida. Deve-se considerar ainda que, provavelmente, um desfecho no desenvolvimento não decorre de um evento isolado, mas de uma cascata de eventos ativada em uma linha temporal ao longo do crescimento/amadurecimento do animal (Hood, 2012).

## **6. USO DE AVALIAÇÕES DE AUTORIDADES REGULATÓRIAS INTERNACIONAIS COMO PARTE DA AVALIAÇÃO DO PESO DA EVIDÊNCIA**

Com base no disposto nos itens 4 (Avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva de agrotóxicos por autoridades regulatórias internacionais) e 5 (Avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva de agrotóxicos pela Anvisa), depreende-se que as abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais são bastante similares e alinhadas, levando a análises semelhantes sobre o potencial de TR. Por isso, as discussões internacionais já realizadas são incluídas na avaliação do peso da evidência feita pela Anvisa.

A RDC nº 294/2019, no seu Art. 11, prevê que o resultado da avaliação toxicológica de um produto técnico, avaliado por uma autoridade que tenha similaridade de medidas e controles em relação aos requisitos de avaliação toxicológica do Brasil, pode ser utilizado para auxiliar na avaliação toxicológica para fins de registro destes produtos no Brasil. Nesse contexto, para a avaliação dos agrotóxicos na reavaliação, pode-se iniciar pela comparação das conclusões internacionais e análise de sua adequabilidade ao contexto regulatório no Brasil. Isso inclui a análise da USEPA e EFSA, quando disponíveis, bem como de outras autoridades regulatórias. Em caso de suficiente harmonia entre as discussões internacionais, concordância com a avaliação do peso da evidência realizada no Brasil e adequabilidade das conclusões à legislação brasileira, é aceitável que as conclusões da Anvisa sejam alcançadas exclusivamente com base nessas discussões internacionais. Contudo, no caso da existência de discordâncias relevantes entre as autoridades internacionais, superficialidade ou discrepâncias no modo de avaliação da qualidade dos estudos, diferenças significativas na quantidade de estudos incluídos nas análises e existência de novas evidências, deve-se realizar uma análise mais aprofundada, incluindo detalhamento dos estudos relevantes para conclusão sobre o peso da evidência.

## **7. CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: AVALIAÇÃO DE ESTUDOS EM HUMANOS**

Este Guia fornece discussão e diretrizes gerais para a avaliação de estudos epidemiológicos. Logo, especificidades na avaliação de determinado conjunto de dados e o uso de outros critérios internacionalmente aceitos podem ser avaliados caso-a-caso.

Na avaliação dos estudos epidemiológicos, todos aqueles considerados de qualidade devem ser incluídos, sejam eles positivos ou negativos. As conclusões sobre a força das evidências que fornecem ou não suporte à causalidade devem ser descritas, com discussão das incertezas e lacunas de dados (USEPA, 2005). Entre as características importantes para avaliar a qualidade dos estudos epidemiológicos estão:

- Clara articulação dos objetivos e hipóteses do estudo;
- Seleção e caracterização adequada dos grupos;
- Caracterização adequada da exposição;
- Tempo de acompanhamento apropriado para detecção do desfecho;
- Averiguação adequada das causas de morbidade e mortalidade;
- Consideração dos vieses e fatores de confusão;
- Tamanho amostral adequado;
- Metodologia clara, bem documentada e adequada para coleta e análise de dados;
- Taxa de resposta e metodologia adequadas para lidar com perda de dados.

Os estudos epidemiológicos observacionais dividem-se em analíticos e descritivos. Estudos analíticos (coorte e caso-controle) geralmente são úteis para identificação de associações causais entre exposição e efeito. Estudos descritivos (relato de casos, estudos transversais e ecológicos), em contrapartida, são úteis para gerar hipóteses, pois examinam a relação entre desfechos e condições pessoais, temporais ou ambientais (USEPA, 2005). Os principais tipos de estudos epidemiológicos observacionais são:

- I. Estudos de coorte – definição dos grupos pela exposição, com posterior avaliação dos efeitos à saúde;
- II. Estudos caso-controle – definição dos grupos pelo efeito à saúde, com posterior avaliação da exposição;
- III. Estudos caso-controle aninhados – definição dos indivíduos para as categorias de caso e controle no decorrer de uma coorte pré-definida, na qual algumas informações sobre exposições e fatores de risco já se encontram disponíveis. Apresentam a vantagem, em relação aos estudos caso-controle convencionais, de redução dos vieses de seleção e de memória.
- IV. Estudos transversais – determinação da exposição e dos efeitos a saúde dentro do mesmo intervalo de tempo, sendo úteis na avaliação da prevalência de dado efeito à saúde.

- V. Estudos ecológicos – determinação da exposição e dos efeitos à saúde por meio de informações relativas a um grupo populacional, isto é, a unidade de análise é um grupo e não um indivíduo.
- VI. Relato de casos e série de casos – descrição da história clínica e epidemiológica de casos, ou mesmo de um único caso. Deve conter informações sobre sinais e sintomas e sobre os resultados laboratoriais e epidemiológicos, incluindo exposições suspeitas.

Os estudos de coorte e caso-controle buscam relacionar as exposições individuais à ocorrência de um desfecho e oferecem uma estimativa do efeito (risco relativo ou *odds ratio*) como medida da associação (IARC, 2019). Estudos de intervenção podem fornecer forte evidência de causalidade (IARC, 2019), mas obviamente não são aplicados a agrotóxicos. Estudos caso-controle podem possuir muitas incertezas, sendo raramente utilizados como única fonte para inferência de uma relação causal; entretanto, quando avaliados em conjunto com estudos de coorte, eles adicionam peso à conclusão sobre a causalidade (IARC, 2006).

Relatos e séries de caso e estudos ecológicos podem possuir muitas incertezas, em razão do próprio desenho experimental, sendo raramente utilizados como única fonte para inferência de uma relação causal. Entretanto, quando avaliados em conjunto com estudos de coorte e caso-controle, eles adicionam peso à conclusão sobre a causalidade (IARC, 2019).

Nos estudos ecológicos, a exposição individual não é documentada, o que pode levar à falácia ecológica ou viés de agregação, isto é, uma associação entre duas variáveis no nível agregado não necessariamente representa uma associação no nível individual (USEPA, 2016). Em estudos transversais, não se pode estabelecer relações temporais entre exposição e efeito à saúde, uma vez que essas informações são coletadas dentro de uma mesma janela temporal. Então, normalmente, faz-se necessária a avaliação de outros estudos para confirmar uma associação causal hipotética sugerida nesse tipo de estudo. Portanto, na análise do peso da evidência para agrotóxicos, opta-se pela exclusão desses dois tipos de estudos para a tomada de decisão, por considerar que eles apenas permitem o levantamento de hipóteses, sem a possibilidade de testá-las.

Relatos e séries de caso buscam descrever um efeito específico em uma pessoa ou um grupo de indivíduos expostos a uma substância e raramente são utilizados, pois sozinhos não permitem inferência de causalidade (pequena amostra, ausência de acompanhamento). Entretanto, eles podem ser úteis para a identificação de desfechos incomuns que podem levar a estudos observacionais analíticos (USEPA, 2005).

Estudos epidemiológicos independentes podem levar a resultados de difícil interpretação, por isso a combinação da análise de dados deve ser considerada. Há dois tipos de combinação da análise: a combinação das estatísticas (risco relativo) de estudos individuais, denominada meta-análise, e a combinação dos dados brutos dos estudos para uma análise agrupada (IARC, 2019).

A vantagem da combinação da análise é o aumento da precisão decorrente do aumento do tamanho da amostra e da oportunidade de explorar potenciais efeitos de confusão, interações e efeitos modificadores que podem explicar a heterogeneidade. A desvantagem da análise combinada é a possibilidade da falta de compatibilidade dos dados entre os diferentes estudos como diferenças no recrutamento, procedimentos e coleta de dados (IARC, 2019). Também é importante considerar as diferenças na qualidade dos estudos agrupados e vieses de publicação (USEPA, 2005). Apesar dessas limitações, análises combinadas bem conduzidas possuem bases mais sólidas para conclusões de causalidade do que estudos individuais (IARC, 2006) e introduzem consistência na avaliação do peso da evidência (USEPA, 2005).

Algumas meta-análises tendem a se limitar à investigação da magnitude média da associação em detrimento da análise de estudos individuais. A motivação é que geralmente a agregação dos resultados aumenta o poder estatístico e a precisão do efeito investigado (EFSA, 2017). Entretanto, as estimativas devem ser agrupadas apenas quando fizer sentido. Um importante aspecto que muitas vezes é negligenciado é a heterogeneidade das forças de associação entre os subgrupos de indivíduos. Heterogeneidade deve ser avaliada e quantificada. Explorar as razões das inconsistências dos achados pode fornecer importante compreensão dos padrões observados. Por exemplo, resultados conflitantes, quando agregados podem fornecer uma medida de associação igual a 1,0, mas decorrer da resposta distinta à exposição entre subgrupos diferentes (jovens e idosos, homens e mulheres, trabalhadores rurais e urbanos).

As informações sobre análises de subgrupos fornecidas no estudo devem ser cuidadosamente avaliadas. Análises de sensibilidade devem complementar os resultados fornecidos por diferentes estudos com o objetivo de avaliar a heterogeneidade e o possível impacto de fatores relevantes não controlados, juntamente com erros de informação e amostragem (EFSA, 2017).

A figura 4 resume a contribuição dos diferentes tipos de estudos epidemiológicos na avaliação do WoE de efeitos à saúde relacionados aos agrotóxicos.



**Figura 4.** Contribuição dos diferentes tipos de estudos epidemiológicos na avaliação do peso da evidência de efeitos à saúde relacionados a agrotóxicos.

Os parâmetros para avaliação da qualidade dos estudos epidemiológicos serão detalhados a seguir.

#### a) Avaliação da exposição

Em todas as análises da relação entre a ocorrência de efeitos reprodutivos e exposições potencialmente tóxicas, é importante definir o grau de exposição que produz o efeito à saúde, visto que a probabilidade de classificação incorreta desse fator pode reduzir a capacidade de um estudo em reconhecer um efeito real mediado pela substância. As exposições parentais prévias à concepção e as exposições intrauterinas têm sido associadas aos efeitos mais comumente estudados (perda fetal, malformações, baixo peso ao nascer e medidas de infertilidade ou subfertilidade). Essas exposições, em conjunto com os cenários de exposição pós-natal (amamentação, ingestão de água/alimentos e no ambiente), também podem estar associadas aos efeitos no desenvolvimento pós-natal – alterações no crescimento ou na função comportamental e cognitiva.

Muitos efeitos reprodutivos resultam de exposições durante certos períodos críticos. A classificação apropriada da exposição depende dos efeitos avaliados, do mecanismo biológico afetado pela exposição e do tempo de meia-vida da substância em estudo. A meia-vida, em combinação com os padrões de exposição (por exemplo, contínua ou intermitente), determinam a dose real à qual o indivíduo está exposto durante o período crítico (USEPA, 1996).

Atualmente, há diversas abordagens para avaliar a exposição, as quais podem variar em exatidão, precisão e recursos requeridos. Elas incluem: 1) métodos indiretos - baseados em registros históricos e questionários (verificação de moradia próxima a culturas tratadas ou trabalhar na área agrícola, por exemplo) e monitoramento ambiental (verificação dos níveis de contaminantes nos ambientes domésticos e de trabalho, no ar, água, solo e alimentos); e 2) métodos diretos - baseados em monitoramento pessoal (medição da exposição dérmica, inalatória e oral, por meio do consumo de alimentos) e biomonitoramento (medição de um produto químico ou seu(s) metabólito(s) em amostras biológicas como sangue, urina, saliva, leite, tecido adiposo e outros) (USEPA, 2016).

Dados provenientes de métodos indiretos, em geral, não podem ser usados para estimar os níveis quantitativos de exposição sem modelagem adicional. Ou seja, com base nesses dados é possível uma classificação da exposição de forma dicotômica (exposta x não exposta) ou em escala ordinal (baixa, média e alta exposição, por exemplo). Por outro lado, os métodos de avaliação direta podem ser usados para estimar, em termos quantitativos, a exposição individual ou os níveis de dose interna, pois se baseiam em dados sobre a exposição real do indivíduo, como falado anteriormente. Métodos diretos são mais comuns em estudos prospectivos, mas também são usados em estudos retrospectivos quando há disponibilidade de amostras biológicas de grupos populacionais bem definidos (USEPA, 2016).

### **b) Análise dos desfechos apropriados**

Os parâmetros reprodutivos disponíveis para serem avaliados em estudos epidemiológicos são limitados por vários fatores, quais sejam: magnitude relativa da exposição, tamanho e características demográficas da população (estado civil, idade, nível educacional, condição socioeconômica e histórico de gestação anterior); e capacidade de observação desses parâmetros em humanos. Os desfechos de TR mais comumente avaliados são: 1) medidas indiretas de fertilidade/infertilidade (comparando taxas de nascimento ou intervalos de tempo entre nascimentos ou gestações); 2) histórico de alguns resultados de gestações (por exemplo, perda embrionária/fetal, peso e proporção de sexo ao nascer, malformações congênitas, crescimento e desenvolvimento físico; funcionalidade de órgãos/sistemas; efeitos comportamentais); 3) avaliações do sêmen (contagem, morfologia e motilidade espermática); 4) ciclo menstrual; e 5) dosagens hormonais no sangue ou urina (USEPA, 1996).

Especificamente com relação aos efeitos no pós-natal, é comum a utilização de escalas de desenvolvimento padrão (por exemplo, escala neonatal de avaliação comportamental; escalas de desenvolvimento infantil de Bayley; escalas Wechsler) para avaliar bebês ou crianças pequenas, associada a alguma medida biológica de exposição. Esses testes foram delineados para examinar certos desfechos, com abrangência para determinadas faixas etárias. É importante que seja conduzida uma bateria de testes para a obtenção de uma avaliação adequada, em razão da possibilidade de efeitos interrelacionados (déficits auditivos e desenvolvimento da linguagem, por exemplo). Adicionalmente, diferentes fatores – educação parental, nível socioeconômico, histórico obstétrico, características gerais de saúde (lesões, infecções, dentre outros) – capazes de influenciar na pontuação nessas escalas e, consequentemente, na análise desses efeitos, devem ser conhecidos e controlados, conforme detalhado no item seguinte (USEPA, 1991).

### **c) Controle de variáveis de confusão**

O confundimento ocorre quando as três condições abaixo são cumpridas:

- a variável suspeita de ser a causa do viés de confusão está associada à variável de exposição de interesse;
- a variável de confusão está associada ao desfecho estudado;
- a variável de confusão não é uma variável intermediária na cadeia causal entre a variável de exposição de interesse e o desfecho.

Um fator de confusão pode distorcer tanto a magnitude quanto a direção da medida de associação entre a exposição de interesse e o resultado avaliado. No caso da TR, os fatores de risco a serem considerados incluem idade, tabagismo, ingestão de álcool ou cafeína, uso de drogas e histórico reprodutivo. Além disso, grupos de indivíduos podem representar subpopulações suscetíveis,

com base em características genéticas, adquiridas (por exemplo, comportamentais) ou de desenvolvimento (por exemplo, maior efeito associado a exposições na infância) (USEPA, 1996).

Fatores de risco conhecidos e potenciais devem ser avaliados para identificar aqueles que podem ser enquadrados como fatores de confusão ou modificadores de efeito. Um fator modificador de efeito altera as relações exposição-resposta quando presente em diferentes níveis. Isto é, são variáveis que afetam diferencialmente a magnitude do efeito, por estratos (por exemplo, idade, raça/etnia, polimorfismos genéticos). É importante que esses fatores sejam compreendidos – e não minimizados como os fatores de confusão – pois podem ser importantes na avaliação das diferenças de risco entre os estratos populacionais e, consequentemente, na identificação de subpopulações mais suscetíveis (USEPA, 2016).

Tanto os fatores de confusão quanto os modificadores de efeito precisam ser controlados nas etapas de desenho e/ou análise do estudo, a fim de melhorar a estimativa dos efeitos atribuíveis à exposição. Então, na análise de um estudo epidemiológico, deve-se avaliar se fatores de confusão relevantes foram devidamente identificados, descritos, medidos e analisados, de modo que uma estimativa imparcial da associação investigada possa ser obtida. Quando detectadas falhas no controle dessas variáveis, deve ser atribuído menor peso ao estudo ou mesmo ser descartado como evidência.

Numa abordagem de avaliação do peso da evidência, o aumento do risco observado entre vários estudos, com diferentes fatores de confusão, indica consistência, o que aumenta o peso da inferência de que a ST foi o agente etiológico (USEPA, 2005).

Em estudos de coorte, comparações com taxas locais da doença podem ou não ser mais apropriadas do que a comparação com taxas nacionais. Comparações internas entre indivíduos com diferentes níveis de exposição são desejáveis, pois elas diminuem o potencial de confusão relacionado aos diferentes fatores de risco entre populações de referência externa e a população estudada (IARC, 2006).

#### d) Controle de viés

Viés é um erro sistemático no desenho ou condução de um estudo, que gera resultados sistematicamente diferentes da situação real (não observada). Ele pode ocorrer em diferentes etapas do estudo. Se ocorrer durante a seleção dos participantes é chamado de viés de seleção (viés de amostragem, viés de não-respondentes e o viés de perdas de acompanhamento, no caso de estudos prospectivos); se ocorrer durante a coleta das informações dos participantes é chamado de viés de informação (viés de memória, de diagnóstico, do entrevistador e do instrumento de medição) (USEPA, 2016).

Na análise dos potenciais vieses em estudos de TR, é importante observar quais desfechos – reprodutivo e/ou de desenvolvimento – serão estudados e qual a melhor estratégia na obtenção de dados sobre eles. Por exemplo, na análise de aborto precoce, o uso de prontuários médicos na seleção de gestantes seria um importante viés de seleção, capaz de subestimar a análise, pois essa condição de saúde nem sempre requer internação. Por outro lado, na análise de malformações congênitas, os

registros hospitalares seriam fontes de dados mais completas, quando comparados às declarações de nascidos vivos, por exemplo. Quanto à análise de sêmen, o uso de dados provenientes de banco de esperma ou clínica de fertilidade seria um potencial viés de seleção, pois doadores de esperma são tipicamente de fertilidade comprovada, enquanto homens em clínicas de fertilidade compõem um casal subfértil que está ativamente buscando a concepção (USEPA, 1996).

Com relação ao viés de informação, ele pode levar a erros na classificação de um indivíduo quanto à exposição e ao desfecho analisado. O viés de memória, por exemplo, pode ocorrer quando os participantes que foram expostos e/ou apresentaram efeitos à saúde específicos se recordam das informações de maneira diferente daqueles sem exposição ou desfecho. Já o viés do entrevistador pode ocorrer quando este tem ciência da categoria de exposição (expostos ou não expostos) ou de resultado (caso ou controle) à qual o participante pertence. Uma forma de minimizar esse viés é a análise “cega” do entrevistador e/ou a elaboração de questionários altamente estruturados (USEPA, 1996).

Vale ressaltar a impossibilidade de se eliminar todos os vieses de um estudo. Eles podem ser minimizados com a adoção de algumas abordagens, tais como a validação com uma fonte de dados independente ou o uso de biomarcadores de exposição ou desfecho, quando possível. Na avaliação do estudo, deve-se considerar a descrição dos potenciais vieses e quais foram as abordagens adotadas para caracterizá-los e controlá-los. Dessa forma, é possível determinar em que medida os dados epidemiológicos verificados estão super ou subestimados em relação ao efeito real.

#### e) Força do estudo e análise estatística

A força – ou capacidade de um estudo de detectar um efeito verdadeiro – é dependente do tamanho do grupo estudado, da variação entre réplicas do estudo, da frequência do efeito avaliado na população em geral e do nível de aumento de risco a ser identificado, da precisão na estimativa do efeito e da robustez da associação dos efeitos. Em um estudo de coorte, por exemplo, a detecção de efeitos comuns (perda fetal) requer a análise de centenas de gestações para que se tenha uma alta probabilidade de detecção de um aumento modesto no risco (por exemplo, 133 gestações nos grupos exposto e não exposto para detectar um aumento em duas vezes; alfa = 0,05, força=80%). Por outro lado, resultados menos comuns, como o total de todas as malformações ao nascer, requerem a análise de milhares de gestações para que se alcance a mesma probabilidade (mais de 1200 gestações nos grupos exposto e não exposto). Essa força pode ser aumentada por meio da combinação de populações de vários estudos usando uma meta-análise (USEPA, 1996).

Na avaliação da qualidade de um estudo epidemiológico, também serão considerados os métodos estatísticos usados. Especificamente, são avaliados os seguintes pontos: 1) o poder estatístico, isto é, se os métodos analíticos empregados são capazes de identificar uma associação entre exposição e efeito quando ela, de fato, existe; 2) se esses métodos foram devidamente descritos; 3) se os métodos são adequados para identificar, avaliar e ajustar potenciais variáveis de confusão na relação exposição-efeito; 4) e a descrição de quaisquer análises de subgrupos que possam ter sido

realizadas (inclusive se foram feitas correções estatísticas para múltiplas comparações) (USEPA, 2016).

Com relação aos estudos de TR, em animais experimentais, a ninhada é usada como a unidade de medida para lidar com a não-independência de resposta dentro da ninhada. Por outro lado, as gestações em humanos são sequenciais, o que requer análises que considerem a não-independência de eventos. Caso isso não seja seguido, e que mais de uma gestação por mulher seja incluída na análise, essas observações não-independentes irão superestimar o tamanho real de grupos sendo comparados, o que aumenta artificialmente a probabilidade de alcançar significância estatística. Problemas de análise podem ocorrer nas seguintes situações: 1) efeitos adversos prévios são resultantes das mesmas exposições; e 2) efeitos adversos prévios podem acarretar mudanças de comportamento capazes de reduzir as exposições. Algumas abordagens para lidar com esses problemas são: selecionar uma gestação por família ou usar equações de estimativa generalizadas (USEPA, 1996).

A EFSA (2017) propôs que um conjunto de parâmetros sejam utilizados para caracterização mais clara e transparente da confiabilidade dos estudos epidemiológicos em três categorias: alta confiabilidade (baixo risco de viés), média confiabilidade (médio risco de viés) e baixa confiabilidade (alto risco de viés). Aos estudos de alta confiabilidade, é conferido maior peso na avaliação enquanto os estudos de baixa confiabilidade são excluídos. Adaptações a essa proposta foram feitas para a avaliação pela Anvisa, conforme o Quadro 6.

**Quadro 6.** Parâmetros para caracterização da confiabilidade de estudos epidemiológicos.

PARÂMETRO	CONFIABILIDADE		
	ALTA	MODERADA	BAIXA
<b>Desenho Experimental e Condução</b>	Estudos prospectivos; Hipóteses previamente especificadas; Especificidade da substância e do desfecho.	Estudos prospectivos com limitações na identificação da resposta e do desfecho; Estudos caso-controle.	Estudos ecológicos; Estudos transversais; Estudos caso-controle com limitações na identificação da resposta e do desfecho.
<b>População</b>	Amostragem randomizada; Amostra com suficiente poder estatístico; Característica populacionais bem definidas, inclusive subgrupos mais vulneráveis.	Poder estatístico questionável; Amostra não representativa de população suscetível; Características da população não suficientemente definidas.	Sem informação detalhada de seleção; Características da população fracamente definidas.
<b>Avaliação da Exposição</b>	Precisa e acurada com métodos validados (biomonitoramento ou exposição externa);	Métodos não validados; Questionário/entrevista não validados com perguntas de exposição a substâncias específicas.	Questionários/ entrevistas de baixa qualidade com perguntas sobre grupos de substâncias;

**Quadro 6.** Parâmetros para caracterização da confiabilidade de estudos epidemiológicos.

	Questionário/entrevista validados com perguntas de exposição a substâncias específicas.	Ausência de informação sobre substância específica.	
<b>Desfecho Toxicológico</b>	Desfecho padronizado e validado na população; Histórico médico/diagnóstico confirmados.	Desfecho padronizado, mas não validado na população; Ferramenta de varredura; Histórico médico não confirmado.	Desfecho não padronizado e não validado; Desfecho inapropriado Auto relato de desfecho.
<b>Fatores de Confusão</b>	Adequado controle de fatores de confusão; Fatores de confusão claramente indicados.	Fatores de confusão são parcialmente controlados; Nem todas as variáveis relevantes são consideradas.	Sem controle de potenciais fatores de confusão e modificadores de efeito no desenho experimental e na análise.
<b>Análise Estatística</b>	Desenho estatístico apropriado (tamanho amostral, maximização do uso de dados, relato não seletivo); Métodos estatísticos de controle de confundidores; Apresentação de estimativas ajustadas e não ajustadas; Análise de subgrupos e interações.	Métodos aceitáveis; Escolhas analíticas que perdem informação; Relato pouco claro; Condução de análises Post hoc, que são claramente indicadas.	Estatística descritiva ou análises bivariadas questionáveis; Ausência de comparações; Comparações não claramente descritas; Deficiência nas análises (por exemplo, testes múltiplos).
<b>Falhas de Publicação</b>	Elementos-chave em material e métodos e resultados são descritos com suficiente detalhamento; Número de indivíduos relatado para cada etapa; É fornecido provável mecanismo para a associação investigada.	Alguns elementos em material e métodos e em resultados não são descritos com suficiente detalhamento; Interpretação dos resultados moderadamente descrita.	Deficiência no relato (interpretação do efeito, controle de confundidores); Publicação seletiva; Escassez de informação sobre fatores relevantes que podem afetar a relação exposição-saúde; Foco incorreto nas inferências; Conclusões não justificadas.

Após a avaliação da qualidade individual dos estudos epidemiológicos e meta-análises, a força da evidência deve ser julgada considerando alguns critérios de causalidade (IARC, 2019). Uma forte associação (alto risco relativo ou *odds ratio*) é mais provável de indicar causalidade do que uma fraca associação, entretanto uma fraca associação pode ser relevante quando a doença ou a exposição é comum. Havendo inconsistências entre as investigações, deve-se conferir mais peso aos estudos metodologicamente mais robustos (IARC, 2019). Então, na análise do peso da evidência, deve-se: 1) conduzir separadamente avaliações de estudos referentes a exposição ocupacional e não-ocupacional

e 2) atribuir maior peso aos estudos na seguinte ordem: metanálise, coortes prospectivas, caso-controle aninhados à coorte e caso-controle.

Determinar se a associação observada é causal ou espúria constitui um dos maiores desafios na avaliação do peso da evidência de estudos epidemiológicos e envolve a consideração de uma série de fatores (USEPA, 2005; EFSA, 2017). A USEPA (2005), a IARC (2019) e a EFSA (2017) utilizam os critérios de Bradford Hill como orientadores para essa avaliação somados a outros aspectos também considerados relevantes. Assim, força da associação, consistência, plausibilidade biológica, coerência, temporalidade e graduação biológica são exemplos de critérios comumente utilizados. A ausência de um ou mais aspectos não exclui a causalidade, que deve ser considerada a partir da análise de todo o conjunto de dados considerando os aspectos qualitativos desses estudos e não só a quantidade de estudos positivos ou negativos (USEPA, 2005; EFSA, 2017). Entretanto, quanto mais critérios são preenchidos, maior peso pode ser conferido aos achados e fica mais evidente que a associação encontrada é uma associação causal (EFSA, 2017). Alguns desses critérios serão descritos a seguir (USEPA, 2005; EFSA, 2017):

- Consistência da associação: confere-se maior peso à inferência quando o risco é observado em diversos estudos independentes, especialmente aqueles com diferentes desenhos experimentais e populações em diferentes circunstâncias de exposição. Esse critério também deve ser aplicado ao integrar na análise diferentes tipos de evidência (epidemiológica, em animais, *in vitro*, *in silico*).
- Força da associação: confere-se maior peso à inferência quando se observa riscos altos, precisos e estatisticamente significativos. Pequenos riscos não indicam ausência de causalidade, pois podem ser reflexo da baixa potência do agente ou desencadeamento de doenças comuns.
- Especificidade da associação: confere-se maior peso à inferência quando é possível associar à causa um único efeito. Para câncer, é mais raramente utilizado, pois normalmente os agentes carcinogênicos são associados a tumores em múltiplos sítios e geralmente um mesmo tipo de câncer possui diversas causas. Entretanto, a integração de outros tipos de estudos à análise permite que dados mecanísticos confirmem essa especificidade às evidências.
- Relação temporal da associação: a causalidade depende de tempo adequado entre a exposição e a ocorrência do desfecho. Estudos suficientemente longos para o desenvolvimento da doença são essenciais.
- Gradiente biológico: confere-se maior peso à inferência quando é possível verificar aumento da incidência dos efeitos com o aumento da exposição ou quando se demonstra decréscimo do risco após a interrupção ou redução da exposição. Essa informação pode ser coletada, por exemplo, quando há caracterização de uso de diferentes tecnologias ou equipamentos de proteção pelo trabalhador exposto.

- Plausibilidade biológica: confere-se maior peso à inferência quando dados de estudos experimentais demostram mecanismos plausíveis para a ocorrência da doença.
- Coerência: confere-se maior peso à inferência quando diferentes tipos de evidência sugerem associação entre a exposição e a doença, como estudos com animais e toxicocinéticos. A interpretação da evidência deve fazer sentido e não ser conflitante com o conhecimento atualizado sobre o desfecho toxicológico avaliado.
- Analogia: informações sobre análogos estruturais podem reforçar a associação causal de um agente.
- Evidência experimental: Resultados de estudos randomizados fornecem forte evidência da relação causal.
- Sequência de eventos-chave: a clara identificação dos eventos-chaves nos dados disponíveis permite a caracterização da Via de Efeito Adverso (*Adverse Outcome Pathway – AOP/MoA*) para um desfecho específico relevante, o que confere grande peso à inferência. Quando existe informação suficiente disponível, a análise qualitativa do AOP e MoA confere plausibilidade biológica aos efeitos encontrados nos estudos epidemiológicos.

Quando vários estudos mostram uma associação pequena ou ausente entre exposição e desfecho, deve-se avaliar se os dados demostram evidência inadequada ou ausência de evidência para determinado desfecho (IARC, 2019).

## **8. CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: ABORDAGENS ALTERNATIVAS AO USO DE ANIMAIS**

Em reconhecimento aos desafios dos métodos tradicionais de testes de toxicidade, está em andamento uma mudança de paradigma na Toxicologia, de decisões baseadas majoritariamente em testes em animais *in vivo*, utilizando parâmetros apicais, para o maior uso de testes *in vitro*, no âmbito de abordagens integradas para testes e avaliação (*Integrated Approaches to Testing and Assessment – IATA*). Esta mudança de abordagem depende da identificação e avaliação da perturbação de eventos moleculares e vias celulares associadas a resultados adversos em humanos, utilizando modelos *in vitro* e tecnologias de maior rendimento. Assim, novas abordagens metodológicas (*New Approach Methodologies - NAMs*), incluindo ensaios *in vitro* (ômicas, baseados em células, baseados em tecidos, etc.), modelos *in silico* e outras abordagens computacionais estão sendo desenvolvidos para fornecer informações sobre perigos e riscos químicos para humanos, limitando ao mesmo tempo o uso de animais (OECD, 2023).

No entanto, especialmente para a toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento, a troca de testes *in vivo* complexos por testes *in vitro* relativamente simples é mais desafiadora, uma vez que os testes reprodução e de desenvolvimento lidam com todas as fases do ciclo reprodutivo, começando

com a fertilidade feminina e masculina, o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, culminando em manifestações tardias que só podem ser detectadas na geração seguinte. O ciclo reprodutivo engloba uma extensa lista de mecanismos em nível molecular, celular, tecidual e do organismo, com diferentes janelas de sensibilidade ao longo do tempo. Devido à sua complexidade, todo o processo não pode ser modelado num único sistema *in vitro*; de forma que os diferentes componentes do ciclo reprodutivo terão de ser estudados individualmente e depois integrados em estratégias de teste (Beekhuijzen, 2017).

O desenvolvimento de ensaios alternativos levou a uma ampla variedade de plataformas baseadas em organismos modelos simples vertebrados e não vertebrados, culturas de tecidos e órgãos e culturas com células primárias e linhagens celulares humanas (Piersma et al, 2022). Os testes de toxicidade para o desenvolvimento mais conhecidos são a cultura de embriões inteiros de roedores, o ensaio de embriões de *zebrafish* e o ensaio de células-tronco embrionárias (Beekhuijzen, 2017). No entanto, atualmente ainda não existe nenhuma diretriz de teste adotada oficialmente pela OCDE para testes *in vitro* que avaliam a toxicidade reprodutiva.

Por outro lado, a OECD já possui várias diretrizes de teste *in vitro* validadas relacionadas a modos de ação endócrinos (ligação e transativação dos receptores de estrogênio e androgênio, entre outros), que são relevantes no contexto da avaliação da toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento. Essas serão discutidas no guia específico para avaliação do potencial de desregulação endócrina de agrotóxicos.

Além disso, há diversos outros ensaios ou baterias de ensaios não validados que estão em desenvolvimento, como a bateria de testes *in vitro* de neurotoxicidade para o desenvolvimento (*Developmental Neurotoxicity In Vitro Battery* – DNT IVB), para a qual a OECD publicou em 2023 um documento com recomendações iniciais sobre a avaliação desses tipos de dados (OECD, 2023). O Laboratório de Referência da União Europeia sobre Alternativas aos Testes em Animais (EURL ECVAM) possui três métodos *in vitro* validados de toxicidade para o desenvolvimento: o teste de micromassa de botão de membro de rato (*micromass* - MM), o teste de cultura de embriões pós-implantação inteiros de rato (*whole embryo culture* - WEC) e o teste de células-tronco embrionárias de camundongos (*embryonic stem cell test* - EST) (Piersma et al, 2022). Como exemplo, a capacidade preditiva do teste de células-tronco embrionárias nas suas diversas formas já foi amplamente documentada e ele pode ser usado para testar eventos-chaves selecionados de uma AOP (Piersma et al, 2022).

O ToxCast também já inclui uma série de dados publicamente disponíveis em células-tronco embrionárias humanas. Esses dados, combinados com ensaios de menor rendimento em um nível mais alto de complexidade e abordagens de aprendizado de máquina para modelar os dados, apresenta oportunidades promissoras para testes de toxicidade no desenvolvimento sem o uso de animais. Modelos computacionais de processos de embriogênese estão sendo publicados (Piersma et al, 2022).

Em resumo, métodos *in vitro* ainda não podem ser utilizados exclusivamente numa estratégia de testes de toxicidade reprodutiva para agrotóxicos. Mas a combinação de ensaios numa abordagem faseada e/ou em bateria e sua atribuição a uma AOP pode fornecer informações relevantes sobre o perigo e risco de uma substância (Piersma et al, 2022).

## 8.1 Bateria de testes *in vitro* de neurotoxicidade para o desenvolvimento – OECD 377

Os ensaios da bateria (atualmente 17 ensaios) não são baseados em alvos moleculares, já que ainda não existe uma lista abrangente de possíveis alvos, mas sim em processos fundamentais do neurodesenvolvimento em nível celular: proliferação, diferenciação, apoptose, migração, formação de neuritos, sinaptogênese e formação de redes neurais. Cada ensaio inclui a avaliação da viabilidade celular ou citotoxicidade. Perturbações químicas nestes processos podem resultar em resultados adversos em nível de órgão ou do indivíduo. Em combinação, os ensaios desta bateria podem fornecer uma compreensão mecanística dos processos biológicos subjacentes que podem ser vulneráveis a perturbações induzidas por substâncias químicas.

No entanto, é importante destacar que esta bateria não contém todos os componentes que são importantes para determinados modos de ação que podem levar a resultados adversos no neurodesenvolvimento como, por exemplo, perturbações do sistema endócrino e imunológico.

Além disso, ainda não houve uma validação clássica da DNT IVB de acordo com o Documento de Orientação 34 da OCDE sobre “Validação e aceitação internacional de métodos de ensaio novos ou atualizados para avaliação de perigo”. Esta limitação deve ser considerada ao utilizar esses dados na avaliação do perigo.

Atualmente, não existem evidências suficientes de que a DNT IVB possa substituir a utilização das diretrizes de ensaios *in vivo* de DNT: OCDE 426 e OECD 443 (coortes DNT 2A e 2B). Em vez disso, os testes da DNT IVB devem ser orientados por abordagens integradas para testes e avaliação baseadas nas necessidades regulatórias.

Assim, os resultados negativos da DNT IVB nesse momento não devem ser interpretados como ausência de potencial de DNT, devido às incertezas associadas aos métodos *in vitro* utilizados, bem como à falta de cobertura para alguns processos críticos do neurodesenvolvimento.

Na avaliação do perigo, a bateria pode ser utilizada da seguinte forma:

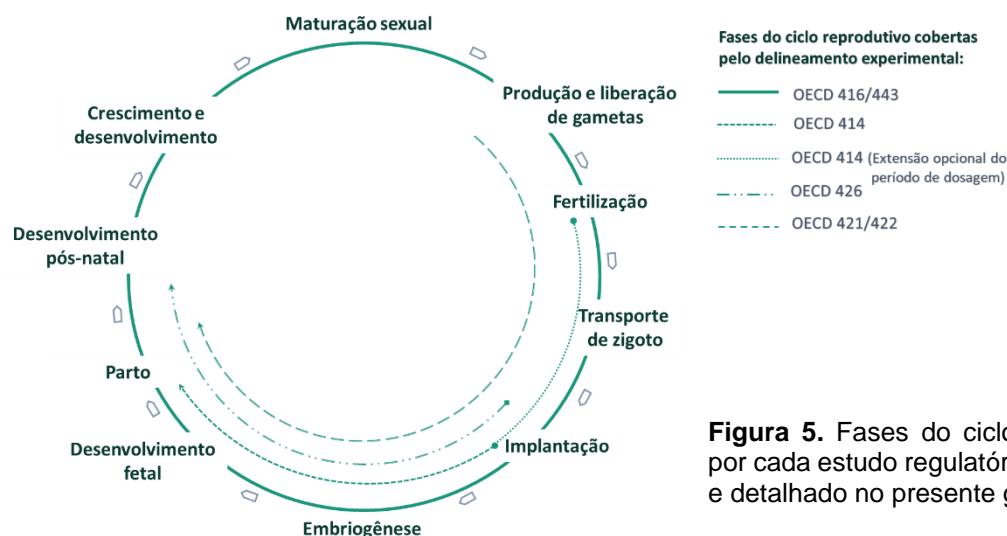
- Quando não existem dados de DNT *in vivo*, os dados dos ensaios da DNT IVB podem ser usados para determinar se, e quais, testes de acompanhamento (por exemplo, ensaios ortogonais, espécies alternativas como *zebrafish* ou diretrizes de teste) podem ser realizados.
- Quando existem dados de um ensaio baseado em um evento molecular iniciador ou de ensaios em espécies alternativas (como *zebrafish*), a realização dos ensaios da DNT IVB pode informar a avaliação baseada em WoE.

- Se os dados de DNT *in vivo* existentes forem ambíguos, os dados da DNT IVB podem ser usados para informar a avaliação do WoE.

Esta bateria foi desenvolvida com base no conhecimento atualmente disponível; por isso, o documento com recomendações publicado pela OECD (2023) está sujeito a melhorias e revisões à medida que novos métodos de ensaio e mais dados de testes químicos se tornam disponíveis para melhorar a capacidade preditiva da bateria de testes, e à medida que a confiabilidade de cada método de teste individual é melhorada através de trabalhos de validação adicionais.

## 9. CARACTERIZAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA: AVALIAÇÃO DE ESTUDOS EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os estudos incluídos nesse item são aqueles considerados relevantes pela OECD para a avaliação de desfechos relacionados à fisiologia reprodutiva e ao desenvolvimento/



**Figura 5.** Fases do ciclo reprodutivo cobertas por cada estudo regulatório indicado pela OECD e detalhado no presente guia.

neurodesenvolvimento da prole, após exposições de animais adultos ou durante todas as fases do desenvolvimento (exposição intrauterina, via lactação e administração direta até a maturação sexual em idade adulta) (OECD, 2008; ECHA, 2017). A Figura 5 ilustra as fases do ciclo reprodutivo investigadas por cada um dos estudos experimentais que serão abordados nos itens posteriores desse guia.

Esses estudos, resumidos no Quadro 7, devem ser avaliados individualmente quanto à qualidade e à força a fim de serem considerados relevantes para a avaliação do peso da evidência (adaptado de OECD, 2008).

**Quadro 7.** Visão geral das diretrizes de estudos *in vivo* da OECD para toxicidade reprodutiva.

ESTUDO	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	DESFECHOS AVALIADOS
--------	------------------------	---------------------

**Quadro 7.** Visão geral das diretrizes de estudos *in vivo* da OECD para toxicidade reprodutiva.

<b>DIRETRIZES OECD 421 E 422</b>  <b>TESTES DE TRIAGEM PARA TOXICIDADE REPRODUTIVA E DO DESENVOLVIMENTO</b>	<p>Período de exposição: 2 semanas antes do acasalamento até DPN 13;</p> <p>Grupos: 3 níveis de dose + controle.</p> <p>Número de animais:</p> <p>N= 10 machos e fêmeas parentais/dose.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertilidade;</li> <li>• Duração: gestação e parto;</li> <li>• Crescimento e sobrevivência fetal e de filhotes até o DPN 13.</li> </ul>
<b>DIRETRIZ OECD 443</b>  <b>ESTUDO DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE UMA GERAÇÃO ESTENDIDA</b>	<p>Período de exposição: em geral, 2 semanas antes do acasalamento (P) até o DPN 90-120 (F1 – coortes 1<sup>a</sup> e 1b). em caso de extensão da coorte 1b, até o DPN 4 ou 21 (F2).</p> <p>Grupos: 3 níveis de dose + controle.</p> <p>Número de animais (N): N = pares de acasalamento suficientes para produzir 20 fêmeas prenhas/dose (geração P); N = 20 pares de acasalamento (extensão da coorte 1b, se acionada); N = 10 machos e 10 fêmeas/dose (coortes 2<sup>a</sup>, 2b e 3, se acionadas).</p>	<p><u>Geração parental (P):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• crescimento, sobrevivência, fertilidade;</li> <li>• ciclicidade estral e parâmetros espermáticos;</li> <li>• duração da gestação e tamanho da ninhada;</li> <li>• histopatologia e peso dos órgãos reprodutivos e não reprodutivos;</li> <li>• hematologia e dosagens bioquímicas, incluindo as hormonais;</li> </ul> <p><u>Geração filial (F1):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• crescimento, sobrevivência e maturação sexual;</li> <li>• histopatologia e peso dos órgãos reprodutivos e não reprodutivos (coorte 1<sup>a</sup>)</li> <li>• peso dos órgãos reprodutivos e histopatologia adicional (coorte 1b)</li> <li>• hematologia e dosagens bioquímicas, incluindo as hormonais;</li> <li>• fertilidade de animais F1 para produzir geração F2 (extensão da coorte 1b) sob certas condições;</li> <li>• neurotoxicidade (coortes 2<sup>a</sup> e 2b) e imunotoxicidade (coorte 3) do desenvolvimento em caso de preocupação específica;</li> </ul>
<b>DIRETRIZ OECD 416</b>  <b>ESTUDO DE TOXICIDADE REPRODUTIVA DE DUAS GERAÇÕES</b>	<p>Período de exposição: 10 semanas antes do acasalamento até o desmame da geração F2;</p> <p>Grupos: 3 níveis de dose + controle;</p> <p>Número de animais (N): N = 20 machos e fêmeas parentais.</p>	<p><u>Geração parental (P, F1):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertilidade;</li> <li>• Ciclicidade estral e parâmetros espermáticos;</li> <li>• Alterações na gestação;</li> </ul> <p><u>Geração filial (F1, F2):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crescimento, desenvolvimento e viabilidade;</li> <li>• DAG, maturação sexual, histopatologia e peso dos órgãos reprodutivos, cérebro e órgãos-alvo;</li> </ul> <p>Recomendado: atividade motora, função sensorial, ontogênese de reflexos.</p>

**Quadro 7.** Visão geral das diretrizes de estudos *in vivo* da OECD para toxicidade reprodutiva.

<b>DIRETRIZ OECD 414</b>	<p>Período de exposição: da fertilização ou, no mínimo, da implantação até 1-2 dias antes do nascimento previsto;</p> <p>Grupos: 3 níveis de dose + controle;</p> <p>Definição de número de animais (n): N = 20 fêmeas prenhas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Implantação e reabsorções;</li> <li>• Crescimento fetal;</li> </ul> <p>Variações e malformações morfológicas.</p>
<b>DIRETRIZ OECD 426</b>	<p>Período de exposição: durante a gestação e a lactação (DPN 21);</p> <p>Grupos: 3 níveis de dose + controle;</p> <p>Definição de número de animais (N): N = 20 fêmeas prenhas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração: gestação e parto;</li> <li>• Crescimento, desenvolvimento e viabilidade;</li> <li>• Maturação física e funcional;</li> <li>• Alterações comportamentais devido aos efeitos do SNC e SNP;</li> <li>• Peso cerebral e neuropatologia.</li> </ul>

DAG: distância anogenital; DPN: dia pós-natal; SNC: sistema nervoso central; SNP: sistema nervoso periférico; P: geração parental; F1: primeira geração filial; F2: segunda geração filial.

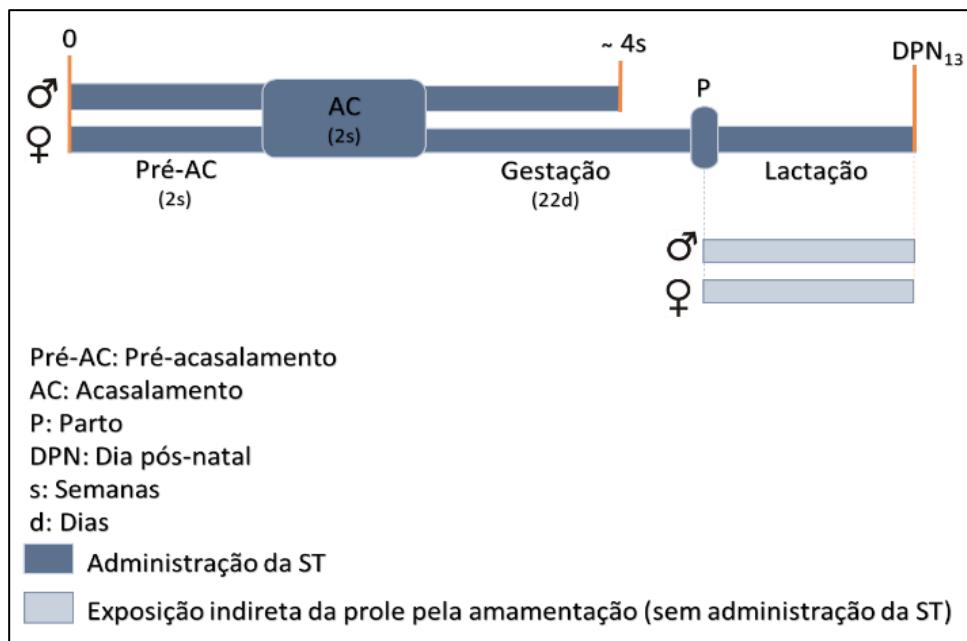
Cabe ressaltar a importância da revisão das informações relativas à substância em estudo, disponíveis até o momento, para embasar a tomada de decisões quanto a: via de administração, escolha do veículo, seleção de espécies animais, seleção dos níveis de dose e possíveis modificações no esquema de dosagem. Portanto, o conjunto de dados disponíveis deve ser considerado no planejamento dos estudos experimentais, bem como na interpretação dos resultados obtidos. Isso inclui dados referentes a parâmetros físico-químicos, toxicocinéticos (incluindo biotransformação específica da espécie), toxicodinâmicos, relação estrutura-atividade (SAR), processos metabólicos *in vitro* e resultados de estudos anteriores de toxicidade (OECD, 2008).

Na condução de novos estudos devem ser consultadas as versões mais atualizadas disponíveis das diretrizes OECD, pois elas são constantemente revisadas. No entanto, é importante esclarecer que os estudos conduzidos anteriormente às atualizações mais recentes das diretrizes OECD e que, portanto, seguem protocolos anteriores aos aqui descritos, continuam válidos, ainda que não cumpram os requisitos experimentais das diretrizes vigentes. Isso significa que, nesses casos, os estudos serão aceitos e avaliados caso a caso, com relação aos desvios dos protocolos atuais e potencial impacto na interpretação dos dados.

A seguir, serão fornecidas informações de cada estudo individualmente, bem como recomendações para a sua avaliação. Um maior detalhamento para a condução dos estudos deve ser verificado nas respectivas Diretrizes e guias da OECD ([https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788); <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingforhumanhealth.htm> ).

## 9.1. ESTUDOS DE TRIAGEM EM ANIMAIS EXPERIMENTAIS (OECD 421 E 422)

O objetivo desses estudos é fornecer informações preliminares acerca dos efeitos de uma ST no desempenho reprodutivo masculino e feminino, como função gonadal, comportamento de acasalamento, concepção, desenvolvimento do conceito e parto. É importante destacar que esses testes não substituem os estudos geracionais ou estudos específicos para o desenvolvimento. Eles são úteis para indicar a necessidade de conduzir investigações adicionais e fornecer orientações no delineamento de estudos subsequentes e na interpretação em conjunto de todos os resultados disponíveis na etapa de avaliação do peso da evidência. Os parâmetros de análise incluem, entre outros, exame histológico detalhado nos ovários, testículos e epidídimos, no mínimo, dos animais com dosagens mais altas e dos animais controle (OECD, 2008). O delineamento desse estudo está ilustrado na Figura 6.



**Figura 6.** Delineamento dos estudos de triagem em animais experimentais – Diretrizes OECD 421 e 422.

### 9.1.1. Estudo de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento – Diretriz OECD 421

#### Considerações iniciais e limitações

Este estudo pode ser usado como parte de um conjunto de testes iniciais de substâncias químicas para as quais há pouca ou nenhuma informação toxicológica; como um estudo de seleção de doses a serem utilizadas em estudos completos de reprodução/desenvolvimento; ou, em outras situações em que são considerados relevantes.

Assim, cabe reforçar que esse estudo não fornece informações completas sobre todos os aspectos da reprodução e do desenvolvimento, mas apenas manifestações pós-natais decorrentes da exposição pré-natal ou efeitos induzidos após exposição pós-natal. Isso decorre do seu próprio desenho experimental – grupos com poucos animais, seleção limitada dos desfechos avaliados e curta duração.

### **Princípio do teste**

A ST é administrada – em doses crescentes – a grupos de machos e fêmeas. Os machos devem ser expostos por um intervalo mínimo de quatro semanas e até o dia anterior à eutanásia programada. Esse período abrange duas semanas prévias ao acasalamento, a fase de acasalamento em si e, aproximadamente, duas semanas após o acasalamento. É, portanto, considerado suficiente para permitir a detecção da maioria dos efeitos na espermatogênese e fertilidade masculina, desde que conduzida uma análise histopatológica detalhada das gônadas.

Por sua vez, as fêmeas devem ser expostas por duas semanas prévias ao acasalamento (a fim de cobrir pelo menos dois ciclos estrais completos), pelo tempo variável até a concepção, durante a gestação e por, no mínimo, treze dias após o parto, até e inclusive no dia anterior à eutanásia programada. Ou seja, a duração total do estudo é de aproximadamente 63 dias, a depender da fêmea (14 dias de pré-acasalamento, até 14 dias de acasalamento, 22 dias de gestação e 13 dias de lactação). Todos os animais são avaliados quanto aos desfechos de TR, por meio de observações clínicas e exames patológicos.

### **Detalhamento do método**

Esse estudo deve ser conduzido preferencialmente em ratos e a utilização de outras espécies animais deve ser justificada e adaptada. Os animais experimentais devem ser caracterizados quanto a espécie, linhagem, fonte, sexo, peso e/ou idade. Preferencialmente, a via de administração escolhida deve ser a oral por meio de gavagem, ou ainda pela dieta ou consumo de água– a menos que outra via, como a cutânea ou inalatória, seja considerada mais apropriada.

Recomenda-se que cada grupo tratado e controle contenha, no mínimo, 10 machos e 12-13 fêmeas, pois elas terão que cumprir o critério de inclusão – duração do ciclo estral de 4-5 dias. Então, esse número extra de fêmeas visa obter 10 fêmeas por grupo. Com esse total, espera-se que, após o acasalamento, se obtenha um mínimo de 8 fêmeas prenhas em cada grupo. O objetivo disso é ter um número suficiente de gestações e de prole que possibilite uma avaliação significativa do potencial da ST de interferir na fertilidade, prenhez/gestação e comportamento materno, como também no aleitamento, crescimento e desenvolvimento da prole F1, desde a concepção até o DPN 13.

Em geral, deve-se utilizar, no mínimo, um grupo controle e três níveis de dose, abrangendo desde a dose máxima tolerada (DMT) – a qual induz toxicidade sem causar morte ou sofrimento intenso dos animais – com reduções graduais, a intervalos de 2-4 vezes, até a obtenção de um NOAEL. A seleção desses níveis de dose deve se embasar em dados provenientes de estudos de toxicidade aguda ou de dose repetida, bem como em dados de toxicocinética.

Vale ressaltar a possibilidade de adoção de um teste limite ao invés da condução de um estudo completo com três níveis de dose quando o estudo oral com dose de, no mínimo, 1000 mg/kg p.c./dia não causa efeitos tóxicos observáveis e não se espera toxicidade com base em estudos de substâncias estruturalmente semelhantes. O teste limite se aplica apenas quando a exposição humana sabidamente ocorre em níveis inferiores à dose limite estabelecida. Para outras vias de administração (inalatória ou dérmica), as propriedades físico-químicas da ST geralmente podem determinar a concentração máxima atingível.

Quanto ao esquema de acasalamento, cada fêmea deve ser colocada com um único macho – sem grau de parentesco e do mesmo nível de dose – até que a cópula seja evidenciada ou após o intervalo de 2 semanas. Define-se como DG 0 (dia gestacional zero) aquele em que se verifica a presença de tampão vaginal ou de espermatozoides no esfregaço vaginal. Pode-se ajustar o tamanho da ninhada no DPN 4, por meio da eliminação aleatória de filhotes extras, a fim de se obter 4-5 filhotes/sexo/ninhada, a depender do tamanho da ninhada normal para a linhagem escolhida. Deve-se coletar amostras de sangue de dois dos filhotes excedentes, para serem usadas na determinação dos níveis séricos de T4. Se o tamanho da ninhada não for ajustado, dois filhotes (de preferência, fêmeas) devem ser eutanasiados no DPN 4 para coleta de amostras de sangue destinadas à dosagem das concentrações séricas de hormônio tireoidiano.

Na etapa de avaliação dos animais, os seguintes aspectos devem ser incluídos: observação clínica, peso corporal e consumo de água (se a administração da ST ocorrer via água)/alimento, ciclo estral, parâmetros da prole, dosagens bioquímicas e patologia (necropsia e histopatologia), conforme detalhamento no Quadro 8.

**Quadro 8.** Parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados na geração parental e filial.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO DA ANÁLISE
Observação clínica de animais parentais e prole	Observação clínica geral diária (inclusive com avaliação de morbimortalidade). Registro de alterações comportamentais, sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade (data de início, gravidade e duração).

**Quadro 8.** Parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados na geração parental e filial.

<b>Peso corporal e consumo de água/alimento dos animais parentais</b>	<p>Pesagens periódicas, com início no primeiro dia de administração até o momento da eutanásia.</p> <p>Pesagem de ♀: nos DG 0, 7, 14 e 20; DL0 ou 1 e, no mínimo, DL 4 e 13.</p> <p>Medição semanal do consumo de água/alimentos durante as etapas de pré-acasalamento, gestação e lactação.</p>
<b>Ciclo estral</b>	Monitoramento diário de esfregaços vaginais, desde o início do período de exposição até a constatação de evidências de acasalamento.
<b>Prole</b>	<p>Registro da duração da gestação – calculada a partir do DG 0.</p> <p>Análise de cada ninhada no DL 0 – nº e sexo de filhotes, natimortos, nascidos vivos, presença de anormalidades e de filhotes significativamente menores que os filhotes de controle correspondentes.</p> <p>Pesagem dos filhotes vivos no DPN 0 ou 1 e, no mínimo, nos DPN 4 e DPN 13.</p> <p>Observações clínicas gerais e registro de comportamento anormal.</p> <p>Medição da DAG de todos os filhotes no mesmo dia (entre DPN 0 e 4) e normalização pelo peso corporal registrado.</p> <p>Contagem do número de mamilos/aréolas nos ♂ no DPN 12 ou 13.</p>
<b>Dosagens bioquímicas</b>	<p>Coleta de sangue, com base no seguinte cronograma:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• De, no mínimo, 2 filhotes/ninhada no DPN 4, se houver número suficiente de filhotes.</li> <li>• De todas as mães e de, no mínimo, 2 filhotes/ninhada no DPN 13;</li> <li>• De todos os ♂ adultos ao término do estudo.</li> </ul> <p>Dosagem de T4 nas amostras de filhotes e ♂ adultos, coletadas no DPN 13.</p> <p>Dosagem das amostras dos demais grupos e de outros hormônios quando considerado relevante. As amostras dos filhotes podem ser agrupadas por ninhada para dosagem dos hormônios tireoidianos (T4 e TSH).</p>
<b>Necropsia</b>	<p>Exame macroscópico quanto a anormalidades estruturais ou alterações patológicas (com enfoque nos órgãos do sistema reprodutivo) dos animais adultos e filhotes no momento da eutanásia e em eventuais mortes durante o estudo.</p> <p>Exame do útero quanto à presença e número de sítios de implantação;</p> <p>Determinação do estágio do ciclo estral por meio de esfregaços vaginais coletados no dia da necropsia – correlacionar com histopatologia dos ovários;</p> <p>Pesagem e conservação de ovários (útero e cérvico), testículos, epidídimos, próstata e vesículas seminais, tireoide e demais órgãos com lesões visíveis.</p>
<b>Histopatologia</b>	<p>Exame histopatológico detalhado: ovários, testículos e epidídimos (ênfase nos estágios da espermatogênese e histopatologia da estrutura celular testicular intersticial) – grupos de maior dose e controle.</p> <p>Exame dos demais grupos nos casos de detecção de alteração relevante no grupo de maior dose.</p> <p>Exame histopatológico dos demais órgãos preservados, incluindo tireoide de filhotes e adultos, quando necessário.</p>

DG: Dia gestacional; DL: Dia lactacional, DPN: Dia pós-natal.

## Critérios de aceitabilidade

Considerando-se que esse estudo deve fornecer informações sobre os efeitos de exposição repetida à ST durante as fases do ciclo reprodutivo cobertas pelo protocolo, deve-se seguir adequadamente o regime de doses, os períodos de exposição e os procedimentos de acasalamento, conforme detalhados na seção anterior.

Deve-se informar, para cada grupo tratado: número de animais no início do estudo; número de animais encontrados mortos durante o estudo ou eutanasiados, com a respectiva data de ocorrência; número de animais férteis; número de fêmeas prenhas; número de animais com sinais de toxicidade, incluindo descrição detalhada desses sinais, tempo de início, duração e gravidade; tipos de alterações histopatológicas e todos os dados relevantes da ninhada.

Devido às dimensões limitadas do estudo, análises estatísticas na forma de testes de significância são de valor limitado para muitos desfechos, principalmente reprodutivos. Se análises estatísticas forem usadas, o método escolhido deve ser apropriado para a distribuição da variável examinada e deve ser selecionado previamente ao início do estudo. Onde apropriado, a ninhada deve ser considerada a unidade de análise.

## Análise e interpretação dos resultados

A avaliação dos dados fornecidos por esse estudo incluirá a relação entre a exposição à ST e a presença ou ausência, incidência e gravidade das alterações observadas, incluindo lesões graves, órgãos-alvo identificados, fertilidade afetada, anormalidades clínicas, baixo desempenho reprodutivo da ninhada, alterações no peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos. Serão consideradas nessa análise as propriedades físico-químicas da ST e, quando disponíveis, dados toxicocinéticos.

Em decorrência do curto período de tratamento do sexo masculino, a histopatologia dos testículos e epidídimos deve ser considerada juntamente com os dados de fertilidade, ao avaliar os efeitos reprodutivos masculinos. A comparação com os dados de controle histórico dos parâmetros de reprodução/desenvolvimento (por exemplo, tamanho da ninhada, DAG, retenção de mamilos, níveis séricos de T4), quando disponíveis, também pode ser útil como auxiliar na interpretação dos resultados.

### 9.1.2. Estudo combinado de toxicidade de dose repetida e triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento – Diretriz OECD 422

## Considerações iniciais e limitações

Este estudo combina dois estudos contemplados em diretrizes distintas da OECD, quais sejam: estudo de toxicidade de dose repetida (Diretriz OECD 407) e estudo de triagem para toxicidade reprodutiva/desenvolvimento (Diretriz OECD 421). Desse modo, ele é delineado para fornecer todos

os dados descritos no item anterior e, adicionalmente, comprehende a metodologia básica de toxicidade de dose repetida, a qual pode ser usada para produtos químicos nos quais um estudo de 90 dias não é necessário, ou como estudo preliminar para direcionar um outro de longo prazo.

Então, esse estudo pode ser aplicado como parte de um conjunto de testes de triagem iniciais de substâncias químicas para as quais há pouca ou nenhuma informação toxicológica; como um estudo de seleção de doses a serem utilizadas em estudos completos de reprodução/desenvolvimento; e como uma alternativa para a condução de dois estudos separados. Ou seja, além dos desfechos relativos à reprodução/desenvolvimento, esse estudo também é capaz de identificar substâncias químicas com potencial neurotóxico e imunotóxico, o que pode justificar e direcionar a condução de estudos adicionais específicos para um aprofundamento da investigação desses desfechos.

Como limitações, pode-se citar a maior dificuldade em selecionar os níveis de dose para exposição e em avaliar os dados de toxicidade sistêmica, quando comparado à condução dos dois estudos separadamente, devido às diferenças na sensibilidade entre fêmeas prenhas e não prenhas. Em razão dessas complexidades técnicas, é necessária uma experiência considerável em estudos de toxicidade para a execução desse estudo combinado.

Por outro lado, esse estudo é capaz de discriminar mais claramente a ocorrência de efeitos diretos sobre a reprodução/desenvolvimento daqueles secundários à toxicidade sistêmica. O seu período de dosagem é maior do que em um estudo convencional de dose repetida por 28 dias e requer menos animais de cada sexo por grupo, quando comparado à condução dos dois estudos separadamente.

Então, cabe reforçar que, assim como o estudo descrito no item anterior, esse também não fornece informações completas sobre todos os aspectos da reprodução e desenvolvimento, mas apenas dados de manifestações pós-natais após exposição pré-natal ou de efeitos pós-natais.

## **Princípio do teste**

Exatamente o mesmo já descrito no item 9.1.1, relativo ao estudo de triagem para toxicidade reprodutiva/desenvolvimento (Diretriz OECD 421).

## **Detalhamento do método**

Deve-se seguir as recomendações já descritas no item do estudo anterior quanto aos seguintes aspectos: seleção e preparo de animais; seleção, preparação e administração das doses, inclusive com a previsão de estudo na dose limite; regime de exposição; monitoramento do ciclo estral; acasalamento e definição do tamanho da ninhada.

As diferenças a serem incorporadas nesse estudo são relativas à formação de grupo satélite adicional, que é opcional – cinco animais por sexo nos grupos controle e de dose máxima. Esses animais se destinam à observação de reversibilidade, persistência ou atraso na ocorrência de efeitos tóxicos sistêmicos. Eles devem ser mantidos sem tratamento por, no mínimo, 14 dias adicionais após

a primeira eutanásia programada de fêmeas pós-parto. Isto é, eles não poderão ser utilizados para a avaliação da toxicidade na reprodução/desenvolvimento, uma vez que não serão acasalados.

Com relação à avaliação, os parâmetros referentes ao peso corporal, consumo de água/alimento dos animais parentais e à análise geral da prole devem seguir o racional já descrito no item 9.1.1. O Quadro 9 detalha apenas os pontos de destaque, acrescidos ao presente estudo e que o diferenciam daquele anteriormente descrito.

**Quadro 9.** Parâmetros de toxicidade avaliados na geração parental e filial.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO DA ANÁLISE
<b>Observação clínica</b>	Avaliação geral semelhante à descrita no item 9.1.1, com maior detalhamento de: alterações na pele, pelo, olhos, mucosas, ocorrência de secreções e excreções e atividade autonômica (por exemplo, lacrimação, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório incomum); alterações na marcha, postura, resposta ao manuseio, presença de movimentos clônicos ou tônicos, comportamento estereotipado.
<b>Avaliação neurocomportamental</b>	<p>Teste de reatividade sensorial a diferentes modalidades de estímulo (auditivo, visual e proprioceptivo); avaliação da atividade motora e da força de preensão.</p> <p>N = 5♂ e 5♀ / grupo, selecionados aleatoriamente;</p> <p>Período de análise:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Machos: ao fim da exposição, antes da coleta de sangue.</li> <li>• Fêmeas: durante a última semana de lactação (por exemplo, DL 6-13), pouco antes da eutanásia programada.</li> <li>• Filhotes: avaliação de qualquer comportamento anormal nos momentos de pesagem (DPN 0 ou 1 e, no mínimo, nos DPN 4 e DPN 13).</li> </ul>
<b>Hematologia/ Dosagens bioquímicas</b>	<p>Hematórito, concentrações de hemoglobina, contagem de eritrócitos, de plaquetas e de reticulócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, medição do tempo/potencial de coagulação sanguínea;</p> <p>Dosagem sérica de sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteína total e albumina; de pelo menos duas enzimas indicativas de efeitos hepatocelulares (como ALT, AST) e ácidos biliares.</p> <p>N = 5♂ e 5♀/grupo, selecionados aleatoriamente;</p> <p>Período de análise: ao fim do pré-acasalamento ou como parte do procedimento de eutanásia.</p> <p>A dosagem dos hormônios tireoidianos deve seguir a metodologia já descrita no item 9.1.1 (animais parentais e prole).</p>
<b>Necropsia</b>	<p>Além do descrito no item 9.1.1, deve-se pesar e conservar os seguintes órgãos/tecidos de, no mínimo, 5♂ e 5♀ adultos/grupo, selecionados aleatoriamente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cérebro, medula espinhal, olho, estômago, intestino, fígado, rins, suprarrenais, coração, baço, timo, traqueia e pulmões, vagina, bexiga, linfonodos, nervos periféricos e qualquer outro órgão-alvo conhecido.</li> </ul>

**Quadro 9.** Parâmetros de toxicidade avaliados na geração parental e filial.

	Exame em filhotes: ao serem encontrados mortos ou ao término do estudo (DPN 13) – análise de lesões visíveis e órgãos reprodutivos (verificação de sinais de desenvolvimento alterado).
<b>Histopatologia</b>	<p>Exame histopatológico completo nos órgãos preservados: grupos de maior dose e controle (ênfase nos estágios da espermatogênese e histopatologia da estrutura celular testicular intersticial);</p> <p>Exame de todas as lesões visíveis e de órgãos-alvo nos demais grupos de dose inferiores – determinação do NOAEL</p> <p>Exame dos tecidos e órgãos dos animais satélites, nos casos em que for observado efeito no grupo tratado correspondente.</p> <p>Exame histopatológico dos demais órgãos preservados, incluindo tireoide de filhotes e adultos, quando necessário.</p>

N: Número de animais; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; DL: Dia lactacional, DPN: Dia pós-natal.

### Critérios de aceitabilidade

Todas as considerações feitas no item 9.1.1 também são aplicáveis a esse estudo.

### Análise e interpretação dos resultados

Todas as considerações feitas no item 9.1.1 também são aplicáveis a esse estudo. No presente caso, particularmente, tendo em vista a dupla abordagem de avaliação (toxicidade para reprodução/desenvolvimento e toxicidade com dose repetida), os resultados permitirão a discriminação entre efeitos de reprodução/desenvolvimento que ocorrem na ausência de toxicidade sistêmica e aqueles que são expressos apenas em níveis também tóxicos para os animais parentais. Por essa razão, seus dados têm utilidade no esclarecimento da necessidade de condução de investigações adicionais, bem como no direcionamento do desenho experimental de estudos subsequentes.

## 9.2. ESTUDOS DE UMA GERAÇÃO ESTENDIDA OU DE DUAS GERAÇÕES

Os estudos de uma geração estendida ou de duas gerações incluem a exposição de ambos os sexos durante todas as fases da reprodução. Esse desenho experimental é capaz de fornecer uma avaliação completa dos animais F1, incluindo sua fertilidade e desempenho reprodutivo, o que não é avaliado nos estudos descritos anteriormente. Os animais F1 são únicos, uma vez que podem ser considerados equivalentes a um estudo de toxicidade por dose repetida com exposição intrauterina (OECD, 2008).

Ou seja, o objetivo desses estudos é examinar gerações sucessivas para identificar possíveis efeitos de uma ST na fertilidade de animais machos e fêmeas, bem como avaliar efeitos pré, peri e pós-natal no óvulo, embrião, feto e progênie (efeitos teratogênicos) e efeitos peri e pós-natal na mãe (OECD, 2008).

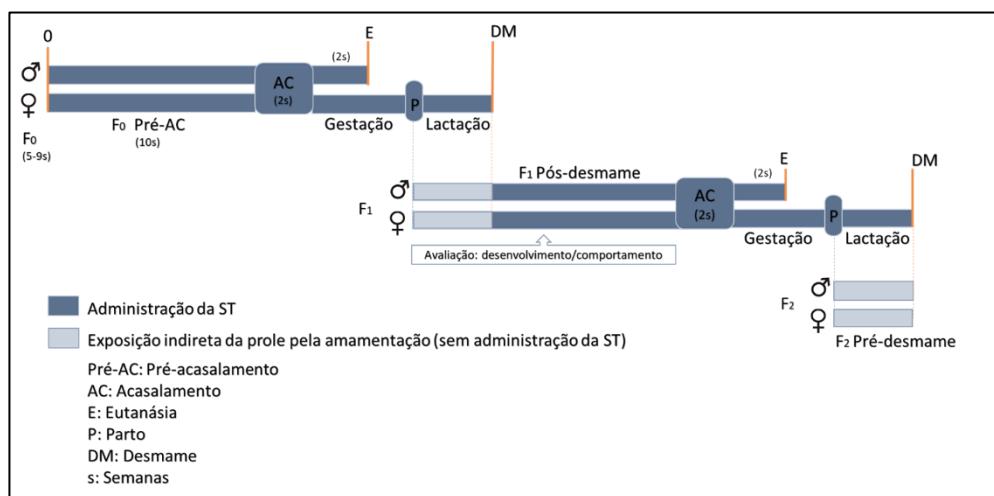
Ressalta-se que o estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida é mais sensível para a detecção de desfechos reprodutivos resultantes de desregulação endócrina, sendo atualmente preferível ao estudo de duas gerações. Espera-se que o estudo de uma geração estendida substitua o de duas gerações, já que ele exige um maior número de filhotes a serem testados, inclui desfechos sensíveis à desregulação endócrina como retenção de mamilos, avaliação obrigatória da DAG ao nascimento e análise de hormônios tireoidianos e de TSH, além de prever a inclusão de coortes para avaliação do desenvolvimento dos sistemas nervoso e imune. No entanto, se um estudo adequado de toxicidade reprodutiva de duas gerações estiver disponível, um estudo adicional de uma geração estendida pode não ser requerido, a depender do caso específico e/ou das exigências regulatórias (OECD, 2018). Na EChA, o estudo de uma geração estendida já substituiu o requerimento de um estudo de duas gerações (ECHA, 2023).

### 9.2.1. Estudo de toxicidade reprodutiva de duas gerações - Diretriz OECD 416

#### Considerações iniciais e limitações

Esse estudo é delineado para fornecer informações acerca dos efeitos de uma ST na integridade e no desempenho dos sistemas reprodutivos feminino e masculino, incluindo função das gônadas, ciclo estral, comportamento de acasalamento, concepção, gestação, parto, lactação e desmame. Além disso, nesse estudo também são avaliados parâmetros relacionados ao crescimento e desenvolvimento da prole – morbidade e mortalidade neonatal, dentre outros – de modo a fornecer dados preliminares sobre toxicidade para o desenvolvimento pré e pós-natal, a fim de direcionar análises subsequentes.

A partir desse estudo, podem ser estabelecidos os valores de NOAEL para toxicidade parental, para desfechos associados à reprodução, e para danos ao desenvolvimento da prole. O delineamento desse estudo está ilustrado na Figura 7.



**Figura 7.** Delineamento do estudo de toxicidade reprodutiva de duas gerações – Diretriz OECD 416.

#### Princípio do teste

A ST é administrada – em doses crescentes – a vários grupos de machos e fêmeas. Os machos da geração parental (P) devem ser expostos durante o crescimento e por, no mínimo, um ciclo espermatogênico completo (aproximadamente 56 dias no camundongo e 70 dias no rato), a fim de possibilitar a detecção de todos os possíveis efeitos adversos causados pela ST durante a espermatogênese. Por sua vez, as fêmeas da geração P devem ser expostas durante o crescimento e por vários ciclos estrais completos, como também durante o acasalamento, a prenhez/gestação e a lactação da prole F1. Após o desmame, a ST continua a ser administrada à geração F1 durante o seu crescimento e desenvolvimento até a fase adulta, incluindo as etapas de acasalamento e criação da geração F2, até que esta seja desmamada. Todos os animais são avaliados quanto aos desfechos de toxicidade reprodutiva, por meio de observações clínicas e exames histopatológicos.

## **Detalhamento do método**

Esse estudo deve ser conduzido preferencialmente em ratos e a utilização de outras espécies animais deve ser justificada e adaptada. Os animais experimentais devem ser caracterizados quanto a espécie, linhagem, fonte, sexo, peso e / ou idade.

Cada grupo tratado e controle deve conter um número suficiente de pares de acasalamento para produzir, preferencialmente, mais de 20 fêmeas prenhas por grupo de dose. Isso objetiva o alcance de um número suficiente de gestações para possibilitar uma avaliação significativa do potencial da ST de interferir na fertilidade, gestação e comportamento materno, como também no aleitamento, crescimento e desenvolvimento da prole F1 – desde a concepção até a vida adulta – e, posteriormente, no desenvolvimento da sua prole (F2) até o desmame. Caso o número desejável de 20 animais prenhes não seja alcançado, o estudo pode ainda ser considerado válido, mas isso é avaliado caso a caso.

Preferencialmente, a via de administração escolhida deve ser a oral (pela ingestão de alimentos/água ou gavagem), a menos que outra via, como a cutânea ou inalatória, seja considerada mais apropriada. Nesses casos, deve-se fornecer justificativa técnica e adotar as modificações necessárias. Deve-se utilizar, no mínimo, um controle concorrente e três níveis de dose, abrangendo desde a dose máxima tolerada (DMT) – a qual induz toxicidade sem causar morte ou sofrimento intenso dos animais – com reduções graduais, a intervalos de 2-4 vezes, até a obtenção de um NOAEL ou de doses próximas ao limite de detecção, as quais possibilitam determinar uma *Benchmark dose* (BMD). A seleção desses níveis de dose deve levar em consideração quaisquer dados de toxicidade existentes, em especial resultados de estudos com doses repetidas.

Vale ressaltar a possibilidade de adoção de um teste limite ao invés da condução de um estudo completo com três níveis de dose quando o estudo oral com dose de, no mínimo, 1000 mg/kg p.c./dia não causa efeitos tóxicos observáveis e não se espera toxicidade com base em estudos de substâncias estruturalmente semelhantes.

Com relação ao regime de exposição, a administração diária de machos e fêmeas parentais (P) deve ter início a partir de 5 a 9 semanas de idade; já para machos e fêmeas da geração F1, deve

começar no desmame. Para ambos os sexos (P e F1), a exposição deve ocorrer por, no mínimo, 10 semanas correspondentes ao período de pré-acasalamento. Deve-se dar continuidade a essa exposição pelas 2 semanas subsequentes de acasalamento. Após esse período, os machos são eutanasiados, enquanto as fêmeas (P) permanecem com o regime de administração durante a gestação e lactação, até o desmame da prole F1. As modificações nesse esquema de dosagem devem ser efetuadas com base em informações disponíveis sobre a ST, incluindo dados existentes acerca de toxicidade, indução de metabolismo e/ou bioacumulação.

Quanto ao esquema de acasalamento, o Quadro 10 resume as principais orientações para os acasalamentos de cada geração.

**Quadro 10.** Orientações gerais para a execução do acasalamento nas gerações parental (P) e filial (F1).

GERAÇÃO	PROCEDIMENTO	OBSERVAÇÃO
<b>Acasalamento P</b>	Cada fêmea deve ser pareada com um único macho do mesmo nível de dose, até a cópula ou após decorridas 2 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Define-se como DG 0 (dia gestacional zero) aquele em que se encontra o tampão vaginal.</li> <li>Evitar o acasalamento entre animais com grau de parentesco;</li> <li>Acasalar animais tratados com a mesma dose.</li> </ul>
<b>Acasalamento F1</b>	Após atingida a maturidade sexual, deve-se selecionar, pelo menos, um macho e uma fêmea de cada ninhada para acasalar com animais de diferentes ninhadas, mas mesmo nível de dose, para produzir a geração F2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acasalar novamente para produzir uma segunda ninhada nos casos de alterações no tamanho da ninhada relacionadas ao tratamento ou de observação de um efeito equívoco no primeiro acasalamento.</li> <li>Avaliar pares sem progênie para determinar a causa aparente da infertilidade, por meio de: novo acasalamento com outros machos e fêmeas; exame microscópico dos órgãos reprodutivos e avaliação dos ciclos estrais e/ou espermatogênese.</li> </ul>

Na etapa de avaliação dos animais, os seguintes aspectos devem ser incluídos: observação clínica, peso corporal e consumo de água/alimento dos animais P, ciclo estral, parâmetros espermáticos, prole, necropsia, peso dos órgãos, histopatologia e parâmetros em animais pós-desmame. O Quadro 11 resume as informações principais de cada um desses aspectos a serem avaliados.

**Quadro 11.** Parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados na geração parental (P) e filial (F1).

PARÂMETRO	DETALHAMENTO DA ANÁLISE
<b>Observação clínica</b>	Avaliação geral diária, inclusive com dados de morbimortalidade.

**Quadro 11.** Parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados na geração parental (P) e filial (F1).

	Registro de alterações comportamentais, sinais de parto difícil ou prolongado e todos os sinais de toxicidade.
<b>Peso corporal e consumo de água/alimento dos animais parentais (P e F1)</b>	<p>Pesagem no primeiro dia de administração e com frequência semanal.</p> <p>Pesagem de ♀: no mínimo, nos DG 0, 7, 14 e 20 ou 21; e durante a lactação, nos mesmos dias de pesagem das ninhadas e no dia da eutanásia.</p> <p>Medição semanal do consumo de água/alimentos.</p>
<b>Ciclo estral (fêmeas P e F1)</b>	Avaliação da duração e normalidade do ciclo estral por meio de esfregaços vaginais antes e durante o acasalamento, até que evidências de espermatozoides sejam encontradas.
<b>Parâmetros espermáticos</b>	<p>Registro do peso dos testículos e do epidídimos, com posterior análise histopatológica (P e F1).</p> <p>Realização de contagem do número total de espermátides resistentes à homogeneização; e de coleta, contagem, avaliação da motilidade e morfologia de espermatozoides no epidídimos caudal; em um subgrupo de, no mínimo, 10♂/ grupo (P e F1).</p> <p>Todos as análises supracitadas podem ser conduzidas somente nos grupos P e F1 controle e tratados com a maior dose. Em caso de efeitos relacionados ao tratamento ou quando existirem evidências provenientes de outros estudos quanto a possíveis efeitos na espermatogênese, deve-se avaliar os demais grupos tratados.</p>
<b>Prole</b>	<p>Análise de cada ninhada no DL 0 – número e sexo de filhotes, natimortos, nascidos vivos e presença de anormalidades visíveis.</p> <p>Pesagem dos filhotes vivos no DL 0, 4, 7, 14 e 21.</p> <p>Registro de anormalidades físicas ou comportamentais nas mães e na prole.</p> <p>Registro do desenvolvimento físico da prole principalmente pelo ganho de peso corporal.</p> <p>Investigações de parâmetros funcionais (atividade motora, função sensorial, ontogenia de reflexos) da prole F1 antes e/ou após o desmame, particularmente quando relacionados à maturação sexual.</p> <p>Determinação da idade de abertura vaginal e separação prepucial em animais F1 selecionados para acasalamento.</p> <p>Medição da DAG no DPN 0 em filhotes F2, se desencadeada por alterações na razão entre os sexos ou no tempo de maturação sexual (prole F1).</p>
<b>Necropsia</b>	<p>Exame macroscópico quanto a anormalidades estruturais ou alterações patológicas de todos os animais parentais (P e F1), todos os filhotes com anormalidades visíveis ou sinais clínicos e, no mínimo, um filhote/sexo/ninhada de F1 e F2, selecionados aleatoriamente.</p> <p>Exame do útero das fêmeas primíparas quanto à presença e número de sítios de implantação.</p>
<b>Peso dos órgãos</b>	<p>Verificação do peso corporal e do peso dos seguintes órgãos de todos os animais parentais (P e F1):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Útero, ovários;</li> <li>• Testículos, epidídimos (total e caudal);</li> <li>• Próstata;</li> </ul>

**Quadro 11.** Parâmetros de toxicidade reprodutiva avaliados na geração parental (P) e filial (F1).

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vesículas seminais com glândulas coagulantes e seus fluidos (como uma unidade);</li> <li>• Cérebro, fígado, rins, baço, hipófise, tireoide, glândulas suprarrenais e órgãos-alvo conhecidos.</li> </ul> <p>Determinação dos pesos corporais de filhotes F1 e F2 selecionados para necropsia; e dos pesos do cérebro, baço e timo de um filhote/sexo/ninhada, selecionado aleatoriamente.</p>
<b>Histopatologia</b>	<p>Coleta, fixação e armazenamento dos seguintes órgãos e tecidos de animais parentais (P e F1):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vagina, útero com colo do útero e ovários;</li> <li>• Um testículo, um epidídimos, vesículas seminais, próstata e glândula coagulante;</li> <li>• Órgão (s) alvo (s) previamente identificado (s) de todos os animais P e F1 selecionados para acasalamento.</li> </ul> <p>Exame histopatológico completo - grupos de maior dose e controle selecionados para acasalamento.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação minuciosa dos testículos (detecção de espermátides retidas; de perda de camadas de células germinativas; de células gigantes multinucleadas ou descamação de células germinativas para o lúmen);</li> <li>• Avaliação minuciosa dos ovários (contagem dos folículos primordiais, combinados com folículos menores, para comparação de ovários tratados x controle).</li> </ul> <p>Exame dos órgãos com alterações relacionadas ao tratamento – grupos de dose baixa e média, como auxiliar na determinação do NOAEL.</p> <p>Exame dos órgãos reprodutivos dos animais de dose baixa e média suspeitos de fertilidade reduzida (dificuldade em acasalar, gerar prole saudável ou qualquer outra alteração no ciclo estral/parâmetros espermáticos).</p> <p>Exame de todas as lesões visíveis, como atrofia ou tumores.</p>
<b>Animais pós-desmame</b>	<p>Caracterização histopatológica completa – com ênfase nos órgãos do sistema reprodutivo - de todos os filhotes com anormalidades visíveis ou sinais clínicos, bem como de, no mínimo, um filhote/sexo/ninhada (F1 e F2) que não tenham sido selecionados para acasalamento.</p>

DG: Dia gestacional; DL: Dia lactacional; DAG: Distância anogenital; DPN: Dia pós-natal.

### Critérios de aceitabilidade

Considerando-se que esse estudo deve fornecer informações sobre os efeitos de exposição repetida à ST durante todas as fases do ciclo reprodutivo, deve-se seguir adequadamente o regime de doses, os períodos de exposição e os procedimentos de acasalamento, conforme detalhados na seção anterior.

Deve-se informar, para cada grupo de cada geração: número de animais no início do estudo; número de animais encontrados mortos durante o estudo ou eutanasiados, com a respectiva data de ocorrência; número de animais férteis; número de fêmeas gestantes; número de animais com sinais de toxicidade, com descrição detalhada desses sinais, incluindo tempo de início, duração e gravidade;

tipos e alterações histopatológicas e todos os dados relevantes da ninhada. O relatório deve incluir informações suficientes sobre o método e o software empregado na análise estatística dos dados.

## Análise e interpretação dos resultados

A avaliação dos dados fornecidos por esse estudo incluirá a relação entre a exposição à ST e a presença ou ausência, incidência e gravidade das alterações observadas, incluindo lesões graves, órgãos-alvo identificados, fertilidade afetada, anormalidades clínicas, baixo desempenho reprodutivo da ninhada, alterações no peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos.

Cabe ressaltar que o estudo, se conduzido adequadamente, deve fornecer uma estimativa de valor de NOAEL, bem como um entendimento satisfatório dos efeitos adversos na reprodução, parto, lactação e desenvolvimento pós-natal, incluindo crescimento e desenvolvimento sexual.

Os resultados do estudo devem ser interpretados em conjunto com as evidências de estudos subcrônicos, toxicocinéticos e de desenvolvimento pré-natal, como também de outros estudos disponíveis. Esses resultados podem frequentemente ser usados para avaliar a necessidade de mais ensaios a serem conduzidos com a ST e para determinação de NOAEL e derivação de doses de referência humanas.

### **9.2.2. Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida – Diretriz OECD 443**

#### **Considerações iniciais e limitações**

O principal objetivo desse estudo é avaliar estágios de vida específicos – não englobados no desenho experimental de outros tipos de estudos de toxicidade – com relação aos efeitos resultantes da exposição pré e pós-natal a uma ST. Ele engloba três coortes de animais F1:

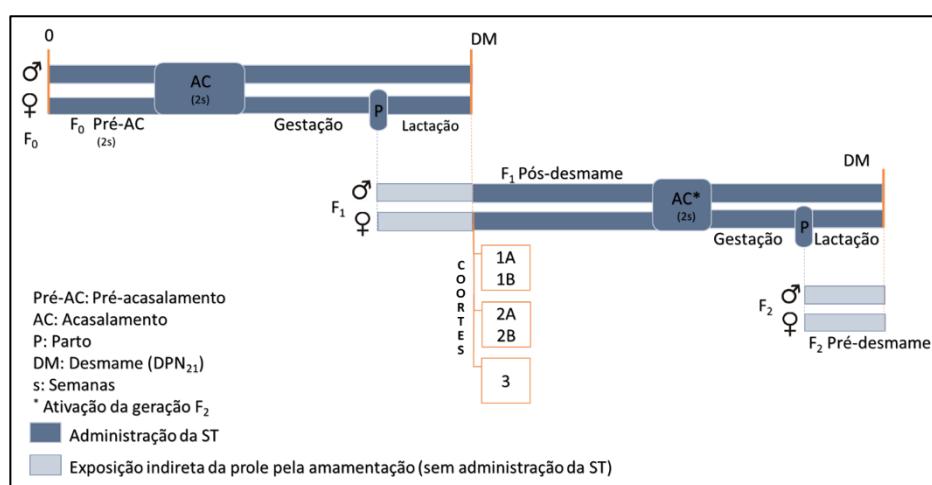
- Coorte 1 – Avalia desfechos de reprodução e desenvolvimento. Pode ser estendida para incluir uma geração F2.
- Coorte 2 – Avalia desfechos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso.
- Coorte 3 – Avalia desfechos relacionados ao desenvolvimento do sistema imunológico.

Esse estudo utiliza menos animais que o estudo de toxicidade para a reprodução de duas gerações quando a geração F2 é omitida, enquanto aumenta o número de filhotes da geração F1 estudados, bem como o número de desfechos analisados. A inclusão de uma geração F2 pode ser desencadeada, a depender dos resultados obtidos na geração F1. O direcionamento quanto à avaliação da geração F2 e à omissão das coortes de neurotoxicidade e de imunotoxicidade do desenvolvimento deve ser avaliado caso a caso e se embasar no conhecimento existente sobre a ST e na finalidade regulatória.

Então, o estudo de TR por uma geração estendida foi delineado para fornecer dados acerca do (a):

- I- Desenvolvimento da prole, com análise de parâmetros como: viabilidade, saúde neonatal, desenvolvimento físico e funcional até a idade adulta, com a identificação de órgãos-alvo específicos;
- II- Integridade e desempenho dos sistemas reprodutivos masculinos e femininos adultos, com análise de parâmetros chave como: funcionalidade das gônadas, ciclo estral, maturação de espermatozoides no epidídimos, comportamento de acasalamento, concepção, gestação, parto e lactação.

Os dados fornecidos a partir desse estudo podem ser usados no estabelecimento dos valores de NOAEL, LOAEL e/ou BMD para os vários desfechos avaliados (toxicidade parental, reprodutiva e para o desenvolvimento). Ainda, podem ser usados na caracterização dos efeitos detectados em outros estudos de doses repetidas e/ou servirem como guia para estudos subsequentes. O delineamento desse estudo está ilustrado na Figura 8.



### Princípio do teste

A ST é administrada continuamente – em doses crescentes – a vários grupos de machos e fêmeas. A geração parental (P) deve ser exposta por um período prévio ao acasalamento – definido com base em informações disponíveis sobre a ST, mas não inferior a duas semanas – e por um período de acasalamento de duas semanas. Os machos P devem continuar sendo expostos, ao menos até o desmame da geração F1, o que deve totalizar, no mínimo, 10 semanas. As fêmeas P devem ser expostas continuamente durante a gestação e lactação, até o desmame das suas ninhadas (ou seja, 8 a 10 semanas de tratamento). Já a geração filial F1 deve receber exposição adicional do desmame à idade adulta. Caso seja desencadeada a geração F2, a exposição dos animais F1 deve ser mantida até o desmame da prole F2 ou até o término do estudo.

Após o desmame, deve-se proceder com a subdivisão da prole para integrar as coortes de 1-3 supracitadas. Observações clínicas e exames histopatológicos devem ser realizados em todos os animais.

### Detalhamento do método

Esse estudo deve ser conduzido preferencialmente em ratos. A utilização de outras espécies animais deve ser justificada e o protocolo devidamente adaptado. No início da exposição, os animais P devem ser sexualmente maduros, com peso (mesmo sexo) e idade semelhantes (aproximadamente 90 dias) no momento do acasalamento. Cada grupo tratado e o controle deve conter um número suficiente de pares de acasalamento para resultar, preferencialmente, em mais de 20 fêmeas prenhas por grupo. Isso objetiva o alcance de um número suficiente de gestações para possibilitar uma avaliação significativa do potencial da ST de interferir na fertilidade, gestação e comportamento materno, como também no aleitamento, crescimento e desenvolvimento da prole F1, desde a concepção até a vida adulta. Caso o número desejável de 20 animais prenhas não seja alcançado, o estudo pode ainda ser válido, mas isso deve ser avaliado caso a caso, considerando uma possível relação causal com a ST.

A escolha da via de administração deve considerar a via mais relevante para a exposição humana. Assim, embora o protocolo padrão desse estudo estabeleça a exposição oral pela dieta, a ST pode ser administrada na água de consumo, por gavagem, ou ainda pelas vias inalatória e dérmica, a depender das características da ST e das informações necessárias para o estudo.

Quanto à seleção de doses, deve-se utilizar, no mínimo, um controle concorrente e três níveis de dose. Nesse processo, deve-se considerar todas as informações disponíveis, incluindo estudos de dose anteriores, dados de toxicocinética de animais prenhas e não prenhas, grau de exposição da prole pelo leite materno e estimativas de exposição humana. Caso os dados de toxicocinética indiquem saturação dose-dependente, deve-se evitar a seleção de doses elevadas associadas a essa saturação, desde que a exposição humana ocorra abaixo desse nível. Nesses casos, a dosagem mais elevada deverá ser igual ou ligeiramente superior ao ponto de inflexão na transição para um comportamento toxicocinético não-linear. Na ausência desses dados, os níveis de dose devem ser selecionados com base em efeitos tóxicos, abrangendo desde a dose máxima tolerada (DMT) – a qual induz toxicidade sistêmica sem causar morte ou sofrimento intenso dos animais – com reduções graduais, a intervalos de 2-4 vezes, até a obtenção de um NOAEL ou de doses próximas ao limite de detecção, o que permitiria a derivação de uma BMD para o desfecho mais sensível.

Vale ressaltar a possibilidade de adoção de um teste limite ao invés da condução de um estudo completo com três níveis de dose quando o estudo oral com dose de, no mínimo, 1000 mg/kg p.c./dia não causa efeitos tóxicos observáveis e não se espera toxicidade com base em estudos de substâncias estruturalmente semelhantes. Nesses casos, o presente estudo pode ser conduzido apenas com um grupo controle e um grupo tratado na dose limite. No entanto, em caso de evidências de toxicidade reprodutiva ou para o desenvolvimento nessa dose, deve-se conduzir estudos adicionais com níveis de dose mais baixos, a fim de se determinar um NOAEL. Essas considerações sobre o teste limite se aplicam apenas quando a exposição humana sabidamente ocorre em níveis inferiores à dose limite estabelecida.

Com relação ao regime de exposição, machos e fêmeas parentais devem ser expostos por duas semanas no período de pré-acasalamento, tempo suficientemente longo para se atingir um platô

na exposição e possibilitar a interferência da ST no comportamento de acasalamento e fertilização. A exposição deve continuar, diariamente, pelas duas semanas seguintes, correspondentes ao período de acasalamento e, para fêmeas P, durante toda a gestação e lactação, até o término do estudo, após o desmame da prole F1. Machos também devem ser expostos pelo mesmo método de administração até o desmame de F1.

Quanto ao acasalamento, cada fêmea P deve ser pareada com um único macho – aleatoriamente selecionado, sem grau de parentesco e do mesmo nível de dose – até que a cópula seja evidenciada ou após o intervalo de duas semanas. Define-se como DG 0 aquele em que se encontra um tampão vaginal ou a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. Deve-se ajustar o tamanho da ninhada no DPN 4, por meio da eliminação aleatória de filhotes extras, a fim de se obter cinco machos e cinco fêmeas por ninhada, sempre que possível. Posteriormente, no desmame de F1 (DPN 21), os filhotes devem ser aleatoriamente subdivididos para compor as três coortes de análises, conforme detalhado no Quadro 12.

**Quadro 12.** Subdivisão dos animais da geração F1 para as análises dos parâmetros de TR.

COORTES	PARÂMETROS AVALIADOS	
<b>Coorte 1: toxicidade para a reprodução/ desenvolvimento</b>	<b>Coorte 1A</b> 1♂ e 1♀/ninhada/grupo (20/sexo/grupo)	Avaliação dos efeitos no sistema reprodutivo e de toxicidade geral.
	<b>Coorte 1B</b> 1♂ e 1♀/ninhada/grupo (20/sexo/grupo)	Avaliação de acompanhamento do desempenho reprodutivo de animais F1, quando desencadeada uma 2ª geração.  Obtenção de dados histopatológicos adicionais, em casos de suspeita de TR ou endócrina ou quando os resultados da coorte 1A forem equívocos.
<b>Coorte 2: neurotoxicidade para o desenvolvimento</b>	<b>Coorte 2A</b> 10♂ e 10♀/grupo (20 filhotes/grupo; 1♂ ou 1♀/ninhada):	Testes neurocomportamentais: Reflexo auditivo de sobressalto (DPN 24 ± 1 dia), bateria de observação funcional (entre DPN 63 e DPN 75), atividade motora.  Eutanásia, perfusão, fixação, coleta e pesagem do cérebro para posterior neurohistopatologia (DPN 75-90).
	<b>Coorte 2B</b> 10♂ e 10♀/grupo (20 filhotes/grupo; 1♂ ou 1♀/ninhada):	Avaliação neurohistopatológica no desmame (DPN 21 ou 22). Em caso de nº insuficiente de animais, deve-se dar preferência à coorte 2A.
<b>Coorte 3: imunotoxicidade para o desenvolvimento</b>	10♂ e 10♀/grupo (20 filhotes/grupo; um por ninhada, quando possível).	

**Quadro 12.** Subdivisão dos animais da geração F1 para as análises dos parâmetros de TR.

	Análise de subpopulação de linfócitos esplênicos, peso e histopatologia de linfonodos, resposta primária de anticorpos IgM a um antígeno dependente de células T.
--	---

Caso haja um número insuficiente de filhotes em uma ninhada para servir a todas as coortes, deve-se priorizar a coorte 1, uma vez que há a possibilidade de estendê-la para produzir uma geração F2. Os filhotes não designados para coortes devem ser submetidos a análises bioquímicas e necrópsia. Se houver necessidade de verificação ou elucidação de um efeito em fêmeas expostas, a opção mais adequada é a extensão do estudo para inclusão de um acasalamento na geração F1. No entanto, um segundo acasalamento de machos P com fêmeas não tratadas também é uma opção para esclarecer evidências ambíguas ou para caracterização adicional dos efeitos sobre a fertilidade observados no primeiro acasalamento.

Os parâmetros gerais relevantes para a análise inicial ou periódica (geração parental e filial) referente às três coortes supracitadas são resumidos no Quadro 13.

**Quadro 13.** Detalhamento dos parâmetros gerais para a avaliação inicial e periódica dos animais das gerações P e F1.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO
<b>Observação clínica</b>	Mudanças comportamentais, sinais de parto difícil ou prolongado, sinais de toxicidade e avaliação de morbimortalidade; alterações na pele, pelo, olhos, mucosas, ocorrência de secreções e excreções e atividade autonômica (por exemplo, lacrimação, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório incomum).
<b>Peso corporal e consumo de água/alimento dos animais parentais (P e F1)</b>	Animais P: Pesagem no primeiro dia de administração e com frequência semanal; Animais F1: Pesagem no desmame (DPN 21), seguido de frequência semanal; pesagem ao atingir a puberdade e na eutanásia; Medição semanal do consumo de água/alimentos.
<b>Ciclo estral (P e F1)</b>	Fêmeas P: Avaliação por citologia vaginal do início do tratamento até a confirmação do acasalamento ou até o término de duas semanas.  Fêmeas F1: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Coorte 1A: Exame diário do esfregaço vaginal desde a abertura vaginal até a verificação de células cornificadas no esfregaço (registro do intervalo de tempo entre esses eventos); Monitoramento adicional dos ciclos estrais por duas semanas, começando em torno de DPN 75.</li> <li>• Coorte 1B: Caso o acasalamento da geração F1 seja necessário, a citologia vaginal dessa coorte será efetuada do início do pareamento até a confirmação do acasalamento.</li> </ul>
<b>Acasalamento e gestação</b>	Registro das datas do pareamento, da fertilização e do parto, possibilitando os cálculos de: intervalo pré-coito (pareamento à fertilização) e duração da gestação (fertilização ao parto).  Exame das fêmeas P no momento do parto para detectar qualquer sinal de distocia, além de anormalidades no comportamento maternal.
<b>Prole</b>	Análise de cada ninhada no DPN 0 ou 1 – nº e sexo de filhotes, natimortos, nascidos vivos; presença de anormalidades visíveis (fenda palatina, hemorragias

**Quadro 13.** Detalhamento dos parâmetros gerais para a avaliação inicial e periódica dos animais das gerações P e F1.

	<p>subcutâneas; cor ou textura anormal da pele; presença de cordão umbilical; ausência de leite no estômago; presença de secreções secas); temperatura corporal, estado de atividade e resposta ao manuseio.</p> <p>Contagem e pesagem dos filhotes vivos no DPN 0 ou 1 e, posteriormente, p. ex. nos DPN 4, 7, 14 e 21.</p> <p>Exames clínicos periódicos: anormalidades visíveis, alterações na pele, pelos, olhos, mucosas, ocorrência de secreções e excreções e atividade autonômica; alterações na marcha, postura, resposta ao manuseio, presença de movimentos clônicos ou tónicos, comportamento estereotípado.</p> <p>Medição da DAG de todos os filhotes, no mínimo uma vez, até o DPN 4.</p> <p>Verificação de maturação sexual precoce (análise de abertura vaginal e separação prepucial) em todos os animais F1 selecionados.</p> <p>Verificação da presença mamilos/aréolas em filhotes machos no DPN 12 ou 13.</p>
--	---

O Quadro 14 detalha os parâmetros a serem avaliados ao término do estudo – no momento da eutanásia – referente às três coortes supracitadas.

**Quadro 14.** Detalhamento dos parâmetros específicos para a avaliação final – término do estudo.

PARÂMETRO	GERAÇÃO/GRUPO	DETALHAMENTO
<b>Dosagens bioquímicas/ hematologia</b>	Animais P e F1 (coorte 1A): 10♂ e 10♀/grupo tratado	Avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos, dosagens de T4 e TSH e uranálise.
<b>Parâmetros espermáticos</b>	Machos P e F1 (coorte 1A)	<p>Registro do peso dos testículos e do epidídimos, com posterior análise histopatológica.</p> <p>Realização de coleta, contagem e avaliação da motilidade e morfologia dos espermatozoides retidos no epidídimos caudal.</p> <p>Pode-se conduzir as análises somente nos grupos P e F1 controle e tratados com a maior dose. Em caso de efeitos relacionados ao tratamento, os demais grupos tratados também devem ser avaliados.</p>
<b>Necropsia</b>	Animais P e F1	<p>Exame macroscópico quanto a anormalidades estruturais ou alterações patológicas, com ênfase nos órgãos do sistema reprodutivo.</p> <p>Determinação do estágio do ciclo estral, por meio de esfregaço vaginal, para correlacionar com achados histopatológicos.</p> <p>Exame do útero quanto a presença e número de sítios de implantação.</p>
<b>Pesagem dos órgãos</b>	Animais P e F1 adultos	Verificação do peso corporal e do peso dos seguintes órgãos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Útero, ovários;</li> <li>• Testículo, epidídimos;</li> <li>• Próstata;</li> </ul>

**Quadro 14.** Detalhamento dos parâmetros específicos para a avaliação final – término do estudo.

Histopatologia		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vesículas seminais com glândulas coagulantes e seus fluidos (como uma unidade);</li> <li>• Cérebro, fígado, rins, coração, baço, timo, hipófise, tireoide e glândulas suprarrenais e órgãos-alvo conhecidos.</li> </ul> <p>Detalhe para coorte 1A:</p> <p>Investigação adicional de efeitos imunotóxicos (10♂ e 10♀/grupo, sendo 1♂ ou 1♀/ninhada): pesagem de linfonodos; análise de subpopulação de linfócitos esplênicos.</p>
	Animais F1 no desmame (animais não selecionados para as coortes e eutanasiados ao desmame – DPN 22)	Pesagem e conservação do cérebro, baço, timo, tecidos mamários e outros com anormalidades ou considerados alvos da ST; para posterior histologia – até 10 filhotes/sexo/grupo, do maior número de ninhadas possível.
	Animais P	<p>Exame histopatológico completo – grupos de maior dose e controle.</p> <p>Exame dos órgãos com alterações relacionadas ao tratamento – grupos de dose baixa e média, como auxiliar na determinação do NOAEL.</p> <p>Exame dos órgãos reprodutivos dos animais com suspeita de fertilidade reduzida (dificuldade em acasalar, gerar prole saudável ou qualquer outra alteração no ciclo estral ou parâmetros espermáticos).</p>
	Animais F1: Coorte 1	<p>Exame histopatológico completo – grupos de maior dose e controle:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação minuciosa dos testículos – efeitos na diferenciação e desenvolvimento testicular e na espermatogênese;</li> </ul> <p>Avaliação minuciosa dos ovários – contagem dos folículos primordiais, combinados com folículos menores, para comparação de ovários tratados x controle; análise do oviduto, útero e vagina.</p>
	Animais F1: Coorte 2A (DPN 75-90)  Coorte 2B (DPN 21 ou 22)	<p>Análise dos órgãos com alterações relacionadas ao tratamento e de todas as lesões visíveis – grupos de dose baixa e média, como auxiliar na determinação do NOAEL.</p> <p>Análise adicional dos linfonodos e medula óssea (10♂ e 10♀ - coorte 1A).</p> <p>Animais da coorte 1B devem ser analisados se os resultados da coorte 1A forem equívocos ou nos casos de suspeita de TR ou endócrina.</p>

**Quadro 14.** Detalhamento dos parâmetros específicos para a avaliação final – término do estudo.

	<p>Animais F1: Coorte 2A (DPN 75-90) Coorte 2B (DPN 21 ou 22)</p>	<p>Grupos de maior dose e controle: Análise de secções cerebrais (bulbos olfativos, córtex cerebral, hipocampo, gânglios da base, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, tronco cerebral e cerebelo).</p> <p>Somente coorte 2A: Análise de olhos (retina e nervo óptico) e amostras do nervo periférico, músculo e medula espinhal.</p> <p>Análise de órgãos/tecidos com alterações relacionadas ao tratamento – grupos de dose baixa e média, como auxiliar na determinação do NOAEL.</p> <p>Morfometria: seleção da secção mais homóloga e representativa da área cerebral de interesse; estereologia – avaliação de parâmetros como volume ou número de células para regiões neuroanatômicas específicas.</p>
--	---	--

Caso seja necessário, pode-se dar continuidade à avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva, com o seguinte procedimento: manutenção da administração da ST aos animais da coorte 1B, além do DPN 90, a fim de se obter uma geração F2. Para isso, machos e fêmeas do mesmo nível de dose devem ser pareados por até duas semanas, iniciando em ou após o DPN 90, mas não excedendo o DPN 120. A decisão quanto à criação de uma segunda geração é tomada de acordo com a avaliação de critérios pré-determinados da geração parental (ciclo estral e fertilidade) e da geração filial (DAG, retenção de mamilos, abertura vaginal, descolamento do prepúcio e ciclo estral). Beekhuijzen e colaboradores (2009) propõem que uma segunda geração deve ser conduzida se houver ambiguidade nos dados da geração F1, já que o valor adicional de um segundo acasalamento é justamente detectar efeitos que ocorrem em baixa frequência ou que são menos robustos.

### **Critérios de aceitabilidade**

Considerando-se que esse estudo deve fornecer informações sobre os efeitos de exposição repetida à substância teste durante todas as fases do ciclo reprodutivo da geração parental, bem como durante o desenvolvimento pré e pós-natal até a vida adulta da(s) geração (ões) filial (ais), deve-se seguir adequadamente o regime de doses, os períodos de exposição e os procedimentos de acasalamento, conforme detalhados na seção anterior.

No relatório do estudo, deve-se informar, para cada grupo de cada geração: número de animais no início do estudo; número de animais encontrados mortos durante o estudo ou eutanasiados, com a respectiva data de ocorrência; número de animais férteis; número de fêmeas prenhas e daquelas que efetivamente pariram; número de animais com sinais de toxicidade, com descrição detalhada desses sinais, incluindo tempo de início, duração e gravidade; tipos de alterações histopatológicas e todos os

dados relevantes da ninhada. O relatório deve incluir informações suficientes sobre o método e o software empregado na análise estatística dos dados.

### **Análise e interpretação dos resultados**

A avaliação dos dados fornecidos por esse estudo incluirá a relação entre a exposição à ST e a presença ou ausência, incidência e gravidade das alterações observadas, incluindo lesões visíveis, órgãos-alvo identificados, fertilidade afetada, anormalidades clínicas, baixo desempenho reprodutivo da ninhada, alterações no peso corporal, efeitos na mortalidade e quaisquer outros efeitos tóxicos e para o desenvolvimento.

Cabe ressaltar que o estudo, se conduzido adequadamente, deve fornecer uma estimativa de valor de NOAEL, bem como um entendimento satisfatório dos efeitos adversos da ST na reprodução da geração P, bem como no desenvolvimento, crescimento, sobrevivência e desfechos funcionais da prole até o DPN 90.

Os resultados do estudo devem ser interpretados em conjunto com os dados disponíveis da ST, tais como: propriedades físico-químicas, dados de compostos estruturalmente análogos, achados provenientes de estudos de toxicocinética (com foco na transferência placentária e excreção via lactação) e toxicodinâmica; e dados de estudos de toxicidade prévios. Esses resultados podem ainda ser usados para avaliar a necessidade de mais ensaios a serem conduzidos com a ST.

Especificamente quanto à coorte 2, os achados neurocomportamentais e/ou neuropatológicos e a relação entre eles, bem como efeitos dose-dependentes; devem ser interpretados em uma análise global do estudo, por meio de uma abordagem de peso de evidência. A discussão desses dados deve ser feita em termos de significância biológica e estatística.

É importante mencionar que, em uma análise da EChA (2023) de 55 estudos de uma geração estendida, foram verificados diversos problemas metodológicos no desenho, condução e relato desse teste. Entre esses estavam a alta variabilidade dos resultados e ausência de dados de controle positivo e controle histórico para investigações obrigatórias, incluindo as coortes de neurodesenvolvimento e de imunotoxicidade, o que muitas vezes comprometeu a interpretação dos resultados (muitos estudos considerados inconclusivos). Outras deficiências metodológicas comuns encontradas incluíram a análise estatística inadequada (ex: não consideração do sexo), a ausência de investigação ou investigação inadequada de parâmetros obrigatórios (ex: subpopulação esplênica, maturação sexual, hormônios tireoidianos, contagem de folículos ovarianos) e a descrição insuficiente das metodologias utilizadas (ex: contagem de folículos ovarianos, critérios para categorização dos ciclos estrais).

#### **9.2.3. Interpretação geral dos dados obtidos nos estudos multigeracionais (Diretrizes OECD 416 e 443)**

A partir da interpretação do conjunto de dados obtidos nos estudos acima descritos, em associação às informações disponíveis em outras categorias de estudo, pode-se chegar às conclusões abaixo detalhadas, quanto ao potencial de TR da ST em questão (OECD, 2008).

#### **9.2.3.1. Efeitos adversos na reprodução/ fertilidade**

- Resultado positivo: quando houver evidência clara dos efeitos adversos na reprodução/fertilidade em animais, estudos adicionais podem não ser necessários para a caracterização do perigo. No entanto, outros estudos podem ser importantes para fornecer informações sobre a relação dose-efeito e a relevância para os seres humanos.
- Resultado equívoco: evidências equívocas podem indicar a necessidade de estudos mecanísticos ou de outros estudos com um desenho modificado. O estudo deve ser delineado visando esclarecer se um efeito é mediado pelo macho ou pela fêmea ou causado por toxicidade sistêmica. No contexto regulatório, tendo em vista que a classificação do perigo é obtida com base nos estudos disponíveis no momento da análise, resultados equívocos irão resultar na classificação da ST na categoria 1B, a menos que tenham sido apresentados estudos adicionais capazes de reduzir o nível de preocupação das evidências verificadas.
- Resultado negativo: Se houver evidência clara da ausência de efeitos adversos na reprodução/ fertilidade masculina e feminina, normalmente não são necessários estudos adicionais e a ST não é classificada quanto à TR. No entanto, essa conclusão deve ser obtida a partir de dados suficientes que garantam uma adequada absorção e biodisponibilidade da ST.

#### **9.2.3.2. Efeitos adversos no desenvolvimento intrauterino**

- Resultado positivo: Evidência clara de efeitos adversos (tamanho reduzido da ninhada, ocorrência de natimorto, teratogenicidade, morte pós-natal ou anomalias funcionais), normalmente serão suficientes para fins de classificação do perigo na categoria 1B. No entanto, dados adicionais de toxicodinâmica e/ou toxicocinética podem ser úteis para entender a relevância para os seres humanos.
- Resultado equívoco: Evidências equívocas podem ser investigadas em estudos de toxicidade no desenvolvimento pré-natal ou de neurotoxicidade no desenvolvimento.
- Resultado negativo: os estudos geracionais têm limitações na detecção de efeitos adversos no desenvolvimento. Portanto, a ausência de evidências pode não ser suficiente para excluir a possibilidade de toxicidade para o desenvolvimento.

Um maior detalhamento acerca da análise e interpretação dos resultados obtidos nessa categoria de estudo pode ser verificado no item 9.

### **9.3. ESTUDOS QUE AVALIAM A TOXICIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO**

Esse item inclui dois estudos que avaliam desfechos relacionados à toxicidade para o desenvolvimento. O primeiro deles é o Estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal (Diretriz OECD 414), o qual avalia a toxicidade embriofetal como consequência da exposição intrauterina à ST. Ou seja, são avaliados apenas os efeitos manifestados antes do nascimento, com foco no atraso de crescimento, anormalidades estruturais e letalidade.

O segundo é o Estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento (*Developmental neurotoxicity – DNT*) (Diretriz OECD 426), o qual é delineado para fornecer informações acerca do potencial de ocorrência de efeitos morfológicos e funcionais para o sistema nervoso da prole, decorrentes da exposição materna à ST, durante a gestação e a lactação. Alguns critérios adotados para direcionar determinados compostos químicos à condução de estudos de DNT são: agentes associados à ocorrência de malformações no SNC, compostos psicoativos e/ou que causam neurotoxicidade em adultos, agentes que promovem alterações hormonais e produtos químicos estruturalmente relacionados a outros que causam DNT ou para os quais se espera ampla exposição (USEPA, 1991).

Os estudos de DNT investigam alterações no comportamento devido a efeitos no SNC e SNP. É importante ressaltar que nenhum teste isolado é capaz de refletir toda a complexidade de um efeito comportamental. Por essa razão, faz-se necessário avaliar uma série de parâmetros, os quais geralmente podem ser agrupados em: desenvolvimento físico, reflexos simples, função motora, funcionalidade e desenvolvimento sensorial, atividade espontânea, aprendizado/memória e neuropatologia. Nessa avaliação, deve-se considerar a gravidade, natureza e reversibilidade do efeito. Em geral, um padrão de efeitos (por exemplo, déficit de aprendizagem observado em vários ensaios consecutivos) é uma evidência de maior peso do que uma ou algumas alterações não relacionadas (OECD, 2008). Informações adicionais referentes aos desfechos neurotóxicos comumente avaliados podem ser consultadas no guia específico de neurotoxicidade.

No delineamento de ambos os estudos supracitados, é importante que sejam consideradas todas as informações disponíveis sobre a ST, tais como: identidade, estrutura química, propriedades físico-químicas, resultados prévios de outros estudos de toxicidade *in vitro* e/ou *in vivo*, dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente relacionadas; e usos previstos da substância. Isso auxiliará na seleção correta do regime de doses e na interpretação dos resultados obtidos (OECD, 2008).

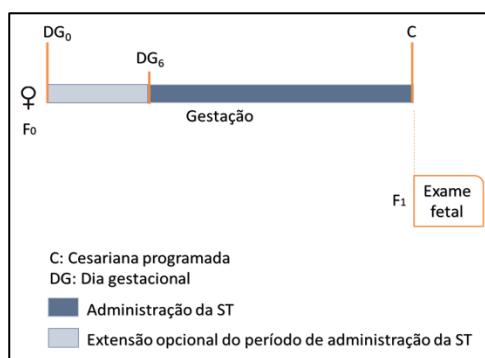
Resultados positivos nesses dois estudos serão relevantes para a classificação de perigo e para o estabelecimento de pontos de partida (PoD) (NOAEL/LOAEL/BMD), a menos que dados demonstrem que os efeitos observados nesses estudos não ocorrerem em humanos (OECD, 2008).

#### **9.3.1. Estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal – Diretriz OECD 414**

## Considerações iniciais e limitações

Esse estudo é delineado para fornecer informações gerais sobre os efeitos da exposição pré-natal à ST na fêmea prenhe e no organismo em desenvolvimento (morte, anormalidades estruturais ou crescimento alterado do feto). Os parâmetros referentes a déficits funcionais não são incluídos nessa diretriz e devem ser avaliados por meio do estudo de DNT.

É possível que as orientações dispostas nessa diretriz sejam adaptadas para casos individuais, com base em conhecimentos específicos sobre, por exemplo, propriedades físico-químicas ou toxicológicas da ST, desde que devidamente embasadas em evidências científicas. O delineamento desse estudo está ilustrado na Figura 9.



## Princípio do teste

Esse estudo consiste na administração da ST a fêmeas prenhes durante todo o período de gestação ou por, no mínimo, o período que compreende a implantação até um dia antes da cesariana programada, a qual deve ocorrer um dia antes da data prevista para o parto, a fim de garantir que a análise dos fetos malformados não seja impossibilitada por eventos de canibalismo materno. Assim, essa diretriz não se destina a examinar apenas o período de organogênese (por exemplo, dias 5-15 em roedores e dias 6-18 em coelhos), mas também efeitos na pré-implantação, quando adotada a extensão opcional do período de administração da ST (DG<sub>0</sub>-DG<sub>6</sub>). Pouco antes da cesariana, as fêmeas são eutanasiadas e seu conteúdo uterino é examinado, para avaliação dos fetos quanto a alterações morfológicas.

## Detalhamento do método

Esse estudo deve ser conduzido preferencialmente em ratos ou coelhos, como espécies de roedor e não-roedor, respectivamente. A utilização de outras espécies animais deve ser justificada e adaptada. Os animais experimentais devem ser caracterizados quanto a espécie, linhagem, fonte, sexo, peso e/ou idade. As fêmeas devem ser acasaladas com machos da mesma espécie e linhagem, devendo-se evitar o acasalamento entre animais com grau de parentesco. Para roedores, considerase como DG 0 aquele em que se verifica o tampão vaginal e/ou presença de espermatozoides no esfregaço vaginal; para coelhos, isso corresponde geralmente ao dia do coito ou da inseminação artificial.

Cada grupo tratado e controle deve conter um número suficiente de fêmeas para acasalamento de modo que se obtenha um total resultante de, aproximadamente, 20 fêmeas com sítios de implantação no momento da necropsia. Um valor inferior a esse pode ser inapropriado e deve ser avaliado caso a caso. Quanto a taxa de mortalidade materna, ela não invalida necessariamente o estudo, desde que não exceda aproximadamente 10%.

Preferencialmente, a via de administração escolhida deve ser a oral por gavagem. A adoção de outra via deve ser devidamente justificada e adaptada. Deve-se utilizar, no mínimo, um controle concorrente e três níveis de dose. O maior deles deve corresponder à dose máxima tolerada (DMT), a qual induz toxicidade materna (sinais clínicos ou redução no peso corporal) e/ou para o desenvolvimento, sem causar morte ou sofrimento intenso dos animais. A dose intermediária deve produzir o mínimo de efeitos tóxicos observáveis, enquanto o menor nível de dose não deve causar qualquer sinal de toxicidade materna ou para o desenvolvimento. Esses níveis de dose devem ser reduzidos gradualmente a intervalos de 2-4 vezes, a fim de se obter uma curva dose-resposta, bem como valores de NOAEL ou de doses próximas ao limite de detecção, que permitiria a determinação de uma BMD. Embora o estabelecimento de um NOAEL materno seja o objetivo, estudos em que ele que não é determinado também podem ser considerados aceitáveis.

Vale ressaltar a possibilidade de adoção de um teste limite ao invés da condução de um estudo completo com três níveis de dose quando a dose de, no mínimo, 1000 mg/kg p.c./dia não causa efeitos tóxicos observáveis e não se espera toxicidade com base em dados de compostos estrutural e/ou metabolicamente relacionados. A exposição humana esperada pode indicar a necessidade de uma dose oral mais alta a ser usada nesse teste limite. Para outros tipos de administração, como inalatória e dérmica, as propriedades físico-químicas da ST geralmente podem indicar o nível máximo de exposição atingível (por exemplo, a aplicação dérmica não deve causar toxicidade localizada grave).

Com relação ao regime de exposição, normalmente, a ST deve ser administrada diariamente desde a implantação (no dia 5 pós-acasalamento) até o dia anterior à cesariana programada. Caso estudos preliminares não indiquem um alto potencial de perda pré-implantação, o início da exposição pode ser antecipado, de modo a abranger todo o período gestacional, isto é, efetuar a administração da ST a partir do acasalamento (DG0).

O Quadro 15 detalha os parâmetros a serem avaliados na fêmea.

**Quadro 15.** Parâmetros de toxicidade avaliados na fêmea no estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal – Diretriz OECD 414.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO DA ANÁLISE
Observação clínica	Avaliação diária – mortalidade, moribundidade, alterações comportamentais pertinentes e todos os sinais de toxicidade evidente.

**Quadro 15.** Parâmetros de toxicidade avaliados na fêmea no estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal – Diretriz OECD 414.

<b>Peso corporal e consumo de alimentos</b>	Pesagem: 1) início do estudo (entre os dias 0-3); 2) primeiro dia de administração e, no mínimo, a cada 3 dias durante a exposição; 3) no dia da eutanásia programada.  Registro do consumo de alimentos a cada três dias, coincidindo com os dias de pesagem.
<b>Exame pós-morte (No momento da eutanásia programada ou de eventuais mortes ao longo do estudo)</b>	Exame macroscópico para detectar quaisquer anormalidades estruturais;  Pesagem e avaliação histopatológica da glândula tireoide;
<b>Exame do conteúdo intrauterino</b>	Verificação da ocorrência de gestação;  Pesagem do útero gravídico, incluindo o colo (excluir animais encontrados mortos durante o estudo);  Registro do número de corpos lúteos das fêmeas prenhas;  Registro do número de mortes embrionárias/fetais e número de fetos viáveis.  Descrição do grau de reabsorção (precoce/tardia), para uma estimativa do tempo relativo de morte do conceito.
<b>Exame de sangue (Na manhã do dia da necropsia)</b>	Apenas em ratos: dosagem dos hormônios T4, T3 e TSH em um curto intervalo de tempo (por exemplo, duas horas).

Quanto à análise conduzida nos fetos, deve-se registrar:

- Sexo e peso corporal de todos;
- DAG de todos os fetos vivos de roedores;
- Alterações esqueléticas e viscerais (variações e malformações);
- Sexo fetal externo (determinado pelo exame macroscópico) em comparação ao sexo interno (gonadal) de todos os fetos;
- Qualquer indicativo de deiscência testicular incompleta/cryptorchidism (ausência de testículo palpável);
- Em roedores – 1) alterações esqueléticas em aproximadamente metade de cada ninhada; 2) alterações viscerais (tecidos moles), por meio de métodos de secção seriada ou técnicas de dissecação, na outra metade;
- Em não roedores (coelhos) – alterações esqueléticas e viscerais em todos os fetos.

### Critérios de aceitabilidade

Considerando-se que esse estudo deve fornecer informações sobre os efeitos de exposição repetida à ST na pré-implantação e no período de organogênese, deve-se seguir adequadamente o regime de doses e o período de exposição, conforme detalhados na seção anterior.

No relatório do estudo, deve-se informar, para cada grupo: número de animais no início do estudo; número de animais encontrados mortos durante o estudo ou eutanasiados, com a respectiva

data de ocorrência; número de fêmeas prenhas; número de animais com sinais de toxicidade, com descrição detalhada desses sinais, incluindo tempo de início, duração e gravidade; tipos de alterações histopatológicas (glândula tireoide), tipos de observações fetais e todos os dados relevantes sobre a ninhada. O relatório deve incluir informações suficientes sobre o método e o software empregado na análise estatística dos dados, sendo utilizada a ninhada como unidade de análise.

## Análise e interpretação dos resultados

A análise desse estudo deve ser conduzida considerando-se as seguintes informações:

- Dados de parâmetros maternos e fetais avaliados, incluindo a relação, ou ausência dela, entre a exposição dos animais à ST e a incidência e severidade de todos os efeitos;
- Critérios utilizados para categorizar alterações fetais externas, viscerais e esqueléticas, caso essa categorização tenha sido feita;
- Dados históricos de controle para aprimorar a interpretação dos resultados;
- Valores brutos usados no cálculo de todas as porcentagens ou índices;
- Análise estatística adequada dos dados, incluindo informações suficientes sobre o método empregado.

Tendo em vista a ênfase dada tanto a desfechos de toxicidade geral quanto para o desenvolvimento, os resultados desse estudo permitirão a distinção entre efeitos para o desenvolvimento que ocorrem na ausência de toxicidade geral e aqueles que somente ocorrem em níveis em que se observa também toxicidade materna. Os resultados do estudo devem ser interpretados em conjunto com dados de estudos subcrônicos, de reprodução, de toxicocinética e outros disponíveis; e podem levar a uma das conclusões abaixo sobre o potencial de efeitos adversos no desenvolvimento intrauterino (OECD, 2008):

- Resultado positivo: a verificação de evidências claras de efeitos no desenvolvimento geralmente é suficiente para fins de classificação do perigo na categoria 1B. Contudo, dados adicionais sobre toxicodinâmica, metabolismo e/ou toxicocinética podem ser úteis para entender a relevância desses efeitos para os seres humanos.
- Resultado equívoco: evidências ambíguas podem indicar a necessidade de condução de estudos mecanísticos ou de estudos adicionais com desenho modificado ou em outra espécie animal. Se a toxicidade do desenvolvimento foi observada apenas em doses associadas a efeitos tóxicos maternos acentuados, recomenda-se a utilização de doses mais baixas e a investigação de desfechos específicos. Em alguns casos – detecção de anormalidades no cérebro ou outros indícios de potencial neurotóxico da ST em questão – podem ser relevantes estudos específicos de DNT. No contexto regulatório, para agrotóxicos, sempre são exigidos estudos de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal em duas espécies animais - ratos e coelhos (conforme RDC nº 294/2019). Assim, no caso da existência de resultados equívocos em um ou nos dois estudos, eles devem ser

analisados em conjunto, podendo haver redução ou aumento do nível de preocupação das evidências, resultando na classificação da ST nas categorias 1B ou 2.

- Resultado negativo: na presença de evidência clara de nenhum efeito, normalmente não são necessários estudos adicionais e a ST não é classificada quanto à TR. No entanto, essa conclusão deve ser obtida a partir de dados suficientes que garantam uma adequada absorção e biodisponibilidade da ST.

Um maior detalhamento acerca da análise e interpretação dos resultados obtidos nessa categoria de estudo pode ser verificado no item 10.2.

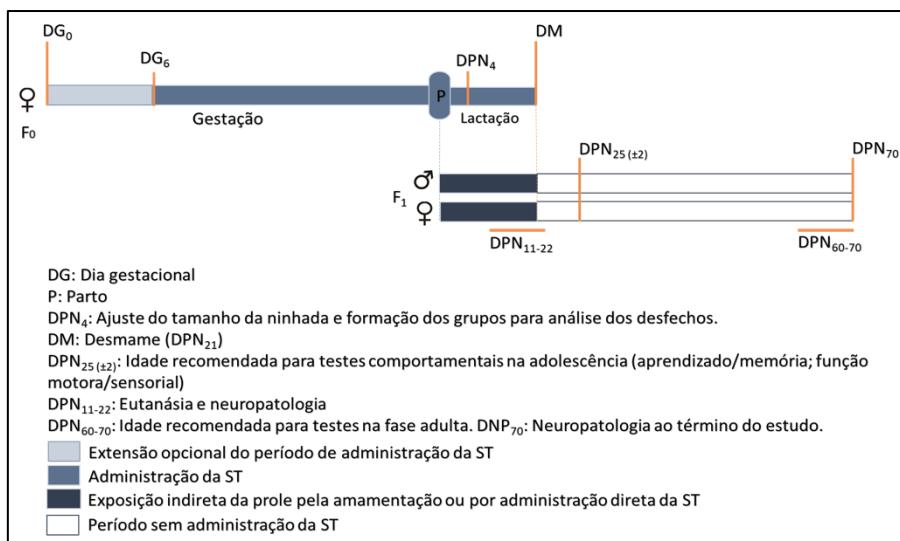
### **9.3.2. Estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento (DNT) – Diretriz OECD 426 ou USEPA 870.6300**

#### **Considerações iniciais e limitações**

Esse estudo é delineado para fornecer dados – inclusive uma caracterização dose-resposta – acerca dos potenciais efeitos morfológicos e funcionais no sistema nervoso em desenvolvimento da prole, os quais podem ser resultantes da exposição intrauterina, bem como nos estágios iniciais da vida.

Um estudo de DNT pode ser conduzido de forma separada ou incorporado a um estudo reprodutivo (de uma ou duas gerações, por exemplo) ou de toxicidade para o desenvolvimento. Quando anexado a outro estudo, é imprescindível que seja preservada a integridade de ambos. As limitações mencionadas nos estudos de uma e duas gerações (itens 9.2.1 e 9.2.2), referentes a desfechos como morte neonatal, malformações, perda pré-implantação e reabsorções, também se aplicam a estudos de DNT.

Uma outra limitação observada, principalmente em função do modelo animal normalmente utilizado, é o fato de não serem abordados nesse tipo de estudo alguns aspectos comportamentais (por exemplo, comportamento social). Por essa razão, não é possível fornecer informações sobre funções corticais superiores, as quais têm sérias implicações em humanos. Adicionalmente, não são avaliadas medidas relativamente sensíveis da função sensorial e/ou cognitiva na prole de animais expostos à ST durante a gestação e/ou o período pós-natal. O delineamento desse estudo é ilustrado na Figura 10.



**Figura 10.** Delineamento do estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento – Diretriz OECD 426.

## Princípio do teste

Esse estudo se baseia na administração da ST a fêmeas durante a gestação (a partir da implantação/ DG6, no mínimo) e lactação, com posterior realização de uma bateria de testes para avaliar os efeitos, bem como comparar sua ocorrência e severidade nas mães *versus* na prole. A avaliação da neurotoxicidade conduzida nos filhotes busca a detecção de anormalidades neurológicas e comportamentais graves, incluindo a avaliação do desenvolvimento físico, ontogênese comportamental, atividade motora, função sensorial e motora, e aprendizado e memória; bem como a avaliação de pesos cerebrais e neuropatologia durante o desenvolvimento pós-natal e a idade adulta.

Caso o estudo de DNT seja conduzido separadamente, pode-se destinar animais adicionais em cada grupo para análises neurocomportamentais, neuropatológicas, neuroquímicas ou eletrofisiológicas específicas, as quais podem fornecer dados suplementares aos obtidos nos testes indicados por essa diretriz. Isso pode ser particularmente útil quando há algum indicativo de um tipo específico de neurotoxicidade a partir de dados de estudos prévios.

## Detalhamento do método

Esse estudo deve ser conduzido preferencialmente em ratos, mas outras espécies podem ser usadas quando apropriado, desde que devidamente justificado e adaptado quanto aos dias gestacionais/pós-natal. A justificativa apresentada deve se embasar em dados toxicológicos, farmacocinéticos e outros disponíveis; e deve incluir a disponibilidade de avaliações neurocomportamentais e neuropatológicas pós-natais específicas da espécie em questão. Devido às diferenças observadas entre as linhagens de ratos, deve-se fornecer evidências de que a linhagem selecionada para o estudo apresenta fecundidade e capacidade de resposta adequadas. A confiabilidade e a sensibilidade de outras espécies para detectar DNT devem ser documentadas.

Os animais experimentais devem ser caracterizados quanto a espécie, linhagem, fonte, sexo, peso e idade. O acasalamento deve ser efetuado entre animais da mesma espécie e linhagem, e deve-se evitar que este seja feito entre animais com grau de parentesco. Considera-se como DG 0 aquele em que se verifica o tampão vaginal e/ou presença de espermatozoide no esfregaço vaginal.

Cada grupo tratado e controle deve conter um número suficiente de fêmeas prenhas expostas à ST de modo a garantir um número adequado de filhotes para os testes de DNT. Recomenda-se um total de 20 ninhadas em cada nível de dose. É possível a adoção de regimes de dosagem para grupos replicados e escalonados se o número total de ninhadas por grupo for alcançado e se forem empregados modelos estatísticos apropriados para considerar as réplicas. Após o nascimento, deve-se determinar o número e o sexo (por inspeção visual ou medição da DAG) de filhotes vivos. Até o DPN 4, deve-se ajustar o tamanho de cada ninhada, por meio da seleção aleatória e eliminação de filhotes extras, a fim de que todas as ninhadas apresentem um tamanho uniforme. Cada ninhada deve ter, se possível, um número igual de filhotes machos e fêmeas; e seu tamanho não deve exceder o tamanho médio esperado para a linhagem de roedores utilizada.

Com relação à distribuição e designação dos animais expostos no útero e durante a lactação, a Diretriz 426 prevê várias abordagens para formação dos grupos destinados às avaliações: funcional e comportamental, de maturação sexual, do peso cerebral e neuropatológica. No Apêndice I dessa diretriz, pode-se verificar diferentes designações possíveis como exemplo. Outros testes de função neurocomportamental, neuroquímica ou neuropatológica podem ser adicionados, a depender de cada caso isoladamente, desde que os testes originalmente requeridos não fiquem comprometidos. Desse modo, a partir do DPN 4, os filhotes devem ser selecionados de cada grupo de dose e designados para avaliações desses desfechos. Na medida do possível, deve-se garantir que ambos os sexos de cada ninhada de cada grupo de dose sejam igualmente representados em todos os testes.

Para testes de atividade motora, o mesmo par de filhotes machos e fêmeas deve ser testado em todas as fases pré-desmame. Para os demais testes, o mesmo ou distintos pares de machos e fêmeas podem ser designados a diferentes testes comportamentais. Nos testes comparativos de função cognitiva ao desmame *versus* em adultos, pode ser necessária a utilização de filhotes diferentes, a fim de evitar confundir os efeitos da idade e de treinamento prévio sobre essas medidas.

Outras variáveis que potencialmente afetam muitas medidas de comportamento também devem ser minimizadas/controladas, quais sejam: tamanho e forma da gaiola de teste; temperatura, umidade relativa, luminosidade, odores e nível de ruído do ambiente; uso da gaiola habitual ou de nova gaiola para teste; e outros fatores ambientais distrativos.

Preferencialmente, a via de administração escolhida deve ser a oral (gavagem, alimento, água), mas outras como cutânea ou inalatória podem ser usadas alternativamente – a depender das características e vias de exposição previstas para o homem – desde que devidamente justificadas. Deve-se utilizar, no mínimo, um controle concorrente e três níveis de dose. A maior dose testada deve ser escolhida de forma a induzir certa toxicidade materna (sinais clínicos; redução no ganho de peso corporal – não mais que 10%; e/ou evidência de efeito tóxico em órgão-alvo que seja característico da

administração desse nível de dose). Essa dose mais alta pode ser limitada a 1000 mg/kg/dia de peso corporal, a menos que a exposição humana esperada ultrapasse esse valor, indicando a necessidade de utilização de um nível de dose superior.

Como alternativa, a dose mais elevada pode ser definida a partir de estudos piloto ou de estudos de dose preliminares, de modo que seja alcançado um nível no qual se observa um grau mínimo de toxicidade materna. Em caso de evidências de toxicidade para o desenvolvimento associada à ST, o nível de dose mais alto deverá corresponder à dose máxima na qual não se observa toxicidade excessiva na prole, morte intrauterina ou neonatal, ou ainda malformações; isto é, efeitos adversos suficientes para impedir uma avaliação significativa da neurotoxicidade. O menor nível de dose não deve causar qualquer sinal de toxicidade materna ou para o desenvolvimento, incluindo neurotoxicidade. Deve-se adotar uma redução gradual dos níveis de dose, a intervalos de 2-4 vezes, a fim de se obter uma curva dose-resposta, bem como valores de NOAEL ou de doses próximas ao limite de detecção, que permitiria a determinação de uma BMD.

Com relação ao regime de exposição, a ST (ou veículo) deve, no mínimo, ser administrada diariamente a fêmeas acasaladas do momento da implantação (DG 6) até o desmame (DPN 21), de forma a cobrir todo o período de desenvolvimento neurológico pré e pós-natal. Pode-se ajustar a idade de início da exposição, bem como a duração e a frequência da administração, em caso de evidências que embasem um protocolo experimental mais representativo de exposições humanas. Ou seja, o objetivo é garantir a exposição dos animais à ST por um intervalo equivalente ao período de pré-natal e de pós-natal precoce nos quais ocorre o crescimento cerebral humano. É possível ainda que a exposição tenha início a partir do DG 0. Contudo, a administração iniciada no DG 6 tem o benefício de evitar possíveis perdas pré-implantação, com a desvantagem de não cobrir os estágios de desenvolvimento entre DG 0 e 6.

Em geral, pressupõe-se que a exposição pós-natal dos filhotes ocorrerá através do aleitamento. No entanto, deve-se considerar a administração direta à prole nos casos em que a sua exposição continuada não pode ser evidenciada por meio de dados farmacocinéticos, parâmetros de toxicidade ou quantificação de biomarcadores. Mas é importante considerar que há problemas técnicos envolvidos na dosagem direta de filhotes, cujos impactos nos resultados devem ser considerados (OECD, 2013, EChA, 2023).

O Quadro 16 detalha o número mínimo recomendado de animais em cada grupo de dose para testes de pré e pós-desmame, bem como exibe os parâmetros e o detalhamento das avaliações a serem conduzidas nas fêmeas e na prole.

**Quadro 16.** Parâmetros de toxicidade avaliados nas fêmeas e na prole no estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento – Diretriz OECD 426.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO
-----------	--------------

**Quadro 16.** Parâmetros de toxicidade avaliados nas fêmeas e na prole no estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento – Diretriz OECD 426.

<b>Observações clínicas</b> <b>Peso corporal</b> <b>Consumo de água e alimentos</b>  <b>Todos os animais (fêmeas e prole)</b>	<p>Observação clínica diária: estado geral de saúde; morbimortalidade; quaisquer sinais de toxicidade (dia de início, hora do dia, grau e duração);</p> <p>Determinação do peso corporal:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fêmeas – pesagem semanal durante a exposição; no dia do parto e do desmame (DPN 21);</li> <li>• Prole – pesagem semanal no pré-desmame e, no mínimo, a cada 2 semanas até a fase adulta (DPN 60-70). Filhotes com administração direta da ST – pesagem, no mínimo, 2x/semana para ajuste de dose, em período de rápido ganho de peso corporal.</li> </ul> <p>Consumo de alimentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medido semanalmente, no mínimo, durante gestação e lactação. Deve-se verificar também, semanalmente, o consumo de água se a exposição for por meio dela.</li> </ul>
<b>Observações clínicas detalhadas</b>  <b>Fêmeas – 10/grupo</b>  <b>Prole – 20/sexo/grupo (1/sexo/ninhada)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fêmeas – no mínimo, 2x durante o período gestacional e 2x no lactacional.</li> <li>• Prole – frequência semanal no pré-desmame e, no mínimo, a cada 2 semanas até a fase adulta (DPN 60-70).</li> </ul> <p>Verificação da aparência da pele, pelos, olhos, mucosas; da ocorrência de secreções e atividade autonômica (lacrimação, piloereção, tamanho da pupila, padrão respiratório irregular, urina e fezes anormais); de alterações na atividade exploratória, na coordenação do movimento (marcha, postura) e na resposta ao manuseio ou outros estímulos ambientais; presença de movimentos clônicos ou tônicos, convulsões, tremores, comportamento estereotipado (autolimpeza excessiva, andar em círculos) e/ou incomum (automutilação, vocalização, agressividade).</p>
<b>Peso cerebral</b>  <b>10/sexo/grupo (1/ninhada) para cada idade.</b>	<p>Pós-fixação em DPN 11-22</p> <p>Cérebro não fixado em ~DPN 70</p>
<b>Neuropatologia<sup>1</sup> (fixação por imersão ou perfusão)</b>  <b>DPN 11-22</b>  <b>10/sexo/grupo (1/ninhada)</b>	<p>Análise microscópica de secções histológicas representativas de amostras das principais regiões cerebrais (bulbos olfativos, córtex cerebral, hipocampo, gânglios da base, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, ponte, bulbo, cerebelo).</p> <p>Análise qualitativa:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificação de regiões cerebrais com evidências de alterações neuropatológicas; registro dos tipos e do grau de severidade das alterações encontradas.</li> </ul> <p>Análise quantitativa (morfometria):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Medições uni ou bidimensionais de regiões cerebrais específicas, que requerem o uso de secções homólogas selecionadas com base em referências microscópicas;</li> <li>• Medições tridimensionais (estereologia) – determinação do volume e nº de células de regiões neuroanatômicas específicas.</li> </ul> <p>Tipos de alterações neuropatológicas avaliadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alterações celulares – presença de vacúolos, degeneração e necrose neuronal;</li> <li>• Alterações teciduais – presença de gliose, cistos e infiltração leucocitária;</li> <li>• Indícios de danos ao desenvolvimento do sistema nervoso: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alterações de tamanho ou forma dos bulbos olfativos, cérebro ou cerebelo;</li> </ul> </li> </ul>

**Quadro 16.** Parâmetros de toxicidade avaliados nas fêmeas e na prole no estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento – Diretriz OECD 426.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Alterações na proliferação, migração e diferenciação neuronal – eventos indicados por necrose ou apoptose excessiva, populações aglomeradas ou dispersas de neurônios ectópicos, desordenados ou malformados;</li> <li>○ Alterações nos padrões de mielinização;</li> </ul> <p>Evidência de hidrocefalia – dilatação ventricular, estenose do aqueduto cerebral e adelgaçamento dos hemisférios.</p>
<b>Neuropatologia<sup>1</sup> (fixação por perfusão)</b>  <b>~DPN 70</b>  <b>10/sexo/grupo (1/ninhada)</b>	<p>Análise microscópica de secções histológicas representativas das amostras dos tecidos do SNC (listadas no item acima) e SNP (olho com nervo óptico e retina; medula espinhal – cervical e lombar; filamentos radiculares dorsal e ventral; nervo ciático proximal, nervo tibial proximal (no joelho) e ramificações do nervo tibial no músculo da panturrilha).</p> <p>Análises quali e quantitativa similares ao descrito na linha/no parâmetro acima (Neuropatologia – fixação por imersão ou perfusão).</p>
<b>Maturação sexual Prole - 20/sexo/grupo (1/sexo/ninhada)</b>	Determinação da idade e do peso corporal do animal nos eventos de abertura vaginal e separação prepucial.
<b>Outros marcos de desenvolvimento (opcional) Todos os animais</b>	Verificação, no momento apropriado durante o pré-desmame, de outros marcos de desenvolvimento altamente correlacionados com o peso corporal (desdobramento de orelha, abertura dos olhos, erupção dos dentes incisivos). Isso é feito em adição ao peso corporal, o qual é o melhor indicador de desenvolvimento.
<b>Ontogênese comportamental<sup>2</sup></b>  <b>Prole - 20/sexo/grupo (1/sexo/ninhada)</b>	<p>Utilização dos mesmos filhotes em todos os dias de teste (no mínimo, 2 medidas no pré-desmame) para todos os comportamentos avaliados.</p> <p>Comportamentos comumente testados: reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e atividade motora.</p>
<b>Atividade motora</b>  <b>Prole - 20/sexo/grupo (1/sexo/ninhada)</b>	<p>Análise durante o pré-desmame (1-3x) e na fase adulta (DPN 60-70);</p> <p>Monitoramento por meio de aparelho automatizado capaz de detectar aumentos e diminuições na atividade motora.</p>
<b>Função motora e sensorial</b>  <b>Prole – 20/sexo/grupo (1/sexo/ninhada)</b>	<p>Condução de, no mínimo, duas análises: 1x no período adolescente (DPN <math>25 \pm 2</math>) e 1x na fase adulta (DPN 60-70);</p> <p>Inclusão de amostra adequada de modalidades sensoriais (somatossensorial, vestibular e outros) e de funções motoras (força, coordenação e outros).</p> <p>Exemplos de testes: reflexo de endireitamento, habituação da reação de sobressalto auditivo e potenciais evocados.</p>
<b>Aprendizado e memória</b>  <b>Prole – 10 a 20/sexo/grupo (1/ninhada)</b>	<p>Análise no pós-desmame (DPN <math>25 \pm 2</math>) e na fase adulta (DPN 60-70);</p> <p>Critérios de seleção dos testes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>II. Deve-se evidenciar o aprendizado por meio de uma mudança de comportamento ao longo de múltiplas sessões de teste ou dentro de uma única sessão;</li> <li>III. Deve-se incorporar medidas de aprendizado (aquisição) e memória (retenção de curto ou longo prazo), ambas obtidas no mesmo teste.</li> </ul> <p>Exemplos de testes: esquiva inibitória, condicionamento olfatório, labirinto aquático de Morris, labirinto radial de 8 braços, labirinto em T.</p>

<sup>1</sup> Nas análises neuropatológicas quali-quantitativas, deve-se primeiramente comparar o grupo controle aos animais de maior dose. Em caso de evidências nesse grupo, deve-se avaliar os grupos de doses intermediária e baixa. Em caso de quaisquer indícios de neurotoxicidade nos grupos de doses inferiores, deve-se também conduzir a análise neuropatológica nesses animais. Em caso de resultados positivos nessas análises quali-quantitativas, deve-se determinar a incidência,

**Quadro 16.** Parâmetros de toxicidade avaliados nas fêmeas e na prole no estudo de neurotoxicidade para o desenvolvimento – Diretriz OECD 426.

frequência e severidade dose-dependente das lesões ou alterações morfométricas encontradas, com base na avaliação de todos os animais de todos os grupos de doses. Todas as regiões cerebrais com quaisquer evidências de alterações neuropatológicas devem ser incluídas nessa análise. Recomenda-se o uso de lâminas codificadas para a condução de uma análise cega.

<sup>2</sup> As medidas devem incluir dois comportamentos que não se desenvolvem na mesma idade. No caso de várias medições de parâmetros referentes à ontogênese comportamental, cada uma delas deve ser conduzida em diferentes pontos temporais durante a fase de desenvolvimento apropriada.

### Critérios de aceitabilidade

Considerando-se que esse estudo deve fornecer informações sobre os efeitos de exposição repetida à ST durante o período de desenvolvimento neurológico pré e pós-natal, deve-se seguir adequadamente o regime de doses e o período de exposição, conforme detalhados na seção anterior.

No relatório do estudo, deve-se informar, para cada grupo: tipos de alterações encontradas com o número de fêmeas, de filhotes por sexo e de ninhadas que exibiram cada uma dessas alterações. Em caso de administração pós-natal direta da prole, deve-se relatar também a via, a duração e o período de exposição.

O relatório deve incluir ainda informações suficientes sobre o método e o software empregados na análise estatística dos dados. Deve-se incluir uma justificativa acerca da escolha por uma análise paramétrica ou não paramétrica, com base em fatores como a natureza dos dados (transformados ou não) e a sua distribuição, bem como a robustez relativa do método estatístico selecionado. É importante que essa escolha seja orientada pelo objetivo e desenho do estudo, de modo a minimizar os erros do Tipo I (falso positivo) e do Tipo II (falso negativo).

Vale ressaltar que os experimentos devem ser delineados de modo que os animais de uma mesma ninhada não sejam tratados como observações independentes, já que a ninhada é a unidade de análise, e não um filhote isolado. Além disso, qualquer desfecho medido repetidamente no mesmo animal deve ser analisado com modelos estatísticos que considerem a não independência dessas medidas.

### Análise e interpretação dos resultados

Em decorrência das complexas interrelações entre o desenho do estudo, as análises estatísticas e a significância biológica dos dados obtidos; a interpretação adequada das evidências de DNT deve envolver um julgamento de especialistas e ser conduzida pela abordagem de peso da evidência. Então, devem ser discutidos, quando presentes, os padrões de evidências comportamentais e/ou morfológicas e a relação dose-resposta; e interpretados em conjunto com dados provenientes de todos os estudos relevantes para a análise de DNT – estudos epidemiológicos e em animais experimentais (subcrônicos, de reprodução, de toxicocinética, de estrutura-atividade e outros). Isso inclui a relação entre as doses da ST e a presença ou ausência, incidência e extensão de qualquer efeito neurotóxico para cada sexo.

Dante da alta complexidade do sistema nervoso em desenvolvimento, havendo disponibilidade de ensaios *in vitro*, esses dados são utilizados de forma integrada na avaliação da DNT (OECD, 2023; Sachana et al., 2021).

A avaliação dos dados deve incluir uma discussão da significância biológica e estatística. É importante frisar que a análise estatística deve ser utilizada apenas como uma ferramenta de orientação na interpretação dos dados. Ou seja, a presença ou ausência de significância estatística não deve ser o único embasamento para se concluir quanto à positividade ou à negatividade de um potencial DNT associado à ST. Nessa análise, dados de controle histórico positivo podem ser úteis para confirmar que um resultado é realmente negativo quando da ausência de efeitos relacionados ao tratamento, isto é, para a exclusão da possibilidade de um falso-negativo. Já a probabilidade de falsos-positivos deve ser discutida com base na análise estatística do total de dados. Essa avaliação deve incluir ainda a relação, se houver, entre as alterações neuropatológicas e comportamentais observadas.

Tendo em vista a ênfase dada tanto a desfechos de toxicidade geral quanto de DNT, os resultados desse estudo permitirão a distinção entre efeitos para o neurodesenvolvimento que ocorrem na ausência de toxicidade materna sistêmica e aqueles que somente ocorrem em níveis que também são tóxicos para as mães.

Por fim, o conjunto dos resultados obtidos pode levar a uma das conclusões abaixo sobre o potencial de DNT (OECD, 2008):

- Resultado positivo: a verificação de evidências claras de DNT em animais geralmente é suficiente para fins de identificação de perigo e classificação na categoria 1B. Dados adicionais sobre toxicodinâmica, metabolismo e/ou toxicocinética podem ser necessários para entender a relevância desses efeitos para os seres humanos.
- Resultado equívoco: quando as evidências de DNT são menos claras (como retardo na ontogênese de reflexos no pós-natal) ou quando nenhuma conclusão bem fundamentada pode ser feita com os dados disponíveis, a ST é enquadrada na categoria 2, desde que os outros estudos disponíveis não mostrem evidências que levem à classificação na categoria 1B.
- Resultado negativo: na presença de evidência clara de nenhum efeito, normalmente não é necessária a condução de estudos adicionais e a ST não é classificada quanto à TR. No entanto, essa conclusão deve ser obtida a partir de dados suficientes que garantam uma adequada absorção e biodisponibilidade da ST.

Um maior detalhamento acerca da análise e interpretação dos resultados obtidos nessa categoria de estudo pode ser verificado no item 10.2.

## **10. CARACTERIZAÇÃO DE PERIGO: ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS**

## 10.1. EFEITOS SOBRE FERTILIDADE E REPRODUÇÃO

Nesse item, os desfechos serão separados em três categorias: aqueles mediados pelo par; e os específicos para os sexos masculino e feminino. Alguns desses desfechos apresentam maior sensibilidade que outros, isto é, são afetados com maior frequência e em níveis de dose mais baixos. O modo de ação pode ser útil na determinação do(s) parâmetro(s) mais sensível(is) (Hood, 2012).

Nessa etapa de análise e interpretação dos dados, é relevante destacar que, embora as análises estatísticas sejam importantes na determinação dos efeitos atribuídos a uma ST, a significância biológica dos dados é mais relevante. Assim, os resultados obtidos devem ser avaliados caso a caso e considerados em conjunto com as demais evidências, por meio de um julgamento científico adequado. Todos os efeitos considerados adversos são apropriados para utilização no estabelecimento de um valor de NOAEL, LOAEL ou BMD (USEPA, 1996).

### 10.1.1. Desfechos mediados pelo par

Essa categoria inclui desfechos nos quais a exposição de um ou de ambos os性os pode contribuir para os efeitos adversos observados, os quais podem afetar a fertilidade, a gestação e o comportamento sexual. Então, nos estudos cujos protocolos preveem o acasalamento de machos e fêmeas expostos, os efeitos descritos nessa categoria não podem ser atribuídos a um dos dois sexos e as conclusões devem se restringir a constatar o perigo de TR sobre o par.

#### a) Efeitos sobre a fertilidade e gestação

Primeiramente, serão abordados os efeitos sobre a fertilidade e gestação (Quadro 17), cuja avaliação fornece medidas das consequências funcionais de danos reprodutivos. Essas informações podem ser obtidas tanto a partir de estudos multigeracionais, quanto de estudos de uma geração e de toxicidade para o desenvolvimento, nos quais o desempenho reprodutivo não é avaliado na prole.

**Quadro 17.** Desfechos de toxicidade reprodutiva (fertilidade e gestação) mediados pelo par (exposição de fêmeas e machos).

AVALIADOS EM ESTUDOS MULTIGERACIONAIS	AVALIADOS EM OUTROS ESTUDOS
<ul style="list-style-type: none"><li>• Índice de acasalamento, tempo para o acasalamento (tempo para a gestação*)</li><li>• Índice de gestação*</li><li>• Índice de parto*</li><li>• Duração da gestação*</li><li>• Tamanho da ninhada (total e nascidos vivos)</li><li>• Gênero da prole* (razão entre os sexos)</li><li>• Número de filhotes vivos e mortos (índice de morte fetal)*</li><li>• Peso ao nascer*</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Índice de ovulação</li><li>• Índice de fertilidade</li><li>• Perda pré-implantação</li><li>• Número de sítios de implantação</li><li>• Perda pós-implantação*</li><li>• Malformações e variações internas*</li><li>• Desenvolvimento estrutural e funcional pós-natal*</li></ul>

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pesos em fases pós-natal*</li> <li>• Sobrevida da prole*</li> <li>• Malformações e variações externas*</li> <li>• Reprodução de filhotes*</li> </ul> |  |
|---|--|

\* Desfechos que também podem ser avaliados em seres humanos.

Alguns desfechos listados nesse quadro também são indicativos de toxicidade para o desenvolvimento – índice de morte fetal, malformações e variações externas e internas, reprodução de filhotes, desenvolvimento estrutural e funcional pós-natal – e, portanto, serão discutidos posteriormente no item 10.2.3 (Detalhamento dos desfechos de toxicidade para o desenvolvimento). O tamanho da ninhada viável é frequentemente o indicador mais sensível de TR e é um índice bastante estável. Uma diminuição nesse parâmetro pode ser resultante de: redução do número de óvulos liberados (taxa de ovulação); falha na fertilização desses óvulos devido a parâmetros espermáticos prejudicados (contagem, motilidade, morfologia); e/ou aumento da perda pré ou pós-implantação, ou seja, embrionária ou fetal (OECD, 2008). A diminuição do tamanho da ninhada pode também ser resultante de: qualidade prejudicada do óocito, distúrbios de ovulação (por exemplo, ovulação irregular ou falha na ovulação, afetando assim a taxa de ovulação) e outras falhas de fertilização causadas por anormalidades genéticas, como mutações cromossômicas ou qualidade prejudicada dos gametas.

Quando é utilizado no estudo um número suficiente de animais para produzir aproximadamente 20 ninhadas por grupo, uma redução média no grupo exposto de apenas um filhote por ninhada pode ser indicativa de um efeito adverso. Já uma redução igual ou superior a 1,5 filhotes por ninhada é um forte indicativo de TR. O peso desse dado aumenta ainda mais se as diferenças em relação ao grupo controle ocorrerem de forma dose-dependente (Hood, 2012).

O valor do peso ao nascer é influenciado pelo tamanho da ninhada, duração da gestação e crescimento intrauterino. Esse último, por sua vez, depende da normalidade do feto, condições maternas e gênero (tendência de machos serem maiores). Considerando que, em geral, o peso ao nascer é inversamente proporcional ao tamanho da ninhada, não se deve considerar como efeito adverso a verificação de baixo peso ao nascer quando o animal provém de uma ninhada grande, a menos que o tamanho aumentado da ninhada seja decorrente do tratamento e acompanhado de um comprometimento da sobrevida e desenvolvimento da prole. A fim de se evitar erros na interpretação desses dados, pode-se ajustar os pesos dos filhotes para o tamanho da ninhada por meio de análises multivariadas (por exemplo, análise de covariância, regressão múltipla) (USEPA, 1996).

Já as medidas de pesos pós-natal dependem do peso ao nascer, sexo e normalidade do indivíduo, bem como do tamanho da ninhada, da capacidade de amamentação materna e da prole. Em grandes ninhadas, pode haver déficit no crescimento de filhotes pequenos ou fracos, os quais podem não ter êxito na competição pela amamentação. Então, tendo em vista que, normalmente, não

é possível determinar se o retardamento no crescimento e/ou a redução da sobrevida foram causados exclusivamente pelo tamanho de ninhada elevado, esses efeitos devem ser considerados adversos na ausência de informações que indiquem o oposto (USEPA, 1996).

As informações relativas ao desempenho reprodutivo são geralmente expressas como índices calculados a partir de dados obtidos nos estudos. Nos relatórios, é importante que sejam apresentados os índices, os dados brutos e a metodologia de cálculo empregada. A avaliação deve ser feita juntamente com as demais informações disponíveis, a serem detalhadas nos itens seguintes – histopatologia, parâmetros espermáticos, número de folículos e ciclo estral. Os principais índices estão descritos no Quadro 18.

**Quadro 18.** Índices calculados a partir de desfechos de toxicidade reprodutiva.

ÍNDICE	DEFINIÇÃO	CÁLCULO
<b>Acasalamento masculino</b>	Medida da capacidade de machos em acasalar	$\frac{\text{Nº machos com acasalamento confirmado}}{\text{Nº total de machos pareados}} \times 100$
<b>Acasalamento feminino<sup>1</sup></b>	Medida da capacidade de fêmeas em acasalar	$\frac{\text{Nº fêmeas positivas para espermatozoides}}{\text{Nº total de fêmeas pareadas}} \times 100$
<b>Fertilidade masculina<sup>2</sup></b>	Medida da capacidade de machos em produzir espermatozoides viáveis (fertilização de óvulos)	$\frac{\text{Nº machos que engravidaram fêmeas}}{\text{Nº total de machos que acasalaram}} \times 100$
<b>Fertilidade feminina<sup>2</sup></b>	Medida da capacidade de fêmeas em ficarem prenhas	$\frac{\text{Nº fêmeas prenhas}}{\text{Nº fêmeas positivas para espermatozoides}} \times 100$
<b>Gestação</b>	Medida da gestação que fornece pelo menos um filhote vivo	$\frac{\text{Nº fêmeas com filhotes nascidos vivos}}{\text{Nº fêmeas prenhas}} \times 100$
<b>Nascidos vivos</b>	Medida da proporção de nascidos vivos do total de filhotes de uma gestação	$\frac{\text{Nº filhotes nascidos vivos}}{\text{Nº filhotes nascidos (entregues)}} \times 100$
<b>Viabilidade</b>	Medida da sobrevivência dos filhotes no DPN 4	$\frac{\text{Nº filhotes vivos no DPN 4}}{\text{Nº filhotes nascidos vivos}} \times 100$
<b>Desmame ou lactação<sup>3</sup></b>	Medida da sobrevivência dos filhotes no desmame (DPN 21).	$\frac{\text{Nº filhotes vivos no DPN 21}}{\text{Nº filhotes nascidos vivos}} \times 100$
<b>Sobrevivência da prole</b>	Medida da sobrevivência do filhote calculada em diferentes períodos da lactação.	$\frac{\text{Nº de filhotes vivos (em dado período)}}{\text{Nº filhotes nascidos (entregues)}} \times 100$
<b>Razão entre os sexos</b>	Medida da relação entre o total de machos e de fêmeas	$\frac{\text{Nº de filhotes machos}}{\text{Nº filhotes fêmeas}} \times 100$
<b>Perda pré-implantação</b>	Medida da relação entre o número de corpos lúteos e o total de	$\frac{(\text{Nº corpos lúteos} - \text{Nº sítios de implantações})/\text{ninhada}}{\text{Nº corpos lúteos/ninhada}} \times 100$

**Quadro 18.** Índices calculados a partir de desfechos de toxicidade reprodutiva.

	implantes; indicativa de morte pré-embriônica.	
<b>Perda pós-implantação</b>	Medida da relação entre o número de implantes mortos e o total de implantes; indicativa de morte embrionária/fetal.	$\frac{(\text{Nº sítios de implantação} - \text{Nº fetos viáveis}) / \text{ninhada}}{\text{Nº sítios de implantação/ninhada}} \times 100$

<sup>1</sup> Evidência de cópula por meio da verificação do tampão vaginal e/ou presença de espermatozoide no esfregaço vaginal.

<sup>2</sup> Tendo em vista que ambos os sexos são frequentemente expostos à st, a distinção entre sexos pode não ser possível. Caso um efeito possa ser claramente atribuído a um sexo (por exemplo, acasalamento de animais tratados com controles), deve-se determinar índices de fertilidade feminino ou masculino separados.

<sup>3</sup> Em caso de padronização do tamanho da ninhada, deve-se calcular o índice de lactação – uso do nº de filhotes após padronização no denominador. Caso não seja efetuada padronização, deve-se calcular o índice de desmame – uso do nº de nascidos vivos no denominador.

O índice de acasalamento é geralmente considerado uma medida confiável do comportamento sexual normal e da libido. Ele também fornece informações indiretas sobre a função integrada do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Assim, alterações nesse índice podem surgir de distúrbios no SNC ou de desequilíbrios nas cascadas hormonais (OECD, 2008; Hood, 2012). Um indicador útil de déficit na função reprodutiva pode ser o intervalo de tempo necessário para o acasalamento após o início da coabitAÇÃO de machos e fêmeas (tempo para acasalamento). Um aumento nesse intervalo é indicativo de ciclo estral anormal na fêmea ou comportamento sexual prejudicado em um ou ambos os parceiros (USEPA, 1996).

O índice de fertilidade fornece informações acerca da capacidade de machos e fêmeas em contribuírem para uma gestação. A interpretação de dados de fertilidade deve considerar o protocolo utilizado e, em particular, a duração da exposição dos machos previamente ao acasalamento. Isso vale particularmente para os protocolos adotados nos estudos de triagem, nos quais os machos são expostos por um período inferior à duração do ciclo espermatogênico. Nesses casos, é possível que o índice de fertilidade não seja capaz de constatar um efeito reprodutivo e, por isso, quando avaliado isoladamente, é considerado um desfecho pouco sensível (OECD, 2008). Portanto, é essencial avaliar outros desfechos interrelacionados (por exemplo, pesos de órgãos, alterações macro e microscópicas, ciclo estral e quantificação de óocitos) para se obter uma visão inicial do comprometimento do sistema reprodutivo (Hood, 2012).

O índice de gestação deve ser interpretado com cautela. Ele não é um desfecho particularmente sensível, uma vez que todas as ninhadas, independentemente do tamanho, são tratadas igualmente por serem consideradas a unidade de análise. A duração da gestação e do parto devem ser avaliadas em conjunto com informações sobre peso ao nascer e sobrevivência dos filhotes. São fatores correlacionados e, dessa forma, uma redução significativa no tempo de gestação pode resultar em uma redução na sobrevivência dos filhotes e de seus pesos ao nascerem. Por outro lado, um aumento significativo no tempo de gestação pode ser decorrente de falha do mecanismo normal de parto e resultar em morte ou prejuízo à saúde materna e da prole se ocorrer distocia. A distocia pode ser uma manifestação de toxicidade materna, resultante da exposição a compostos que causam trabalho de parto prolongado/ difícil ou término das contrações necessárias para esvaziar o útero.

Portanto, deve-se considerar o aparecimento de distocia em animais expostos como um elevado nível de preocupação (Hood, 2012). Além disso, o peso ao nascer dos filhotes pode ser maior que o normal devido ao desenvolvimento intrauterino prolongado, efeito que poderia mascarar um crescimento intrauterino mais lento devido à exposição a um agente tóxico (OECD, 2008; USEPA, 1996).

O índice de sobrevivência da prole é bastante relevante. A sobrevivência reduzida pode resultar de uma série de fatores, como: efeitos no desenvolvimento dos filhotes, tanto de exposições intrauterinas quanto por meio da lactação; anormalidades estruturais; negligência materna ou disponibilidade insuficiente de leite. A interpretação dos dados sobre sobrevivência também deve considerar as informações sobre perda pré e pós-implantação, número de filhotes natimortos, número total de filhotes mortos, número de filhotes afetados por ninhada e padrão de mortalidade (OECD, 2008).

Com relação à razão entre os sexos, os fatores que podem afetá-la são: 1) comprometimento seletivo na produção, transporte ou capacidade de fertilização de espermatozoides com cromossomo Y ou X (determinante do sexo); e 2) compostos tóxicos que induzem a perda seletiva de fetos masculinos ou femininos. Além disso, esses compostos podem ainda causar perturbações no desenvolvimento sexual e acarretar alterações nas características sexuais externas da prole, levando a efeitos aparentes na razão entre os sexos. Embora não sejam examinados rotineiramente, esses fatores fornecem as explicações mais prováveis para alterações na proporção sexual (USEPA, 1996). Importante mencionar que diversos desfechos de reprodução e desenvolvimento, incluindo a razão sexual, podem decorrer de desregulação endócrina e maior detalhamento sobre esse assunto é objeto de guia específico de avaliação do potencial de desregulação endócrina de agrotóxicos.

Quanto ao índice de perda pré-implantação, quando a exposição das fêmeas tem início previamente à implantação (como em estudos multigeracionais), o aumento da perda pré-implantação pode indicar um efeito adverso no transporte ou função dos gametas, no processo de fertilização, no desenvolvimento do blastocisto ou no processo de implantação em si; ou ainda efeitos indiretos no útero ou na regulação endócrina. Por outro lado, quando a exposição se inicia após a implantação (DG 6 em roedores e coelhos) – como nos estudos de toxicidade do desenvolvimento pré-natal – presume-se que a perda pré-implantação decorra apenas de efeitos indiretos ou não tenha relação com a ST (reflete uma variabilidade biológica típica). Porém, nesses casos, os dados devem ser examinados cuidadosamente para verificar se são notavelmente inferiores à faixa de controle histórico e/ou determinar uma possível relação dose-resposta. Em caso positivo, estudos adicionais serão necessários para esclarecer o modo de ação e a extensão de tais efeitos (USEPA, 1991; OECD, 2008; Hood, 2012).

Quanto à perda pós-implantação, um aumento nesse parâmetro reflete a ocorrência de efeitos na sobrevivência do embrião / feto. Em roedores e coelhos, o conceito morto sofre degradação gradual, seguida de reabsorção materna. Assim, a perda pós-implantação pode ser evidenciada por reabsorções precoces, reabsorções tardias ou pela presença do feto morto. Reabsorções precoces ou tardias são identificadas pela ausência (precoce) ou presença (tardia) de aspectos distinguíveis, como

a cabeça ou os membros. Um aumento no número de fêmeas com três ou mais reabsorções é um sinal de toxicidade no desenvolvimento (Hood, 2012). Tendo em vista a grande variabilidade na incidência de perda pós-implantação, caso se verifique um aumento significativo após a exposição à ST, os dados devem ser comparados não apenas aos controles concorrentes, mas também aos dados de controle histórico recente do mesmo laboratório (USEPA, 1991). Esse aumento normalmente é considerado um efeito adverso apenas quando atinge um nível, no mínimo, equivalente ao dobro do observado no controle concorrente. A confiança nos dados pode ser aumentada caso se verifique uma relação dose-resposta e se a média do controle concorrente estiver dentro da faixa de controle histórico (Hood, 2012).

Por fim, é importante destacar que a avaliação de parâmetros de fertilidade em animais experimentais apresenta sensibilidade limitada para indicar um real déficit reprodutivo em humanos, principalmente em razão do reduzido número de espermatozoides produzidos por homens em comparação aos animais experimentais. Portanto, os resultados negativos obtidos na análise desses parâmetros devem receber menor peso quando comparados a outros desfechos mais sensíveis. Essa sensibilidade limitada também sugere que o estabelecimento de um NOAEL, LOAEL ou BMD com base na fertilidade pode não refletir completamente a extensão do efeito de TR em humanos e dados fornecidos pela análise de outros desfechos devem ser considerados. Na ausência destes, deve-se ajustar o fator de incerteza aplicado aos PoDs obtidos (USEPA, 1996).

#### **b) Efeitos sobre o comportamento sexual**

Esse comportamento envolve complexas interações neurais, endócrinas e de órgãos reprodutivos e, portanto, pode ser afetado por uma série de agentes tóxicos e de condições patológicas. Tendo em vista a dificuldade de obtenção de dados relativos ao comportamento sexual em humanos, alterações verificadas em animais experimentais indicam o potencial de efeitos semelhantes em humanos, na ausência de dados que indiquem o contrário. Essa abordagem de interpretação é corroborada por dados que mostram que os efeitos do SNC podem prejudicar o comportamento sexual tanto em animais quanto em humanos. Então, efeitos observados nesse parâmetro devem ser considerados adversos. Isso inclui: 1) evidências de comprometimento de receptividade sexual na fêmea – verificação da presença de lordose (flexão côncava do dorso com simultâneo desvio lateral da cauda e extensão do pescoço); e 2) alteração no comportamento de cópula dos machos – verificação dos parâmetros de latência para a primeira monta e para intromissão; número de montas incompletas e de intromissões; latência para ejaculação, dentre outros. Caso esses efeitos sejam secundários a uma condição de debilidade física (por exemplo, déficit da atividade motora da perna traseira ou letargia geral), eles não devem ser interpretados como efeitos adversos reprodutivos, mas indicativos de efeitos sistêmicos (USEPA, 1996).

##### **10.1.2. Desfechos específicos para o sexo masculino**

Os principais desfechos incluídos nesse item estão resumidos no Quadro 19.

**Quadro 19.** Desfechos de toxicidade reprodutiva específicos para o sexo masculino.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO
Peso, exame visual e histopatologia de órgãos reprodutivos e outros órgãos-alvo	Testículos, epidídimos, vesículas seminais, próstata, hipófise
Avaliação de parâmetros espermáticos <sup>1</sup>	Número (contagem) e qualidade (morfologia, motilidade) de espermatozoides
Comportamento sexual <sup>1</sup>	Montas, intromissões, ejaculações
Níveis hormonais <sup>1</sup>	LH, FSH, testosterona, estrogênio, prolactina
Efeitos no desenvolvimento	Descida testicular <sup>1</sup> , separação prepucial <sup>2</sup> , produção de espermatozoides <sup>1</sup> , DAG <sup>3</sup> , estrutura da genitália externa <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Desfechos que podem ser obtidos ou estimados de forma relativamente não invasiva em humanos.

<sup>2</sup> Um atraso concomitante na separação prepucial em machos e na abertura vaginal em fêmeas indica um atraso generalizado no crescimento, em oposição a um mecanismo mediado seletivamente pelo sistema endócrino feminino/masculino. Na ausência de um efeito no peso corporal, uma alteração no dia da separação prepucial de dois dias ou mais é tipicamente um indicador de toxicidade.

<sup>3</sup> Quando são medidas as DAG médias de aproximadamente 20 ninhadas, diferenças iguais ou superiores a 5% geralmente são indicadores de TR.

### a) Peso corporal e peso dos órgãos

O monitoramento do peso corporal durante a exposição fornece um índice do estado de saúde geral dos animais, o que é bastante relevante para a interpretação dos efeitos reprodutivos. A redução do peso corporal em si, ou do ganho de peso, pode ser decorrente de uma série de fatores, tais como: rejeição de alimentos ou água contendo a ST devido à palatabilidade reduzida, anorexia induzida pela ST ou toxicidade sistêmica (USEPA, 1996).

Quando não se observa uma relação clara entre um declínio do peso corporal e um efeito significativo no sistema reprodutor masculino, não se deve descartar a possibilidade de que o efeito adverso reprodutivo seja secundário à ocorrência de toxicidade não reprodutiva. Então, a interpretação desse conjunto de dados deve seguir um racional, a saber: na ausência de dados adicionais capazes de fornecer maiores esclarecimentos, a evidência de quaisquer alterações nos desfechos descritos no quadro acima deve ser considerada um efeito adverso para o sistema reprodutivo masculino, mesmo na presença de alteração leve a moderada no peso corporal. Por outro lado, se essa evidência for acompanhada de uma grande redução do peso corporal ou outra debilidade sistêmica grave, pode-se atribuir o efeito adverso reprodutivo observado à ocorrência de toxicidade sistêmica (USEPA, 1996).

Na análise dos órgãos reprodutores masculinos, tanto o peso absoluto quanto relativo devem ser considerados, já que uma redução no peso absoluto pode ocorrer sem que esteja necessariamente relacionada a uma redução no ganho de peso corporal. A razão entre o peso do órgão e o peso corporal pode não indicar diferença significativa se ambas as medidas variarem na mesma direção e mascararem o efeito no peso do órgão. Ainda, é importante ressaltar que a ausência de detecção de efeitos no peso dos órgãos não deve excluir alterações significativas em outros desfechos mais sensíveis. Como existe uma baixa variabilidade interanimal no peso dos testículos, uma alteração

significativa no peso absoluto desse órgão (aumento ou diminuição) pode indicar um efeito adverso (OECD, 2008).

Na avaliação das alterações de peso em órgãos não reprodutivos, uma redução igual ou superior a 10% geralmente tem relevância toxicológica. No entanto, devido à notável estabilidade dos pesos testicular e epididimário, decréscimos de até 5% podem ser indicadores de toxicidade, especialmente quando reforçados por evidências macroscópicas ou microscópicas correlatas ou efeitos funcionais na fertilidade. Por outro lado, em animais jovens, é menor essa manutenção nos pesos dos testículos e epidídimos na presença de diminuição do peso corporal, provavelmente devido à influência negativa de uma deficiência no estado nutricional para o desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos (Hood, 2012).

#### **b) Avaliação histopatológica**

O exame histopatológico dos órgãos reprodutores masculinos fornece informações sobre a gravidade dos efeitos e a seletividade dos órgãos afetados. Em geral, o dado histopatológico mais importante é obtido a partir da análise dos testículos, cujos dados de histopatologia devem ser interpretados em conjunto com as informações de parâmetros espermáticos, pesos testiculares, fertilidade e exame macroscópico (Hood, 2012).

A condução da histopatologia seria facilitada pela adoção de abordagens mais uniformes de quantificação da extensão dos danos verificados. Porém, diante da indisponibilidade de técnicas padronizadas de preparação tecidual e sistemas de quantificação, é importante que sejam apresentados os critérios usados para classificação do nível de lesões em indivíduos expostos e controles, a fim de facilitar a avaliação dos dados histopatológicos em um estudo. Esses achados são, em geral, classificados de acordo com critérios qualitativos (número de animais afetados dentro de um grupo de dose) e devem ser analisados em conjunto com informações sobre parâmetros espermáticos e desempenho reprodutivo (USEPA, 1996; OECD, 2008).

Deve-se considerar como efeito adverso para o sistema reprodutivo quaisquer alterações histopatológicas significativas e biologicamente relevantes verificadas nos órgãos reprodutivos de animais expostos em nível superior ao observado no grupo controle. Quando verificadas na hipófise, essas alterações devem ser consideradas como efeito adverso para o sistema reprodutivo nos casos em que se evidencie o comprometimento de células envolvidas na produção de gonadotropina ou prolactina (USEPA, 1996). Raramente os efeitos reprodutivos adversos se manifestam primariamente na próstata, nas vesículas seminais ou nas glândulas coagulantes. Porém, as modificações nesses órgãos sexuais acessórios são comuns quando a alteração reprodutiva primária envolve efeitos hormonais (Hood, 2012).

#### **c) Avaliação dos parâmetros espermáticos**

Com relação aos parâmetros espermáticos (motilidade, morfologia e contagem de espermatozoides), estudos indicam uma forte relação deles com a fertilidade, porém, ainda não há um

padrão comumente aceito acerca do grau de alteração desses parâmetros isoladamente para que sejam considerados adversos. A morfologia espermática é um dos parâmetros com menor variabilidade em indivíduos normais, sendo, portanto, bastante relevante na detecção de efeitos tóxicos (USEPA, 1996). Porém, não há um esquema geral de classificação para esse parâmetro. Anormalidades espermáticas são geralmente descritas em termos de alterações morfológicas na cabeça e cauda, a exemplo de: cabeça em tamanho aumentado ou diminuído, cauda enrolada ou com presença de gota residual de citoplasma, múltiplas caudas, mitocôndrias mal posicionadas, dentre outros. Tendo em vista a alta proporção de espermatozoides normais em roedores, geralmente são avaliados 200 a 400 espermatozoides por rato. Então, considera-se alto o poder estatístico de detecção de diferenças nesse parâmetro entre grupos expostos e controle (OCDE, 2008).

Na análise da contagem de espermatozoides, particularmente nos estudos em roedores, uma diminuição desse parâmetro pode não resultar em fertilidade reduzida, pois esses animais apresentam excesso de espermatozoides por ejaculação, de modo que a fertilidade é prejudicada quando a contagem é reduzida a 90%. Por outro lado, as concentrações de espermatozoides nos homens são altamente variáveis e, geralmente, inferiores às observadas em roedores. Portanto, mesmo uma pequena redução na concentração de espermatozoides é capaz de alterar o potencial de fertilidade, o que pode colocar alguns homens dentro da faixa de infertilidade ou subfertilidade. Por esse motivo, uma mudança estatisticamente significativa na contagem de espermatozoides em um estudo com roedores é considerada um indicativo de um potencial efeito na fertilidade em humanos (OECD, 2008).

Aqui, vale ressaltar que a ausência de lesão histológica nos testículos não exclui as evidências relacionadas a alterações na motilidade, morfologia e contagem de espermatozoides. Isso porque esses parâmetros podem ser afetados não apenas por danos teciduais, mas por uma série de outros fatores (efeitos diretos nos epidídimos ou no próprio espermatozoide; montagem correta de protaminas, dentre outros). Assim, a verificação de uma tendência na curva dose-resposta e uma alteração significativa nesses parâmetros são geralmente consideradas indicativas de um potencial efeito sobre a fertilidade em humanos (OECD, 2008).

Tendo em vista que a fertilidade masculina humana é geralmente menor que a das espécies utilizadas nos testes experimentais e, consequentemente, pode ser mais suscetível a danos causados por agentes tóxicos, deve-se considerar como efeitos adversos quaisquer alterações estatisticamente significativas em algum dos parâmetros espermáticos (USEPA, 1996).

### **10.1.3. Desfechos específicos para o sexo feminino**

Na avaliação da toxicidade reprodutiva feminina, os desfechos incluídos na análise enfatizam a capacidade de engravidar e o resultado da gestação, bem como a sobrevivência e o desenvolvimento da prole. É importante que nessa avaliação sejam consideradas tanto as flutuações inerentes ao ciclo estral/menstrual, quanto as alterações fisiológicas observadas com a progressão da gestação, lactação e retorno à ciclicidade durante ou após a lactação. Adicionalmente, a inclusão de fêmeas não prenhas na análise é bastante relevante, uma vez que efeitos adversos no sistema reprodutivo desse

grupo foram verificados em doses inferiores àquelas que resultam em fertilidade reduzida ou produzem outros efeitos evidentes na gestação ou nos seus resultados (USEPA, 1996).

Cabe destacar ainda que a abordagem de avaliação e interpretação dos desfechos relativos ao sexo feminino difere do masculino, de modo a permitir a análise adequada de eventos vinculados e que sofrem flutuação em função das alterações endócrinas. De modo geral, a abordagem é a seguinte: 1) Avaliação de forma combinada dos dados relativos ao peso, morfologia visível e histologia, para cada órgão isoladamente, considerando-se a interrelação de desfechos e fatores endócrinos; 2) Medição e interpretação dos parâmetros de ciclicidade; 3) Interpretação ajustada para as fases distintas de pré-puberdade, gestação, lactação e senescência (menopausa) (USEPA, 1996). Os principais desfechos incluídos nesse item estão resumidos no Quadro 20.

**Quadro 20.** Desfechos de toxicidade reprodutiva específicos para o sexo feminino.

PARÂMETRO	DETALHAMENTO
<b>Pesos de órgãos reprodutivos e outros órgãos-alvo</b>	Ovário, útero, vagina, hipófise
<b>Exame visual e histopatologia de órgãos reprodutivos e outros órgãos-alvo</b>	Ovário, útero, vagina, hipófise, oviduto, glândulas mamárias
<b>Normalidade do ciclo estral (menstrual<sup>1</sup>)</b>	Citologia de esfregaço vaginal
<b>Comportamento sexual</b>	Lordose, tempo para acasalamento, presença de tampão vaginal ou espermatozoides
<b>Níveis hormonais<sup>1</sup></b>	LH, FSH, progesterona, estrogênio, prolactina
<b>Lactação<sup>1</sup></b>	Crescimento da prole, quantidade e qualidade do leite
<b>Efeitos no desenvolvimento</b>	Normalidade da genitália externa <sup>1</sup> , abertura vaginal <sup>2</sup> , citologia de esfregaço vaginal, início do ciclo estral (menstruação <sup>1</sup> )
<b>Senescência</b>	Citologia de esfregaço vaginal, histologia dos ovários (menopausa <sup>1</sup> )

<sup>1</sup> Desfechos que podem ser obtidos ou estimados de forma relativamente não invasiva em humanos.

<sup>2</sup> Um atraso concomitante na separação prepucial em machos e na abertura vaginal em fêmeas indica um atraso generalizado no crescimento, em oposição a um mecanismo mediado seletivamente pelo sistema endócrino feminino/masculino. Na ausência de um efeito no peso corporal, uma alteração no dia da abertura vaginal de dois dias ou mais é tipicamente um indicador de toxicidade.

#### a) Peso corporal, peso e morfologia de órgãos

Primeiramente, com relação ao peso corporal, uma consideração importante que se aplica ao sexo feminino é a flutuação normal do peso corporal em resposta ao estado fisiológico, em razão da influência hormonal exercida (mediada por progesterona e estrógeno), por exemplo, na ingestão de alimentos, gasto energético, índices de retenção de água e deposição de gordura. Assim, o peso dos órgãos reprodutivos, geralmente, apresenta baixa correlação com o peso corporal. Por essa razão, deve-se analisar os dados reais referentes aos pesos dos órgãos, ao invés desses valores em relação

ao peso corporal (peso órgão/peso corporal). Além disso, esse grupo de dados referente aos pesos e à análise histopatológica dos órgãos reprodutivos femininos, bem como àqueles relativos à contagem de folículos, devem ser avaliados em conjunto com os índices de desempenho reprodutivo já citados (USEPA, 1996).

Inicialmente, com relação à análise do útero, os efeitos que podem ser considerados adversos são: a) Aspecto infantil ou malformado do útero ou colo do útero; b) Diminuição ou aumento do peso uterino; c) Hiperplasia, hipoplasia ou aplasia endometrial; d) Diminuição do número de sítios de implantação (USEPA, 1996). É importante ressaltar que seu peso e morfologia apresentam grande variabilidade quanto à fase do ciclo estral/período gestacional e, por essa razão, os efeitos adversos devem ser interpretados em relação ao estágio em que foram avaliados. Na análise do útero de fêmeas prenhas ou no pós-parto, deve-se registrar o número de sítios de implantação ou cicatrizes de implantação, pois essa informação, juntamente com a contagem de corpos lúteos, é usada no cálculo dos índices de perda pré e pós-implantação, conforme visto anteriormente. As informações relativas ao número de sítios de implantação devem ser interpretadas juntamente com as informações sobre filhotes vivos e reabsorções embrionárias (OEDC, 2008).

Quanto à análise dos ovários, qualquer alteração significativa nos seguintes aspectos pode ser considerada efeito adverso: a) Aumento ou diminuição do peso ovariano; b) Maior incidência de atresia folicular; c) Diminuição do número de folículos primários; d) Diminuição do número ou tempo de vida dos corpos lúteos; e) Evidência de foliculogênese ou luteinização anormais, incluindo folículos císticos, folículos luteinizados e falha da ovulação; f) Evidência de puberdade alterada ou senescência reprodutiva prematura (USEPA, 1996). Especificamente na análise do peso ovariano, uma vez que em ratos ele não sofre flutuações durante o ciclo estral, quaisquer alterações devem ser consideradas adversas. É importante observar que nem todas as alterações histopatológicas afetam o peso ovariano, portanto, uma ausência de um efeito observado nesse parâmetro não exclui a necessidade dessa avaliação histológica (OEDC, 2008).

Muitos estudos evidenciaram uma relação entre o número de folículos e a fertilidade, porém, ainda não há um padrão comumente aceito acerca do grau de alteração desse parâmetro isoladamente para que seja considerado adverso. Frequentemente, uma alteração no número de folículos pode ser detectada previamente a uma alteração no peso do órgão ou na histopatologia. Então, no geral, pode-se considerar que a magnitude de uma redução no número de folículos e de uma lesão tecidual, bem como a natureza dessa lesão observada, determinarão se há um efeito concomitante no desempenho reprodutivo. Quaisquer desses achados, quando dose-dependentes e quando associados a alterações significativas, poderão ser considerados indicativos de potenciais efeitos similares em humanos (OEDC, 2008).

Na análise da vagina e genitália externa, os efeitos verificados que podem ser considerados adversos incluem: a) Aumento ou redução do peso; b) Aspecto infantil ou malformado da vagina ou vulva, incluindo vulva masculinizada ou aumento da DAG; c) Hipoplasia ou aplasia vaginal; d)

Alteração do período de abertura vaginal; e) Padrão anormal na citologia do esfregaço vaginal (USEPA, 1996).

Quanto à análise da hipófise, um aumento ou diminuição significativa no peso desse órgão deve ser considerado um efeito adverso. As alterações histológicas devem ser consideradas como efeito adverso para o sistema reprodutivo nos casos em que se evidencie o comprometimento de células envolvidas na produção de gonadotropina ou prolactina (USEPA, 1996).

**b) Produção de ócito e alterações no ciclo estral**

Sabe-se que a menopausa precoce em humanos está associada a taxas aumentadas de atresia folicular e toxicidade de ócitos. Além disso, alteração no desenvolvimento folicular, falha da ovulação ou alteração na formação e função do corpo lúteo podem resultar em interrupção da ciclicidade e redução da fertilidade. Portanto, considera-se como efeitos adversos para a reprodução aumentos significativos na taxa de atresia folicular, evidência de toxicidade oocitária, interferência na ovulação e alteração na formação ou função do corpo lúteo (USEPA, 1996).

Com relação ao ciclo estral, a análise do seu padrão de eventos fornece um indicador útil da normalidade da função reprodutiva neuroendócrina e ovariana em fêmeas não prenhas, como também auxilia na interpretação de dados hormonais, histológicos e morfológicos e no monitoramento das fêmeas acasaladas. Alguns fatores que sabidamente afetam a ciclicidade estral são o estado nutricional, estresse, ambiente e proximidade de animais machos, os quais devem ser devidamente controlados para evitar potenciais vieses. A análise do ciclo estral em roedores pode ser feita por meio da verificação de alterações na citologia do esfregaço vaginal, a qual pode fornecer uma série de informações úteis como: duração do ciclo, ocorrência ou persistência do estro e do diestro, incidência de pseudogestação espontânea e sua distinção para uma gestação verdadeira, indicações de morte fetal e reabsorção, e início da senescência reprodutiva em roedores. Então, deve-se considerar como efeito adverso qualquer evidência significativa de alteração no ciclo estral (ou ciclo menstrual em primatas), incluindo duração ou padrão anormal do ciclo total, bem como das fases de estro e diestro; falha na ovulação ou menstruação anormal (USEPA, 1996).

É importante mencionar que, como a ciclicidade estral fornece uma avaliação do status hormonal e da capacidade reprodutiva, espera-se que alterações significativas da ciclicidade sejam acompanhadas de alterações funcionais na reprodução. Portanto, mudanças sutis no ciclo estral na ausência de efeitos sobre a reprodução não devem ser consideradas como um efeito reprodutivo adverso. Essas alterações devem ser interpretadas em conjunto com os demais dados reprodutivos avaliados em fêmeas (ECETOC, 2002).

**c) Glândulas mamárias e lactação**

Alterações no tamanho e na histologia das glândulas mamárias, bem como reduzida produção e liberação de leite podem ser consideradas efeitos adversos nas fêmeas. Além disso, uma vez que a prole pode ser exposta à ST via aleitamento materno, é possível correlacionar uma redução no

crescimento dos filhotes tanto a uma menor disponibilidade de leite pelas mães, quanto a outros fatores como: 1) menor ingestão de leite pelos filhotes, causada pela sua baixa palatabilidade ou qualidade; 2) efeitos diretos mediados pela ST secretada no leite; 3) outros fatores não relacionados à capacidade de amamentação (por exemplo, deficiência na habilidade de sucção ou no comportamento materno). Portanto, deve-se considerar como efeito adverso a verificação de reduções significativas na produção e/ou na qualidade do leite, medidas diretamente ou refletidas no comprometimento do desenvolvimento dos animais jovens (USEPA, 1996; Hood, 2012).

#### **d) Senescênci a reprodutiva**

Deve-se considerar como efeito adverso qualquer alteração significativa nas medidas que indicam uma redução na idade de início da senescênci a reprodutiva em fêmeas. Isso inclui a interrupção da ciclicidade normal, avaliada por meio de citologia do esfregaço vaginal, histopatologia ovariana ou perfil endócrino consistente com essa interpretação (USEPA, 1996).

#### **10.1.4. Influênci a da toxicidadi sistêmica/parental na interpretação do estudo**

A fim de se alcançar uma conclusão quanto à toxicidadi na fisiologia reprodutiva, deve-se considerar todas as evidências de efeitos sobre a reprodução/fertilidade e interpretá-las no contexto dos demais dados de toxicidadi sistêmica e/ou parental. Assim, efeitos adversos reprodutivos observados apenas em níveis de dose que causam toxicidadi sistêmica acentuada (por exemplo, letalidade, redução acentuada no peso corporal absoluto, coma) devem ser desconsiderados para fins de classificação. Já em casos de toxicidadi sistêmica menos acentuada, essa relação não é bem estabelecida e, portanto, deve-se considerar que os efeitos reprodutivos observados nesses níveis de dose não são uma consequênci a secundária dessa toxicidadi sistêmica e, por essa razão, devem contribuir para a classificação da ST (ECHA, 2017), a menos que uma relação causal possa ser estabelecida.

#### **10.1.5. Classificação quanto ao nível de preocupação dos efeitos adversos sobre fertilidade e reprodução**

Cada evidênci a obtida nos estudos experimentais deve ser avaliada e classificada quanto ao seu nível de preocupação (baixo, moderado ou alto), com base em alguns critérios, que podem inclusive contribuir para uma alteração da avaliação final. Assim, o nível de preocupação de determinado efeito adverso pode ser influenciado pelas espéci es nas quais a observação foi feita e pode ser aumentado nos casos em que esse efeito:

- Ocorre com mais freqüênci a juntamente com outro e ambos indicam o mesmo mecanismo de ação (por exemplo, modulação do controle endócrino);
- Ocorre em filhotes isolados de várias ninhadas, ao invés de acometer todos os filhotes de uma mesma ninhada (por exemplo, efeitos do desenvolvimento pós-natal);
- Ocorre em doses nas quais não se observa toxicidadi materna;

- É corroborado por evidências em outros estudos de toxicidade não reprodutiva (por exemplo, redução da produção de espermatozoides e alterações histopatológicas no testículo);
- Apresenta uma magnitude ou incidência progressivamente maior nas gerações subsequentes;

No anexo I, consta um resumo dos parâmetros de toxicidade reprodutiva já discutidos nos itens anteriores, com seus respectivos níveis de preocupação, os quais podem servir de guia na avaliação do perigo. Vale ressaltar que os efeitos verificados não devem ser considerados isoladamente, mas em conjunto com os demais dados, em uma abordagem de peso da evidência (ECETOC, 2002).

## **10.2. EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA PROLE**

A toxicidade para o desenvolvimento geralmente ocorre de forma dose-dependente e pode estar associada a diferentes vias de exposição. Pode ser resultante de uma exposição aguda (inclusive exposição única) ou crônica, com a manifestação de uma grande variedade de efeitos, a depender do momento da exposição, uma vez que diferentes órgãos e sistemas funcionais apresentam distintos períodos críticos de desenvolvimento. As principais manifestações de toxicidade para o desenvolvimento são agrupadas em: 1) morte do organismo em desenvolvimento, 2) anormalidade estrutural (malformação e variação), 3) crescimento alterado e 4) déficit funcional (USEPA, 1991; ECHA, 2017).

### **10.2.1. Fatores prévios a serem considerados na interpretação geral dos dados de toxicidade para o desenvolvimento**

A avaliação das evidências de toxicidade para o desenvolvimento é conduzida em dois níveis. Primeiramente, deve-se analisar todos os dados para diferenciar os efeitos adversos que apresentam significância estatística daqueles que não apresentam. O segundo nível é o mais importante e consiste na interpretação da significância toxicológica dos desfechos alterados. O Quadro 21 resume os fatores capazes de afetar a interpretação dos dados (Hood, 2012).

**Quadro 21:** Fatores que afetam a interpretação dos dados de toxicidade no desenvolvimento.

#### **Artefatos de procedimento**

- Diagnóstico:
  - Falha em reconhecer achados raros, quando presentes;
- Fixação:
  - Encolhimento do tecido;
  - Opacidades oculares devido à fixação de formaldeído;
- Manuseio incorreto dos espécimes:
  - Deformação de osso e cartilagem (por exemplo, artrogripose aparente causada por compressão uterina, decorrente de atraso na remoção dos fetos de dentro do útero);
  - Hematomas ou hemorragias petequiais;
  - Secções cardíacas imprecisas.

#### **Inter-relação dos desfechos**

- Ausência de padrão dose-resposta nos dados de índice de malformação devido a aumento relacionado à dose na perda pós-implantação;
- Peso fetal inversamente relacionado ao tamanho da ninhada (competição intraninhada);
- Ganho de peso corporal materno na gestação tardia em relação à sobrevida intrauterina;
- Retardo de crescimento intrauterino generalizado *versus* malformações estruturais específicas (por exemplo, onfalocele, fenda palatina).

#### **Padrões temporais**

- Respostas contínuas (efeito de agrupamento *versus* divisão de evidências);
- Dano em uma região anatômica específica manifestado como variação em baixas doses e como malformações em doses superiores;
- Mudanças no período da morte intrauterina (reabsorção precoce a tardia) em relação à curva dose-resposta;
- Ausência de uma relação dose-resposta devido à saturação da absorção e ligação a receptores;
- Expressão simétrica da anormalidade.

A seguir, serão detalhados outros fatores relevantes a serem considerados na análise e interpretação dos desfechos avaliados nos períodos pré e pós-natal:

#### **a) Via de exposição**

Os estudos descritos no presente guia, em geral, estão sujeitos a variabilidade na exposição dos animais experimentais, bem como a incertezas em relação à exposição real dos filhotes, a qual pode ocorrer tanto durante a gestação (via circulação materna) quanto no pós-parto (via leite materno). Pode ocorrer ainda por administração direta (via gavagem, ingestão de água ou alimento) durante alguns estágios do período pré-desmame, caso seja necessário garantir a exposição adequada da prole durante estágios críticos do desenvolvimento e/ou para quantificar esse nível de exposição. Vale ressaltar que a via dérmica não é recomendada para estudos de TR, uma vez que as dificuldades técnicas associadas a essa abordagem superam as vantagens de se representar uma exposição humana real. Dados de estudos de toxicocinética devem ser utilizados para a extração da via oral para a via dérmica, se necessário (OECD, 2008).

#### **b) Janela crítica de exposição**

A temporalidade é um aspecto chave relacionado a efeitos à saúde induzidos por substâncias químicas, especialmente aqueles decorrentes da exposição durante o desenvolvimento. O momento, bem como a duração da exposição, desempenha papel crucial no desencadeamento dos efeitos, que podem se manifestar em estágios posteriores da vida (EC, 2017).

Embora sejam delineados cenários amplos de exposição nos diferentes estudos, a fim de investigar uma variedade de efeitos adversos ocasionados por exposições pré e pós-natal, é raro que um estudo forneça dados suficientes para identificar com precisão o período crítico de exposição associado a um determinado efeito. Além disso, com relação ao regime de exposição, embora administrações únicas *versus* repetidas possam resultar em efeitos muito distintos, na avaliação do

perigo deve-se adotar uma suposição conservadora, qual seja: qualquer efeito observado no desenvolvimento pré-natal pode ser resultante de uma exposição única à ST, ocorrida a qualquer momento durante o período estudado (OECD, 2008).

**c) Adoção cruzada (*cross-fostering*)**

Tendo em vista que alterações no desenvolvimento podem ser atribuídas não somente a um efeito da ST na prole, mas também a efeitos indiretos observados na mãe (por exemplo, déficits na lactação ou cuidados maternos), pode ser útil optar pela técnica de adoção cruzada, na qual ninhadas expostas no pré-natal são criadas por uma mãe não exposta e vice-versa (OECD, 2008).

**d) Idade dos filhotes**

O cálculo da idade da prole, a depender do desenho experimental e do desfecho avaliado, deve ser efetuado com base no nascimento (idade pós-parto) ou no acasalamento (idade pós-coito). Isso é particularmente relevante na análise de marcos de desenvolvimento ocorridos no período pré-desmame, caso em que a idade pós-coito é um melhor preditor da idade de aparecimento do que a idade pós-natal, pois a duração da gestação pode diferir entre os grupos (OECD, 2008). Adicionalmente, com relação aos testes comportamentais empregados para avaliar DNT, deve-se demonstrar que os animais são maduros o suficiente para realizar a tarefa especificada. Os agentes neurotóxicos para o desenvolvimento podem acelerar ou atrasar a capacidade de aprendizado ou podem interferir na função cognitiva no momento da execução da tarefa. Animais mais velhos frequentemente apresentam um pior desempenho em alguns tipos de testes, por isso, deve-se demonstrar que os animais controle dessa mesma faixa etária são capazes de realizar a tarefa (USEPA, 1998).

**e) Controle histórico e concorrente**

Deve-se sempre priorizar a comparação de animais tratados com um grupo controle concorrente e, quando não for possível, pode-se empregar dados de controle histórico. Uma grande diferença entre dados de controle histórico e dados concorrentes pode indicar uma falha grave no estudo e, a depender da gravidade do caso, pode não ser apropriado utilizar os dados de controle histórico na interpretação dos dados dos grupos tratados. Algumas orientações devem ser seguidas quando da utilização de dados de controle histórico, quais sejam: optar por estudos realizados no mesmo laboratório, dentro de um período razoável antes da interpretação do estudo (por exemplo,  $\pm$  2 anos); e com o mesmo desenho experimental (espécie, linhagem, fonte e idade dos animais experimentais; veículo, via e duração da administração da ST) (OECD, 2008).

**f) Efeitos latentes ou tardios**

No estudo de DNT, esses efeitos são avaliados indiretamente, uma vez que são realizados testes neurocomportamentais e exames neuropatológicos em animais adultos, após um período sem

tratamento (aproximadamente entre os DPN 21 e 60). No entanto, em estudos de toxicidade do desenvolvimento pré-natal, eles não são investigados, pois a análise dos fetos é conduzida previamente ao nascimento. Já em estudos reprodutivos multigeracionais, a investigação desses efeitos tardios é conduzida em animais da segunda geração em diante, os quais foram expostos à ST durante os períodos de desenvolvimento intrauterino e pós-natal, e avaliados quanto aos efeitos adversos durante a maior parte da vida adulta. No entanto, independente do estudo empregado, é extremamente difícil distinguir entre efeitos adversos tardios resultantes da exposição pré-natal e aqueles que resultaram de exposições pós-natais ou adultas, ou ainda de um acúmulo de múltiplas exposições ao longo dos vários estágios da vida do animal. Uma comparação de respostas obtidas a partir de filhotes de sucessivas gerações, em um mesmo estudo, pode fornecer algumas informações limitadas para sanar essa dúvida (OECD, 2008).

### **g) Análises estatísticas**

Nesse tipo de estudo, considera-se que a ninhada é a unidade experimental e, portanto, fetos ou filhotes pertencentes às ninhadas não respondem de modo independente. Por essa razão, as análises estatísticas são geralmente delineadas para analisar dados com base na incidência por ninhada ou no número e percentual de ninhadas exibindo desfechos específicos. Dados fetais e neonatais devem ser analisados considerando-se alguns aspectos, quais sejam: delineamento do estudo, desfecho investigado, tamanho da amostra, possíveis efeitos de gênero e a influência da ninhada nos efeitos. Quanto ao poder estatístico de um estudo – isto é, a probabilidade de ele demonstrar um efeito verdadeiro – os fatores que podem afetá-lo são: tamanho da amostra (com a suposição de que a ninhada é a unidade básica de análise), incidência basal da evidência, variabilidade na incidência do desfecho, robustez dos dados e o método de análise empregado. Por exemplo, em um estudo de toxicidade do desenvolvimento pré-natal no qual são avaliadas 20 ninhadas por grupo de dose, onde todos os fetos são avaliados, a alteração mínima detectável é: a) incidência aumentada de malformações 5 a 12 vezes acima dos níveis de controle; b) aumento de 3 a 6 vezes na taxa de mortalidade intrauterina; c) diminuição de 0,15 a 0,25 vezes no peso fetal. Então, com relação ao mesmo estudo, a capacidade de detectar uma alteração no peso fetal é muito superior à de outros desfechos avaliados. Isso faz com que efeitos no peso fetal sejam frequentemente observados em doses inferiores àquelas associadas a outros sinais de toxicidade no desenvolvimento. Para estudos multigeracionais, a detecção de anormalidades estruturais nos filhotes F1 e F2 se mostrou dependente não apenas do número de ninhadas avaliadas, mas também do número de filhotes de cada ninhada examinados para cada desfecho. Vale ressaltar que não se faz necessária a obtenção de significância estatística para validação de significância biológica dos efeitos relacionados à exposição. Isso é particularmente importante nos efeitos com baixa incidência (malformações raras) ou alta variabilidade, ou em estudos neuropatológicos, nos quais o tamanho da amostra dos grupos é limitado. Da mesma forma, a significância estatística não significa necessariamente significância

biológica e, por essa razão, é importante um julgamento científico adequado e dados de controle histórico para distinguir entre resultados aleatórios e reais (OECD, 2008).

### **10.2.2. Influência da toxicidade materna na interpretação do estudo**

É biologicamente plausível que a toxicidade materna possa afetar adversamente o desenvolvimento da prole. Isso pode ocorrer tanto por mecanismos secundários inespecíficos – estresse e perturbação da homeostase materna – quanto via mecanismos específicos mediados pela mãe (GHS, 2021; ECHA, 2017). Vários estudos mecanísticos têm buscado correlacionar determinados efeitos maternos com desfechos para o desenvolvimento, bem como quantificar essas relações. No entanto, a maioria deles não consegue comprovar uma relação casual. Isso ocorre porque os dados de toxicidade materna coletados nos estudos regulatórios de toxicidade para o desenvolvimento são limitados e, geralmente, baseados em desfechos menos sensíveis do que aqueles utilizados para avaliar a toxicidade no desenvolvimento (ECETOC, 2002).

Na análise da toxicidade materna, deve-se considerar o início, a relação dose-resposta e o período de ocorrência das evidências clínicas, bem como a sua possível relação com os efeitos observados nos embriões/fetos em desenvolvimento. Por exemplo, um efeito adverso na fêmea prenhe que se manifesta clinicamente durante uma janela crítica do desenvolvimento poderia ser implicado na alteração morfológica subsequente da prole (Hood, 2012).

A necessidade de avaliar essa relação nos estudos de toxicidade no desenvolvimento já está bem estabelecida em diretrizes regulatórias, nas quais resta clara a orientação de que o limite superior da faixa de doses seja definido com base na toxicidade materna, conforme exposto anteriormente nos itens de descrição dos estudos (ECETOC, 2002). A abordagem adequada para interpretar essa relação consiste em avaliar primeiramente os efeitos adversos relativos ao desenvolvimento e, em seguida, avaliar a toxicidade materna juntamente com outros fatores que possam exercer influência sobre esses efeitos na prole. Isso deve ser feito em uma abordagem de peso da evidência, a fim de se determinar o nível de influência que deve ser atribuído à toxicidade materna e se obter uma conclusão quanto à classificação do perigo (GHS, 2021; ECHA, 2017).

Desse modo, os estudos em animais devem idealmente fornecer clara evidência de TR na ausência de outros efeitos tóxicos sistêmicos. No entanto, se a toxicidade para o desenvolvimento ocorrer juntamente com outros efeitos tóxicos maternos, a influência potencial de efeitos adversos generalizados deve ser avaliada na medida do possível (GHS, 2021). As evidências de toxicidade sobre o desenvolvimento são consideradas para fins de classificação de perigo, ainda que ocorram na presença de toxicidade materna, a menos que seja possível demonstrar, de forma inequívoca e caso a caso, que os efeitos no desenvolvimento são secundários à toxicidade materna. Além disso, a classificação deve ser considerada em casos de verificação de um efeito tóxico significativo na prole, como efeitos irreversíveis – malformações estruturais, letalidade embriofetal, significativa deficiência funcional pós-natal (ECHA, 2017).

Os efeitos adversos na sobrevivência e no crescimento pós-natal, observados apenas em níveis de dose que causam toxicidade materna, podem decorrer da falta de cuidado parental ou de outras causas, como efeitos adversos sobre a lactação; ou pela toxicidade no desenvolvimento em si. Caso os efeitos observados sejam atribuídos à ausência de cuidado parental, a classificação como tóxico para o desenvolvimento pode não ser justificada (ECHA, 2017).

Nos casos em que se estabelece uma relação causal entre a toxicidade materna e para o desenvolvimento, o nível de preocupação com os efeitos adversos verificados na prole pode ser reduzido. Por outro lado, quando há dados insuficientes para embasar essa relação causal, pode-se concluir que a exposição à ST resulta em toxicidade específica para o desenvolvimento. Na condução dos estudos de toxicidade no desenvolvimento, uma avaliação mais detalhada da homeostase materna possibilitará uma definição mais precisa quanto ao nível de preocupação das evidências para o desenvolvimento, em relação à condição materna correspondente (ECETOC, 2002).

De modo geral, na avaliação dos efeitos maternos e na prole, é possível que três situações sejam verificadas:

- I. Ocorrência de toxicidade para o desenvolvimento em uma dose inferior à qual se registra toxicidade materna. Esse caso, no qual a ST deve ser considerada tóxica para o desenvolvimento e enquadrada na categoria 1B, é especialmente preocupante, pois o organismo em desenvolvimento é afetado, mas a toxicidade não é aparente no animal adulto (USEPA, 1991).
- II. Ocorrência de efeitos adversos do desenvolvimento apenas em doses que causam toxicidade materna mínima. É a situação mais comum e, nesses casos, os efeitos adversos na prole devem ser interpretados como toxicidade para o desenvolvimento – com classificação da ST na Categoria 1B. Isso significa que não se deve presumir que a ocorrência desses efeitos em doses tóxicas para a mãe resulte apenas da toxicidade materna. Isto é, esses efeitos não devem ser desconsiderados e enquadrados como secundários à toxicidade materna, ainda que sejam associados a mecanismos específicos mediados pela mãe. Então, um valor de LOAEL igual para organismos adultos e em desenvolvimento indica que ambos são sensíveis a esse nível de dose. Além disso, deve-se considerar que, independentemente de os efeitos no desenvolvimento serem ou não secundários à toxicidade materna, os efeitos maternos podem ser reversíveis, enquanto os efeitos na prole podem ser permanentes (USEPA, 1991). Quando disponíveis, os dados mecanísticos comprobatórios de que os efeitos observados na prole decorrem de mecanismos mediados pela mãe podem embasar uma redução no nível de preocupação da evidência encontrada e, consequentemente, uma alteração na classificação da ST da Categoria 1B para 2. Contudo, isso só pode ser feito caso a caso, quando uma relação causal é estabelecida ou refutada (GHS, 2021; ECHA, 2017).
- III. Ocorrência de efeitos adversos do desenvolvimento apenas em doses que causam toxicidade materna excessiva, ou seja, significativamente maior que a dose tóxica mínima,

podendo resultar em morte ou severa inanição materna, ou ainda prostração e incapacidade de amamentar e cuidar dos filhotes. Nesses casos, as informações sobre os efeitos do desenvolvimento podem ser difíceis de interpretar e, portanto, têm valor limitado na análise das evidências. É razoável presumir que a toxicidade para o desenvolvimento é uma consequência secundária da toxicidade materna. Portanto, os efeitos na prole devem ser desconsiderados e a ST não deve ser classificada quanto à TR (GHS, 2021; ECHA, 2017).

Em um estudo bem delineado, a toxicidade materna é determinada em animais prenhes e/ou lactantes durante um período adequado da gestação e/ou no período neonatal. Não é recomendável que ela seja presumida ou extrapolada a partir de outros estudos de toxicidade em adultos. Nos itens abaixo, estão listados alguns desfechos úteis na determinação da toxicidade materna, os quais devem ser avaliados quanto à significância estatística e biológica, bem como a uma possível relação dose-resposta. Esses desfechos já foram devidamente detalhados nos itens relativos aos efeitos sobre a fertilidade e a reprodução (item 9.1) (GHS, 2021).

- a) Mortalidade: Um aumento da incidência de mortalidade das fêmeas expostas, em relação ao controle, deve ser considerado evidência de toxicidade materna se ocorrer de forma dose-dependente e puder ser atribuído à toxicidade sistêmica causada pela exposição à ST. Uma taxa de mortalidade superior a 10% é considerada excessiva e os dados obtidos nesse nível de dose devem ser desconsiderados em avaliações adicionais.
- b) Índices de acasalamento e de fertilidade: Esses índices também podem ser afetados pelo macho e estão detalhados no Quadro 16.
- c) Duração gestacional;
- d) Peso corporal e alteração do peso corporal: Esse parâmetro deve ser verificado no D0, durante a gestação e no dia da necropsia. Em coelhos, o ganho de peso corporal pode não ser um indicador útil de toxicidade materna, pois esse parâmetro é bastante variável durante a gestação. Uma redução no peso corporal igual ou superior a 5%, mantida por vários dias, geralmente é considerada um efeito adverso materno. Uma avaliação completa do crescimento materno deve incluir a medição do peso corporal e do ganho de peso corporal, em intervalos mínimos de três a quatro dias durante o período de exposição à ST; do peso uterino gravídico (peso do útero e seu conteúdo), peso corporal líquido (o peso corporal terminal excluindo o peso uterino gravídico) e a alteração líquida do peso corporal (a alteração total do peso corporal durante a gestação, excluindo o peso uterino gravídico). Essa última medida também é chamada de peso corporal materno ajustado (corrigido), calculado por meio da diferença entre o peso corporal inicial e final, subtraída do peso do útero gravídico ou o peso da ninhada no momento da eutanásia. Esse dado pode indicar se o efeito é primariamente materno ou intrauterino. Por exemplo, uma redução

- significativa no ganho de peso durante a gestação e no peso uterino gravídico, sem qualquer alteração no ganho de peso materno corrigido, geralmente indica um efeito intrauterino. Já uma alteração no ganho de peso corrigido sem variação no peso uterino gravídico é sugestiva de toxicidade materna e efeito intrauterino mínimo ou ausente.
- e) Pesos de órgãos: efetuado em casos de suspeita de toxicidade para órgãos-alvo e, principalmente, quando reforçados por evidências histopatológicas. Deve-se medir o peso absoluto, relativo ao peso corporal e relativo ao peso cerebral.
  - f) Consumo de alimentos e água (especialmente se a exposição ocorrer por essas vias): Alterações nesse parâmetro precisam ser avaliadas em conjunto com dados de pesos corporais maternos, a fim de se determinar se os efeitos observados refletem a toxicidade materna ou somente pela presença da ST afetar a palatabilidade da água e dos alimentos. Uma redução igual ou superior a 10% na ingestão de alimentos pela mãe, observada em um estudo de toxicidade no desenvolvimento, pode indicar não apenas toxicidade materna, mas também a possibilidade de um dano secundário à progênie em desenvolvimento.
  - g) Avaliações clínicas: São verificados os sinais clínicos, dosagens bioquímicas hormonais e exames hematológicos. Deve-se detalhar o tipo, incidência, grau e duração dos sinais clínicos, os quais incluem coma, prostração, hiperatividade, perda do reflexo de endireitamento, ataxia ou respiração difícil.
  - h) Necropsia e histopatologia: efeitos adversos histopatológicos no(s) órgão(s) afetado(s) podem reforçar uma alteração significativa no peso médio desses órgãos em fêmeas expostas, comparativamente ao grupo controle, evidenciando assim toxicidade materna.

#### **10.2.3. Detalhamento dos desfechos de toxicidade no desenvolvimento**

O Quadro 22 inclui parâmetros gestacionais – já discutidos em itens anteriores – e embriofetais, e detalha como os desfechos observados na prole e na ninhada podem ser expressos (USEPA, 1991).

**Quadro 22:** Desfechos de toxicidade no desenvolvimento.

Ninhadas com implantes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nº sítios de implantação / fêmea</li> <li>• Nº corpos lúteos / fêmea<sup>1</sup></li> <li>• Percentual de perda pré-implantação<sup>1,2</sup></li> <li>• Nº e percentual de filhotes vivos / ninhada<sup>2,3</sup></li> <li>• Nº e percentual de reabsorções / ninhada</li> <li>• Nº e percentual de ninhadas com reabsorções</li> <li>• Nº e percentual de óbitos fetais tardios / ninhada</li> <li>• Nº e percentual de implantes não vivos (óbitos fetais tardios + reabsorções) / ninhada</li> <li>• Nº e percentual de ninhadas com implantes não vivos</li> <li>• Nº e percentual de implantes afetados (não vivos + malformados) / ninhada</li> <li>• Nº e percentual de ninhadas com implantes afetados</li> <li>• Nº e percentual de ninhadas com reabsorções totais</li> <li>• Nº e percentual de natimortos / ninhada</li> <li>• Nº e percentual de ninhadas com filhotes vivos</li> </ul>
Ninhadas com filhotes vivos

- Nº e percentual de filhotes vivos / ninhada<sup>2,3</sup>
- Viabilidade da prole<sup>2,4</sup>
- Razão entre os sexos / ninhada<sup>2</sup>
- Peso corporal médio da prole / ninhada<sup>4</sup>
- Peso corporal médio masculino ou feminino / ninhada<sup>4</sup>
- Nº e percentual de filhotes com malformações externas, viscerais ou esqueléticas / ninhada
- Nº e percentual de filhotes malformados / ninhada
- Nº e percentual de ninhadas com prole malformada
- Nº e percentual de machos ou fêmeas malformados / ninhada
- Nº e percentual de filhotes com variações externas, viscerais ou esqueléticas / ninhada
- Nº e percentual de filhotes com variações / ninhada
- Nº e percentual de ninhadas com prole exibindo variações
- Tipos e incidência de malformações individuais
- Tipos e incidência de variações individuais
- Filhotes individuais e suas malformações e variações (agrupados de acordo com ninhada e dose)
- Sinais clínicos (tipo, incidência, duração e grau)
- Necropsia e histopatologia

<sup>1</sup> Relevante quando a exposição tem início antes da implantação. Pode ser difícil de avaliar em camundongos.

<sup>2</sup> Cálculo já descrito no item 9.1.

<sup>3</sup> O termo “filhotes” se refere tanto aos fetos observados antes do nascimento quanto aos animais após o nascimento. Os desfechos examinados dependem do protocolo adotado em cada estudo.

<sup>4</sup> Medida em intervalos selecionados até o término do estudo.

Alguns desses desfechos apresentam maior sensibilidade que outros, isto é, são afetados com maior frequência e em níveis de dose mais baixos. O modo de ação pode ser útil na determinação do (s) parâmetro (s) mais sensível (is), apesar de que, na maioria dos casos de toxicidade do desenvolvimento observada em animais experimentais, o peso fetal é o mais sensível e está geralmente associado a diferentes efeitos adversos sobre o desenvolvimento. Então, o conhecimento sobre os diferentes padrões de alterações verificadas em múltiplos desfechos – frequentemente decorrentes da redução no peso corporal fetal – é essencial para se efetuar uma análise global do processo de toxicidade no desenvolvimento (Hood, 2012).

Assim, tendo em vista que alguns eventos – como desenvolvimento da cavidade corporal (por exemplo, rotação e retração intestinal) e fechamento da linha média (tubo neural, palato duro, coluna vertebral, tórax e abdômen) – acontecem de maneira sistemática e harmoniosa, o retardamento no crescimento pode simplesmente modificar o momento de ocorrência desses eventos em questão de horas ou dias. Por exemplo, um dano que se manifesta como onfalocele ou fenda palatina pode resultar de atraso no desenvolvimento devido ao retardamento do crescimento intrauterino, ao invés de ser causado por um efeito direto na morfogênese dessas estruturas. Essa distinção pode ser importante na etapa de avaliação de risco (Hood, 2012).

Portanto, os dados de toxicidade para o desenvolvimento devem ser avaliados de forma conjunta, seguindo a premissa de que, embora possam existir efeitos adversos seletivos em desfechos discretos, eles são exceção à regra dos padrões de efeito (Hood, 2012).

#### **10.2.3.1. Alteração na sobrevivência e no crescimento**

A morte intrauterina de um conceito pode ser decorrente de um efeito tóxico primário ou de defeitos estruturais (malformações) devido às propriedades teratogênicas de uma ST. Em estudos regulares de toxicidade para o desenvolvimento, o exame uterino realizado ao final da gestação não permite elucidar o que de fato ocasionou o óbito do conceito. Assim, uma substância que acarreta acentuada letalidade embriofetal e alguns fetos malformados em um determinado nível de dose deve ser um potencial teratogênico. Essa interpretação se embasa no fato de que esses poucos fetos malformados sobreviventes a termo, observados na cesariana, podem representar a maioria dos fetos que sofreram óbito intrauterino devido a suas malformações e foram, consequentemente, reabsorvidos. Nesse caso, faz-se necessário resultados da exposição a dosagens mais baixas, em intervalos estreitos, para interpretar essas evidências e avaliar completamente o potencial teratogênico dessa substância (ECETOC, 2002).

O número de filhotes vivos por ninhada, com base nas ninhadas que têm um ou mais filhotes vivos, pode permanecer inalterado, embora se observe um aumento na incidência de não-vivos em todas as ninhadas. Isso pode ocorrer tanto em razão de um aumento no número de ninhadas sem filhotes vivos, quanto por um aumento no número de implantes por ninhada. A redução no número de filhotes vivos por ninhada é geralmente acompanhada de um aumento na incidência de implantes não vivos por ninhada, a menos que o número de implantes seja diferente entre os grupos de dose (USEPA, 1991).

O peso corporal é um indicador sensível de toxicidade no desenvolvimento e uma redução significativa nesse parâmetro pode inclusive ser usada como base para estabelecer o NOAEL. Vários outros fatores devem ser considerados na avaliação das alterações de peso fetal ou neonatal; por exemplo, em animais multíparos, os pesos fetais ou neonatais são geralmente inversamente correlacionados com o tamanho da ninhada. Essa relação pode afetar a extremidade superior da curva dose-resposta, então, na análise estatística de peso corporal médio, deve-se ajustar o peso da ninhada pelo seu tamanho, por exemplo, usando técnicas de análise de covariância (USEPA, 1991; OECD, 2008).

#### **10.2.3.2. Alteração no desenvolvimento morfológico**

Os filhotes vivos são geralmente examinados quanto a malformações e variações (externas, viscerais e esqueléticas). A terminologia usada para descrever evidências individuais obtidas em exames morfológicos fetais ainda é usada de maneira inconsistente. Frequentemente, os efeitos observados são classificados como malformações maiores, malformações menores e variações. Essa classificação deve ser efetuada pelo laboratório responsável pela realização do estudo e, em seu relatório, devem constar os critérios utilizados e as definições claras dos termos usados, a fim de possibilitar uma interpretação adequada dos dados. Essas evidências morfológicas fetais abrangem um espectro de gravidade, com base em seu impacto na viabilidade e sobrevivência da prole

(ECETOC, 2002). Essa determinação da gravidade de uma alteração morfológica observada é bastante crítica, tendo em vista a ocorrência de respostas contínuas entre uma morfologia fetal normal e outra com desvios extremos (Hood, 2012).

Em geral, a terminologia frequentemente usada é a seguinte (OECD, 2008):

- Anomalia: Alterações estruturais no desenvolvimento que incluem malformações e variações;
- Malformação: Alteração estrutural geralmente rara. É permanente e ocorre além da variação biológica esperada, podendo afetar adversamente a sobrevivência, desenvolvimento ou funcionalidade.
- Variação: Alteração estrutural associada a um pequeno ou ausente efeito prejudicial para o animal. Sua ocorrência pode ser transitória e com relativa frequência na população controle. Inclui o retardo, definido como um atraso no crescimento ou na morfogênese que, de outra forma, seguiu um padrão normal de desenvolvimento.

Ao avaliar se um desvio morfológico fetal consiste numa malformação ou variação, os seguintes fatores devem ser considerados: I) Grau de desvio da média – magnitude da alteração morfológica e natureza do impacto funcional, quando presente; II) Incidência (prevalência); III) Impacto na salubridade e até que ponto há reversibilidade (Hood, 2012).

Dada a inconsistência da terminologia para descrever anomalias no desenvolvimento, foi criado um projeto internacional, denominado *DevTox Project* – o qual envolve três instituições alemãs, incluindo o Instituto Federal alemão de Avaliação de Risco (*BfR*) – com o objetivo de harmonizar essa nomenclatura, auxiliar no reconhecimento visual de anomalias e fornecer uma base de dados de controle histórico de efeitos no desenvolvimento de animais experimentais. As anomalias são classificadas como variações, malformações ou como "na zona cinzenta" para as diversas espécies de animais experimentais (uma anomalia pode ser considerada uma variação em uma espécie e uma malformação em outra). Essas informações, bem como todas as referências para essa classificação, que são periodicamente atualizadas, estão publicamente disponíveis no sítio eletrônico [devtox.org](http://devtox.org).

Enquanto as malformações se enquadram em um nível alto de preocupação, variações e retardos são enquadrados em um nível de preocupação baixo a moderado (ECETOC, 2002), conforme detalhamento disposto no Anexo II. Um aumento na incidência de filhotes malformados pode ser indicado por uma alteração em um ou mais dos seguintes desfechos: 1) incidência de filhotes malformados por ninhada; 2) número e percentual de ninhadas com filhotes malformados; e 3) número de filhotes ou ninhadas com uma malformação específica que sofre aumento com a dose (como indicado pela incidência de tipos individuais de malformações). Dados de controle histórico apropriado podem ser especialmente úteis na interpretação de malformações e variações, particularmente aquelas que ocorrem normalmente em baixa incidência e podem ou não estar relacionadas à dose em um estudo individual (USEPA, 1991).

Um aumento dose-dependente nas malformações é interpretado como um efeito adverso no desenvolvimento. Por outro lado, a avaliação da significância biológica de uma alteração na incidência de variações anatômicas é mais difícil e deve considerar alguns fatores adicionais, tais como: informações sobre o estágio do desenvolvimento, incidência basal de determinadas variações ou outros fatores específicos referentes à linhagem ou à espécie utilizada. Caso o aumento nessas variações ocorra de forma dose-dependente, estas devem ser avaliadas como possíveis indicativos de toxicidade no desenvolvimento (USEPA, 1991). Então, isso será avaliado caso a caso e, com o aumento no nível de preocupação da evidência para moderado ou alto, a classificação do perigo poderá resultar no enquadramento da ST na categoria 1B.

Adicionalmente, é importante mencionar que os efeitos no desenvolvimento ocorrem a partir de um limiar de dose, o qual, entretanto, nem sempre é evidente e pode se manifestar como um aumento sutil de variações ou malformações menores. Com o aumento da dose, observa-se um aumento concomitante na incidência de malformações mais graves e de morte embrionária. Um aumento adicional da dose resulta em uma maior taxa de letalidade embrionária, acompanhada de uma redução na teratogenicidade. Isso decorre do número crescente de abortos ou de óbitos intrauterinos, os quais são evidenciados apenas como reabsorções no exame uterino. Esse padrão de efeitos varia com a exposição e suscetibilidade da fêmea e do embrião à ST. Portanto, a mesma dose pode resultar em toxicidade materna, assim como em letalidade embriofetal e anormalidades estruturais fetais (ECETOC, 2002).

Especificamente quanto à incidência de variações esqueléticas, considerando-se que a extensão da ossificação fetal depende, em certa medida, do tamanho fetal, é comum observar que fetos menores (de ninhadas maiores) exibem uma incidência aumentada de ossificação tardia quando comparados com fetos maiores (de ninhadas menores) do mesmo grupo de dose. Por essa razão, na análise estatística, os dados de ossificação devem ser ajustados pelo peso fetal, ou estes devem ser considerados quando da interpretação dos dados de ossificação (OECD, 2008).

Na análise dos efeitos neuropatológicos, em geral os resultados são apresentados como dados de incidência (por exemplo, evidências histopatológicas) ou dados contínuos (por exemplo, peso cerebral e morfometria). Nos casos em que não se constata efeito adverso em pontos de análise tardios, não se deve desconsiderar achados anteriores, nem tampouco interpretar isso como uma recuperação dos efeitos, pois é possível que: a) alterações em processos de desenvolvimento observadas em um momento anterior não estejam mais ocorrendo em animais adultos; b) alguma anomalia estrutural em adultos seja mascarada por remodelagem cerebral extensiva durante o desenvolvimento, bem como pelo próprio crescimento do animal; e c) a avaliação de grupos diferentes de animais (embora originários da mesma população de ninhadas) em cada ponto de análise seja uma fonte de potencial variabilidade na resposta (OECD, 2008).

### **10.2.3.3. Verificação de déficits funcionais**

Esse item engloba alterações na funcionalidade de órgãos ou sistemas, as quais podem resultar da exposição do animal à ST durante períodos críticos de desenvolvimento. Em geral, a análise desses desfechos é efetuada por meio de baterias de testes comportamentais capazes de avaliar sistemas sensoriais, desenvolvimento neuromotor, atividade locomotora, aprendizado e memória, reatividade e/ou habituação e comportamento reprodutivo. É possível que esses déficits funcionais sejam observados em níveis de dose inferiores àqueles nos quais outros indicadores de toxicidade no desenvolvimento são evidentes. Os efeitos neurotóxicos relativos à função motora, por exemplo, são frequentemente observados como uma alteração no perfil ontogenético ou na maturação dos padrões de atividade motora, com indução de um aumento nessa atividade, que persiste até a fase adulta ou que afeta outros comportamentos. Isso deve ser considerado evidência de um efeito neurotóxico (USEPA, 1998). Independentemente da sua natureza transitória ou reversível, em geral, esses desfechos são considerados adversos (USEPA, 1991).

Na interpretação dessa categoria de dados, presume-se que os efeitos funcionais observados em animais experimentais indiquem um potencial de desenvolvimento alterado em humanos, embora os tipos de efeitos não sejam necessariamente os mesmos em ambas as espécies (USEPA, 1991).

Especificamente com relação aos testes comportamentais, alguns fatores que devem ser considerados, quando da sua condução ou da análise dos resultados obtidos, seguem abaixo (OECD, 2008):

- Experiências prévias da prole: deve-se controlar variáveis como temperatura, umidade, nível de ruído, iluminação, manuseio e limpeza da gaiola, a fim de se padronizar as experiências ambientais às quais os animais são expostos durante o seu desenvolvimento;
- Condução do protocolo de teste: deve-se testar alternadamente animais controle e tratados, em condições ambientais padronizadas, a fim de se evitar um aumento da variabilidade nos resultados obtidos e a consequente diminuição da sensibilidade do teste (capacidade de detecção do efeito real da ST no comportamento).
- Sexo da prole: deve-se testar ambos os sexos e analisar seus resultados separadamente, em especial nos testes de DNT;
- Viés do experimentador: deve-se conduzir uma análise cega dos grupos tratados e controle ou adotar testes comportamentais automatizados para a redução desse viés;
- Validação do teste: deve ser feita por meio de um controle positivo, a fim de se determinar a relevância (se é de fato medido aquilo que o teste é delineado para medir) e a confiabilidade (quão bem isso é medido).
- Sensibilidade do teste: está relacionada à capacidade de detecção de alterações no parâmetro sob análise. Então, na interpretação de um dado comportamental, deve-se considerar a relação entre a complexidade do teste e as capacidades do animal experimental. Quando há subestimação da habilidade, a execução de dada tarefa é muito

fácil para o animal e isso indica que esse teste tem uma baixa sensibilidade, ou seja, apenas animais com grandes déficits não seriam capazes de executar adequadamente as tarefas propostas. Por outro lado, uma superestimação significa que inclusive o grupo controle não apresenta um desempenho adequado, o que afeta a seu comparativo com o grupo exposto.

- Reversibilidade de um efeito adverso: a aparente reversão, na prole adulta, dos efeitos observados no início da vida pode estar relacionada a processos compensatórios – comportamentais ou de desenvolvimento – e não representar uma verdadeira recuperação. Da mesma forma, efeitos observados na prole adulta que não haviam sido observados anteriormente nos animais jovens não devem ser desconsiderados por falta de concordância, pois eles podem representar a expressão latente de alterações prévias no desenvolvimento neurológico. Isso significa que, em muitos casos, não é possível determinar se um efeito é realmente reversível, em decorrência da plasticidade inerente ao sistema nervoso, ou seja, sua disponibilidade de mecanismos compensatórios, cuja ativação já pode ser considerada um efeito adverso em si. Assim, se a DNT for observada apenas durante algum tempo da vida útil, deve-se suspeitar de compensação. Além disso, os efeitos observados, por exemplo, durante o início de uma tarefa de aprendizado, mas não ao final dela, não devem ser interpretados como efeitos reversíveis. Eles devem ser considerados indicativos de que houve um atraso na aprendizagem.

Um maior detalhamento acerca dos testes comportamentais recomendados nos estudos regulatórios consta no Anexo III, como também no guia específico de neurotoxicidade.

#### **10.2.4. Classificação quanto ao nível de preocupação dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento**

Devido às inúmeras combinações potenciais de efeitos adversos verificadas em estudos de toxicidade no desenvolvimento, nessa etapa de compilação dos dados e interpretação do conjunto de evidências, é válido consultar a Tabela 9.25 – disponível no Capítulo 9 do livro *Developmental and reproductive toxicology: a practical approach* (Hood, 2012) – com questões-chave a serem consideradas para se concluir quanto à TR de determinada ST. Trata-se de uma abordagem sistematizada para a avaliação dos dados. No entanto, é importante ressaltar que cada conjunto de dados é único e, portanto, essas perguntas devem servir como uma estrutura básica para avaliar os estudos de toxicidade no desenvolvimento.

Adicionalmente, no Anexo II, pode-se consultar o nível de preocupação indicado para as principais evidências referentes à toxicidade no desenvolvimento. Essa classificação não deve ser usada isoladamente como o único critério para avaliação, mas como um guia para classificar o caráter inerente de cada observação. Desse modo, a atribuição de um nível de preocupação para determinado desfecho é definida pela magnitude do efeito detectado (o nível de desvio dos controles concorrente e histórico), pela dose na qual o efeito é observado e pela ocorrência de uma relação dose-resposta. Em geral, grandes alterações capazes de comprometer o desenvolvimento final se enquadram em um

nível alto de preocupação, o que resulta na classificação de perigo na Categoria 1B. Por outro lado, uma preocupação moderada é atribuída àquelas mudanças que refletem uma alteração na taxa de desenvolvimento ou em quaisquer medidas que não afetam diretamente o desenvolvimento normal (ECETOC, 2002). Esses casos geralmente resultam no enquadramento na Categoria 2.

Especificamente quanto às evidências morfológicas fetais, a sua interpretação e classificação devem ser conduzidas com base em alguns critérios, que podem inclusive contribuir para uma alteração da avaliação final. Assim, o nível de preocupação de determinado efeito adverso pode ser influenciado pelas espécies nas quais a observação foi feita e pode ser aumentado nos seguintes casos:

- Se ocorrer com mais frequência juntamente com outras evidências (*clusters*, síndromes);
- Se ocorrer em fetos isolados de várias ninhadas ao invés de afetar todos os fetos de apenas uma ninhada;
- Se ocorrer em doses maternas não tóxicas;
- Se as variações observadas em doses baixas forem acompanhadas de malformações da mesma estrutura, observadas em doses altas. Por vezes, essas malformações podem ser incompatíveis com a viabilidade embrionária e, então, observa-se somente um aumento nas mortes embrionárias na dosagem mais alta.

### **10.3. EFEITOS NA LACTAÇÃO OU NA VIA DE LACTAÇÃO**

Esse item detalha os critérios a serem considerados para analisar os efeitos adversos no processo de lactação em si ou na via de lactação, e se concluir quanto ao enquadramento da ST na categoria adicional de perigo para lactação, conforme previsto na RDC nº 294/2019. De modo geral, há dois possíveis cenários a serem considerados nessa classificação (ECHA, 2017):

#### **I) A ST é absorvida pela mãe e interfere na lactação**

Nesse caso, a exposição à ST afeta a quantidade e/ou qualidade (composição) do leite produzido, provavelmente em decorrência de efeitos sistêmicos na mãe. No entanto, é possível que tais efeitos na lactação ocorram mesmo na ausência de toxicidade materna evidente (por exemplo, a substância pode afetar apenas a transferência de um nutriente para o leite, sem graves consequências para a mãe). Assim, o tipo e a magnitude dos efeitos maternos e suas influências na lactação ou produção de leite precisam ser avaliados caso a caso para se alcançar uma conclusão quanto à classificação na categoria de lactação.

Então, se uma substância causa toxicidade materna evidente no mesmo nível de dose em que foram observados os efeitos adversos na lactação, considera-se possível que a ST afete indiretamente a produção de leite ou prejudique os cuidados maternos como um efeito não específico secundário à

toxicidade materna. Isto é, em caso de evidências robustas para indicar que os efeitos sobre a lactação não são causados diretamente pela ST, ela não deve ser classificada como tal.

Por outro lado, uma ST que não cause toxicidade materna evidente, mas que interfira na produção ou qualidade do leite, será normalmente classificada quanto aos efeitos na lactação ou via lactação, pois nesse caso o efeito adverso observado é um efeito direto relacionado à exposição à ST.

## **II) A ST pode estar presente (inclusive seus metabólitos) no leite materno em quantidades suficientes para causar preocupação com a saúde da prole**

Nesse caso, considera-se a possibilidade de que os efeitos adversos verificados na prole sejam causados pela ação direta da ST (e/ou de seus metabólitos) excretada no leite materno, em quantidades suficientes para ocasionar toxicidade. Então, nesse cenário, a toxicidade materna não tem relevância para a classificação do perigo, mas esta deve ser bem fundamentada em evidências que demonstrem essa ação direta da ST para desencadear os efeitos adversos na prole exposta pela lactação.

No entanto, na presença de dados bem fundamentados que ensejem preocupação quanto aos potenciais efeitos causados na prole pela exposição à ST via lactação, pode-se efetuar a classificação nessa categoria, mesmo na ausência de evidência direta. Essa conclusão deve se embasar numa comparação quantitativa da transferência estimada através do leite e do limiar de toxicidade nos filhotes. Isso se aplica aos casos em que a ST apresenta potencial de bioacumulação, o que levaria a uma sobrecarga na prole; ou se há evidências de que a prole pode ser mais sensível à toxicidade da ST do que o adulto. Somente a presença da ST no leite, sem justificativa adicional para a preocupação com a prole, normalmente não é capaz de embasar a classificação na categoria de lactação.

### **10.4. AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA NA CARACTERIZAÇÃO DO PERIGO**

As relações dose-resposta para desfechos individuais, bem como a combinação de desfechos, devem ser consideradas na interpretação dos dados. Isso inclui a avaliação de evidências obtidas em animais experimentais e em humanos, quando disponíveis. Considera-se a verificação de uma relação dose-resposta como um critério importante no estabelecimento do potencial de TR associado a uma ST. Entretanto, é importante ressaltar que, em estudos de TR, nem sempre é possível observar essas relações dose-resposta tradicionais. Dois exemplos podem ser citados para ilustrar essa situação. No primeiro deles, uma ST pode interferir na função celular de tal maneira que, em um nível de dose baixo, verifica-se aumento de anormalidades na morfologia espermática. Já doses mais altas podem acarretar morte celular e, consequentemente, uma diminuição na contagem de espermatozoides, o que levaria a uma possível diminuição na proporção de espermatozoides com morfologia anormais. No segundo exemplo, com o aumento da dose, uma gestação pode terminar em perda embrionária ou fetal, ao invés de um nascimento com malformações. Ou seja, diferenças no nível ou tempo de exposição podem promover uma alteração nos padrões de resultados. Portanto, o recomendável é

que sejam analisadas as relações entre diferentes desfechos reprodutivos e padrões de exposição (USEPA, 1996).

A avaliação da relação dose-resposta inclui a identificação de níveis efetivos de dose, bem como de doses associadas a um aumento baixo ou ausente na incidência de efeitos adversos, em comparação aos animais controle. O foco dessa avaliação está na identificação do(s) efeito(s) crítico(s) – isto é, o efeito adverso que ocorre no nível de dose mais baixo – e no valor de LOAEL, NOAEL, ou BMD associado a esse(s) efeito(s) (USEPA, 1996). Frequentemente, esses valores são identificados com base nas diferenças estatísticas dos grupos controle, mas a significância biológica pode ser também determinada, por meio de análise de uma tendência na resposta, da magnitude do efeito e de algumas considerações biológicas, como a raridade do efeito observado (Hood, 2012).

Caso o valor de PoD (LOAEL, NOAEL ou BMD) associado a outros desfechos de toxicidade sistêmica seja inferior àquele obtido para TR, isso deve ser destacado na caracterização do perigo e esse valor deve ser comparado aos dados de outros estudos nos quais animais adultos foram expostos. Esse mesmo racional se aplica quando o PoD para toxicidade materna é inferior ao obtido para toxicidade no desenvolvimento. Isto é, os dados de TR devem ser discutidos no contexto de outros dados de toxicidade (USEPA, 1991, 1996).

## **10.5. ABORDAGEM ESTRUTURADA PARA A AVALIAÇÃO DE ESTUDOS E CLASSIFICAÇÃO QUANTO À TOXICIDADE REPRODUTIVA**

Nesse item, será detalhada a abordagem a ser seguida pela Anvisa para se alcançar uma conclusão quanto ao potencial de TR de um composto. Primeiramente, serão analisadas as evidências fornecidas pelos estudos isoladamente, com atribuição de nível de preocupação a cada um deles. Em seguida, os estudos serão analisados de forma integrada, considerando todos os dados disponíveis com base na metodologia de peso da evidência. Por fim, a base de dados será categorizada em suficiente e limitada, seguindo, de forma correspondente, os critérios definidos para as categorias de perigo previstas na RDC nº 294/2019 (Quadro 3).

Cabe destacar que se trata de uma abordagem geral para direcionar a análise técnica. Entretanto, todas essas etapas serão efetuadas caso a caso, tendo em vista a complexidade do processo reprodutivo ou de desenvolvimento e a variabilidade dos desfechos investigados. No processo de classificação de perigo, em geral, uma informação mais completa tende a reduzir o nível de preocupação (GHS, 2021). Dessa forma, a disponibilidade de dados adicionais – epidemiológicos, toxicocinéticos, modo e mecanismo de ação – pode contribuir para reduzir o nível de preocupação e resultar em uma classificação menos restritiva. Esses dados podem ainda contribuir para conclusão pela ausência de classificação, caso fique claramente demonstrado que o mecanismo ou modo de ação não tem relevância para humanos, ou que as diferenças no perfil toxicocinético entre animais e humanos são tão acentuadas que os efeitos adversos não ocorrem em humanos. Esses critérios de classificação serão detalhados nos itens seguintes.

### **10.5.1. Atribuição de nível de preocupação às evidências obtidas em cada estudo**

A avaliação geral dos dados de TR é um processo complexo que leva em consideração uma variedade de informações com diferentes graus de importância na definição da natureza e gravidade do perigo. Abaixo, serão descritos os passos a serem seguidos para uma análise sistematizada do conjunto de dados obtidos pelas diferentes categorias de estudos. Essa abordagem é uma adaptação da proposta formulada pelo ECETOC (2002).

- I- Analisar o conjunto de dados de um estudo específico e verificar a ocorrência de um efeito adverso – no desenvolvimento ou na fertilidade – relacionado à exposição. Nesse ponto, deve-se considerar fatores como: qualidade do conjunto de dados, significância estatística e biológica, relação dose-resposta e comparação com dados históricos.
- II- Se nenhum efeito adverso relacionado à ST for verificado, não há necessidade de classificação quanto à toxicidade reprodutiva e deve-se determinar um NOAEL com base nos efeitos tóxicos não relacionados à TR. Caso se verifique algum efeito adverso, tanto no desenvolvimento quanto na fertilidade, deve-se atribuir a ele um nível de preocupação (baixo, moderado ou alto) para caracterizar o perigo (ver anexos I e II).
- III- Analisar o efeito em questão em conjunto com os demais dados obtidos no mesmo estudo. Ou seja, em caso de toxicidade no desenvolvimento, as evidências devem ser consideradas em relação à toxicidade materna (ver item 10.2.2); quanto aos efeitos sobre a reprodução ou fertilidade, deve-se considerar a toxicidade sistêmica ou parental (ver item 10.1.4). Essa segunda etapa de análises pode corroborar o nível de preocupação inicialmente estabelecido (se os efeitos observados no desenvolvimento ou na fertilidade não puderem ser associados causalmente à toxicidade materna, parental ou sistêmica); ou pode reduzir o nível de preocupação inicial (quando a toxicidade materna, parental ou sistêmica for considerada causal ou contributiva).
- IV- Analisar o conjunto de dados no contexto de outros estudos, os quais podem corroborar ou refutar as evidências, ou ainda fornecer informações complementares (toxicocinética, dados mecanísticos de toxicidade sistêmica ou reprodutiva, relevância, ou extração para o homem). Nessa etapa, o nível de preocupação pode ser reduzido se for demonstrada a ocorrência de: 1) efeito específico para a espécie estudada; 2) mecanismo indicativo de que a TR é secundária a outros efeitos tóxicos; ou 3) ausência de reprodutibilidade do efeito. Por outro lado, o nível de preocupação deve ser mantido se resultados semelhantes em doses semelhantes forem relatados em estudos comparáveis (desenho experimental, espécie estudada, via de administração, regime de doses) ou ainda, por exemplo, se evidências histológicas complementares forem relatadas em estudos cujo foco principal não é a análise de TR.

É importante ressaltar que o processo acima descrito se destina a definir o nível intrínseco de preocupação de um estudo específico. Além de resultados positivos e negativos, é possível que um estudo seja considerado equívoco, nos casos em que há dificuldade em dar seguimento, de forma adequada, ao fluxograma (Figura 11) para se obter uma conclusão quanto à TR. Um maior peso na análise de evidência deve ser atribuído a estudos com maior nível de preocupação. Assim, em uma etapa posterior de análise, por meio da abordagem de WoE, todas evidências disponíveis devem ser integradas para se concluir quanto à caracterização da base de dados e à classificação do perigo da ST, conforme será detalhado no item a seguir.

### **10.5.2. Caracterização da base de dados e classificação do perigo**

Finalizada a etapa de análise dos dados disponíveis de toxicidade, deve-se caracterizar a base de dados como sendo suficiente ou insuficiente para julgar o potencial associado à ST em causar TR nas condições de exposição previstas nos estudos avaliados (dose, espaçamento entre doses, via, duração e tempo, em relação ao(s) estágio(s) de vida em que a exposição ocorreu). Ou seja, esse procedimento fornece a base para julgar se os dados disponíveis são suficientes para a caracterização do perigo e condução da análise quantitativa da relação dose-resposta. Essa forma de caracterização das evidências disponíveis é útil na identificação de lacunas de dados das ST enquadradas na categoria insuficiente, bem como no esclarecimento dos pontos fortes e das incertezas em uma base de dados específica. No entanto, nessa etapa ainda não é abordada a natureza e magnitude dos riscos à saúde humana, as quais são determinadas somente após concluída a avaliação da exposição e conduzida a caracterização final do risco (USEPA, 1996; Hood, 2012).

Os critérios para classificar evidências como suficiente ou insuficiente abrangem uma variedade de parâmetros que contribuem para a qualidade geral dos dados. É importante ressaltar que dados de todos os estudos relevantes, indicativos ou não de potencial perigo, devem ser incluídos nessa caracterização. Quando da existência de dados conflitantes, deve-se buscar uma conclusão por meio da análise do peso das evidências dentro do contexto geral da base de dados. A avaliação de dados contraditórios de qualidade comparável que avaliam parâmetros semelhantes deve ser realizada caso a caso, considerando-se as limitações da respectiva fonte dos dados.

Abaixo segue um resumo das principais considerações a serem seguidas na determinação do peso atribuído ao conjunto de evidências disponíveis (USEPA, 1996):

- Dados de qualidade equivalente de exposições humanas recebem maior peso do que dados obtidos de experimentação animal.
- Estudos com exposição adequada quanto a via, nível, duração e frequência; e com análise de todos os desfechos relevantes, recebem maior peso.
- Maior peso é atribuído aos estudos (com qualidade adequada) que demonstram efeitos adversos significativos no comportamento sexual, fertilidade ou desenvolvimento, ou em outros desfechos diretamente relacionados à função reprodutiva, como normalidade do

ciclo menstrual (estral), avaliações de espermatozoides, histopatologia e pesos de órgãos reprodutivos, e endocrinologia reprodutiva.

- Menor peso é atribuído aos estudos que evidenciam efeitos considerados com baixo nível de preocupação, tais como: pequenas alterações em parâmetros espermáticos, na proporção de variações fetais comuns ou no peso fetal; ou pequenas diferenças em parâmetros de desenvolvimento pós-natal.
- Embora um único estudo de alta qualidade possa ser suficiente para se concluir quanto ao potencial de TR, se múltiplos resultados similares estão disponíveis, o consenso aumenta o peso atribuído a esses resultados.
- Verificação de adequabilidade do espaçamento entre doses, de uma relação dose-resposta, significância estatística e plausibilidade biológica confere maior peso às evidências.
- Estudos com maior força estatística e adequada análise estatística recebem maior peso.
- Menor peso é atribuído aos testes *in vitro* ou conduzidos em espécies de não-mamíferos, bem como aos dados de relação estrutura-atividade. Ou seja, esses dados - quando positivos ou negativos – podem ser sugestivos, mas são considerados como evidências insuficientes. Podem ser usados, contudo, no direcionamento de estudos adicionais.

A avaliação do WoE realizada pela Anvisa é baseada também na Estrutura Conceitual para Teste e Avaliação de Desreguladores Endócrinos desenvolvida pela OECD (OECD, 2018), que lista as diretrizes e os métodos de teste da OECD ou de outras autoridades (como a USEPA), propostos ou em desenvolvimento, que podem ser usados para avaliar a desfechos decorrentes de desregulação endócrina, como toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento. Essa Estrutura organiza os dados em cinco níveis de informação, de acordo com a complexidade biológica, os quais ajudam a avaliar as evidências sobre o potencial de desregulação endócrina de uma substância. O nível 1 refere-se a informações gerais sobre a substância, como informações físico-químicas, análise por analogia, relação quantitativa de estrutura-atividade e outras previsões computacionais, além de dados de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Os níveis 2 e 3 englobam, respectivamente, ensaios *in vitro* e ensaios *in vivo* que fornecem dados sobre alguns mecanismos/vias endócrinos. O nível 4 trata de ensaios *in vivo* que fornecem dados sobre efeitos adversos em parâmetros endócrinos relevantes, enquanto os do nível 5 fornecem dados mais abrangentes sobre esses efeitos, em períodos mais extensos do ciclo de vida do organismo. Maior detalhamento sobre essa estrutura é objeto de guia específico de avaliação do potencial de desregulação endócrina de agrotóxicos.

Para ensaios *in vitro*, são levados em consideração o metabolismo, outros processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e a possibilidade de MoAs não abrangidos pelos ensaios realizados. Caso os resultados de dados humanos e *in vitro* sejam contraditórios com os resultados derivados de testes em animais, as diferenças entre espécies devem ser levadas em

consideração. É importante apresentar justificativa que demonstre o peso atribuído aos estudos e/ou outras fontes de dados disponíveis. Em geral, os resultados positivos relevantes não são anulados por resultados negativos sem uma explicação cientificamente sólida e transparente, baseada na análise da plausibilidade biológica. Ainda, as evidências existentes são sistematicamente organizadas em AOP sempre que possível.

O esquema de caracterização, apresentado no Quadro 23, consiste em duas categorias amplas: evidência suficiente e evidência limitada. A categoria de evidência suficiente pode ainda ser subdividida, a depender da disponibilidade de dados em humanos e do peso atribuído a eles. Considera-se primariamente os dados epidemiológicos na determinação de um perigo potencial. Entretanto, tendo em vista que estes são geralmente limitados ou inexistentes, na prática poucas ST são enquadradas na categoria de evidência suficiente em humanos. Frequentemente, no entanto, dados humanos limitados e dados suficientes de animais podem ser usados conjuntamente para caracterizar o perigo de uma ST. Em alguns casos, é possível que dentro de uma base de dados nenhum estudo seja considerado suficiente, porém, quando agrupados, o conjunto de dados pode satisfazer a categoria de evidência suficiente. Dentro de cada categoria do quadro, são descritos critérios mínimos para determinar se os dados são adequados para julgar se uma ST apresenta ou não potencial de causar TR (Hood, 2012).

O enquadramento do conjunto de evidências nas categorias suficiente e limitada prediz a classificação final de perigo da ST, com base na RDC nº 294/2019 (Quadro 3). Essa classificação se destina a compostos que apresentam uma propriedade intrínseca e específica de causar efeitos adversos sobre a reprodução ou sobre o desenvolvimento. Assim, essa classificação não deve ser efetuada para compostos cujos efeitos tóxicos ocorrem somente como consequência inespecífica e secundária a outros efeitos (GHS, 2021).

---

**Quadro 23. Categorização da base de dados disponível para avaliação do potencial de TR.**

**EVIDÊNCIA SUFICIENTE – Categoria 1**

Essa categoria inclui dados que coletivamente fornecem informações suficientes para julgar se há ou não um potencial de TR com relação ao efeito observado, bem como a dose, duração, tempo e via de exposição. Essa categoria pode incluir evidências em humanos e em animais experimentais.

• **Evidência suficiente em humanos – Categoria 1A**

Essa categoria inclui compostos para os quais existem evidências confiáveis, fornecidas por estudos epidemiológicos bem conduzidos (por exemplo, estudos coorte e caso-controle), de efeitos adversos relativos à TR, com enquadramento na categoria 1A. Caso haja uma menor confiança nos dados fornecidos por estudos em humanos, estes devem ser suplementados por dados adequados de estudos em animais experimentais, o que resultaria no enquadramento na categoria 1B, detalhada abaixo.

• **Evidência suficiente em animais experimentais e limitada em humanos – Categoria 1B**

Essa categoria inclui compostos para os quais existem evidências suficientes em animais experimentais e/ou dados limitados em humanos para julgar se a exposição está causalmente relacionada à TR. A fim de se determinar a existência de um perigo potencial e classificar a substância como 1B, considera-se suficiente a

**Quadro 23.** Categorização da base de dados disponível para avaliação do potencial de TR.

obtenção de evidências com nível de preocupação alto/ moderado em um único estudo bem delineado e executado, conduzido em uma única espécie animal. A disponibilidade de dados adicionais de toxicocinética, MoA e/ou AOP pode reduzir o nível de preocupação inicialmente atribuído e resultar em um enquadramento da ST na categoria 2, abaixo detalhada.

**EVIDÊNCIA LIMITADA – Categoria 2**

Essa categoria inclui compostos para os quais as evidências disponíveis de TR em humanos e/ou animais experimentais fornecem evidência de efeito adverso, na ausência de outros efeitos tóxicos na fisiologia reprodutiva ou sobre desenvolvimento embriofetal ou neonatal – ou ainda, caso ocorram em conjunto com outros efeitos tóxicos, os efeitos adversos não são considerados como consequência secundária não específica dos outros efeitos; mas essas evidências não são suficientemente convincentes para o enquadramento na categoria 1. Pode-se citar como exemplos as seguintes situações: I) quando os estudos em animais e humanos disponíveis apresentam limitações no delineamento e/ou na execução capazes de reduzir o peso das evidências obtidas; II) quando os dados são fornecidos por estudos que investigaram apenas um número limitado de desfechos e relataram ausência de efeitos reprodutivos adversos; III) quando os estudos fornecem evidências com nível de preocupação moderado, mas não há consistência quanto aos dados fornecidos por outros estudos; IV) quando os estudos fornecem evidências com nível de preocupação alto, mas que pode ser reduzido para o nível moderado diante de dados mecanísticos comprobatórios de que os efeitos observados na prole decorrem de mecanismos mediados pela mãe ou são associados à toxicidade parental/sistêmica leve; V) ou ainda quando a base de dados se limita a informações sobre relação estrutura-atividade, toxicocinética e estudos de curto prazo ou *in vitro*.

**EVIDÊNCIAS INSUFICIENTES – Não classificado**

Essa categoria inclui compostos para os quais não foram verificadas evidências de TR nos estudos disponíveis, o que resulta na ausência de classificação da ST quanto à TR. As evidências mínimas necessárias para descartar a existência de um potencial perigo de TR incluem dados relativos à análise de uma série de desfechos de reprodução/desenvolvimento, obtidos de estudos multigeracionais e estudos de toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal (em ratos e coelhos), com delineamento e execução conforme previstos nas diretrizes correspondentes, indicando ausência de efeitos reprodutivos/de desenvolvimento em doses que sejam minimamente tóxicas para o animal adulto.

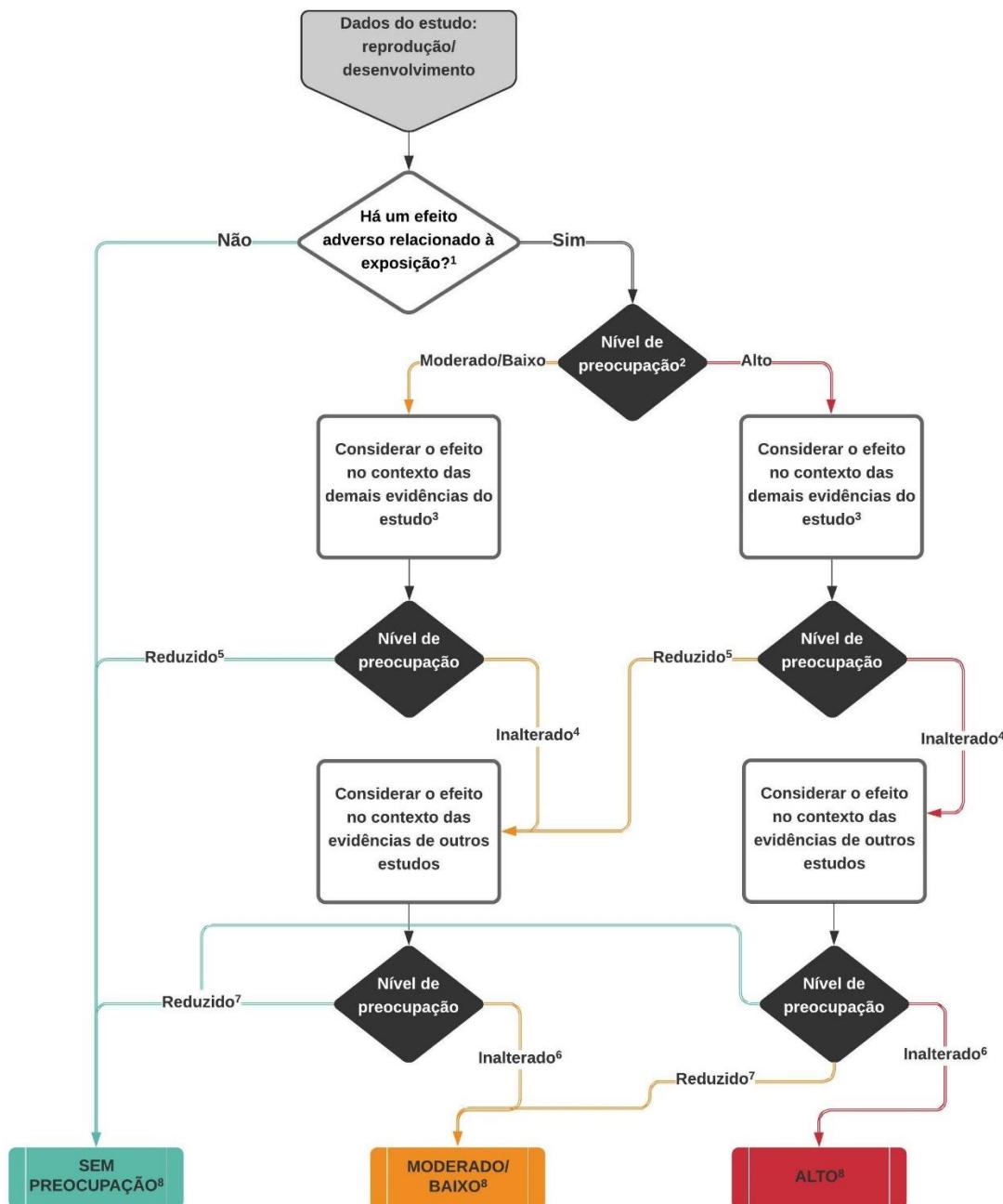
Essa categoria também inclui compostos para os quais as evidências disponíveis de TR em humanos/animais experimentais são consideradas como livre de preocupação ou apresentam um nível baixo a moderado, desde que: I) Dados de toxicidade sejam suficientes para se considerar os efeitos verificados como secundários à toxicidade materna ou parental/sistêmica; II) Dados mecanísticos sejam suficientes para comprovar uma resposta específica para espécie animal estudada e, assim, excluir a relevância para humanos.

Tendo em vista a maior dificuldade, tanto biológica quanto estatística, de embasamento para uma evidência negativa, geralmente são necessários mais dados para reforçar essa conclusão, quando comparado a evidências de potencial perigo de TR, conforme exposto no quadro 23. É importante destacar que a identificação de um perigo de TR não significa que isso ocorrerá em todos os níveis de exposição (devido à suposição de uma dose-resposta não linear, quando respeitado o

espaçamento entre doses) ou em todas as situações (por exemplo, o tipo e o grau de perigo podem variar significativamente, dependendo da via e período de exposição) (USEPA, 1996).

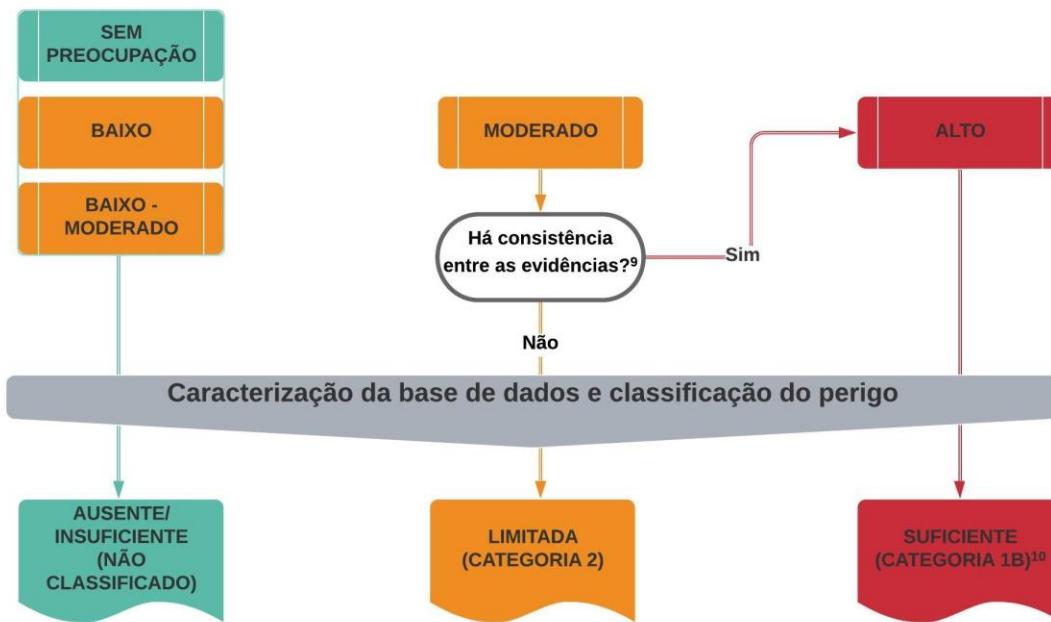
O fluxograma abaixo (Figura 11) resume essa abordagem estruturada, com as etapas a serem seguidas para se alcançar uma conclusão quanto à classificação de perigo de uma ST.

**Figura 11.** Abordagem estruturada para a avaliação das evidências de toxicidade reprodutiva, numa abordagem de peso da evidência e classificação final quanto ao perigo.



## Análise do peso da evidência

Agrupamento, atribuição de peso e integração das evidências



<sup>1</sup> Alterações estatisticamente significativas, relação dose-resposta, relevância biológica, dados históricos, qualidade dos dados;

<sup>2</sup> Verificar anexos I e II – quadros relativos aos desfechos de reprodução e de desenvolvimento;

<sup>3</sup> Contexto: toxicidade materna e toxicidade sistêmica/parental para avaliação do desenvolvimento e fertilidade, respectivamente;

<sup>4</sup> Efeitos não associados causalmente à toxicidade materna ou parental/sistêmica;

<sup>5</sup> Efeitos associados à toxicidade materna ou parental/sistêmica;

<sup>6</sup> Confirmado por outros dados ou estudos;

<sup>7</sup> Comprovação de resposta específica para espécie, obtenção do entendimento mecanicista, efeito não reprodutível;

<sup>8</sup> Níveis de dose nos quais ocorrem efeitos relacionados à reprodução/desenvolvimento; outras vias de administração; diferenças interespécies.

<sup>9</sup> A replicação das evidências por mais de um estudo aumenta o peso atribuído aos resultados.

<sup>10</sup> Quando uma ST for enquadrada como 1B, será necessária uma caracterização adicional, por meio de estudos mecanísticos, toxicocinéticos, dentre outros, o que permitirá comprovar um padrão não linear e determinar um PoD para as análises posteriores.

Além das categorias de classificação de perigo relativas aos efeitos adversos na reprodução/desenvolvimento, a ST pode ser ainda enquadrada na categoria adicional para os efeitos na lactação ou na via de lactação, conforme disposto no Quadro 24.

**Quadro 24.** Categorização adicional para efeitos na lactação ou na via de lactação.

#### **FEFEITOS NA LACTAÇÃO OU NA VIA DE LACTAÇÃO**

Essa categoria inclui compostos que interferem na lactação ou que possam estar presentes no leite materno, incluindo seus metabólitos, em quantidades suficientes para causar preocupação à saúde de crianças lactentes. Para muitas substâncias, não há disponibilidade de informações sobre o potencial de causar efeitos adversos na prole via lactação. Contudo, caso os estudos forneçam essas evidências, a ST deve ser enquadrada nessa categoria adicional, de forma separada da classificação para reprodução, ou no desenvolvimento, para fins de comunicação do perigo.

Essa classificação pode ser atribuída a: I) evidência em humanos indicativa de risco para os lactentes; e/ou II) resultados de estudos de uma ou duas gerações em animais que forneçam evidências claras de efeito adverso na prole devido à transferência no leite ou efeito adverso na qualidade do leite; e/ou (c) estudos toxicocinéticos que indiquem a probabilidade de a substância estar presente em níveis potencialmente tóxicos no leite materno.

### **11. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A avaliação do potencial de TR associado ao ingrediente ativo de agrotóxico será conduzida pela Anvisa com a utilização da abordagem de peso da evidência, efetuada com base em critérios também seguidos por outras autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão. No presente guia, a fim de conferir transparência e previsibilidade ao processo regulatório, foram abordados os principais estudos destinados à investigação de desfechos de reprodução e desenvolvimento, considerados relevantes pela OECD para a caracterização do potencial de TR. Buscou-se incluir as informações básicas relativas à condução de cada um deles, bem como as recomendações para a interpretação dos dados e conclusão a partir do conjunto de informações disponíveis no momento da análise.

Além dos estudos aqui descritos, caso existam outros capazes de esclarecer o potencial de TR de uma substância, estes devem ser incluídos na avaliação do peso de evidência sempre que considerados relevantes para a tomada de decisão. Nesse caso, eles devem ser avaliados quanto às suas limitações, aceitabilidade e resultados, com base nos mesmos fundamentos científicos que permeiam a análise das evidências incluídas nesse guia e com base no conhecimento científico à época da avaliação. Destaca-se que, com o avanço do conhecimento sobre avaliação toxicológica, ensaios ou abordagens de análise alternativas, validadas, suficientemente robustas e aceitas internacionalmente no contexto regulatório também podem fazer parte da avaliação do WoE, substituindo a necessidade de evidências em animais ou humanos.

A ANVISA, sob Ofício n. 302/2017-CG/GADIP/ANVISA que encaminha Nota Técnica nº 3/2017 – DIARE/ANVISA, manifestou-se contrária à publicação da Resolução Normativa do CONCEA RN 31, de 18 de agosto de 2016, quanto à publicação dos testes OECD TG 421 e OECD TG 422 como

métodos alternativos. A ANVISA, as Agências Regulatórias Internacionais e a OECD não consideram os testes toxicológicos descritos nos protocolos OECD TG 421 (2016) e OECD TG 422 (2016) como métodos alternativos aos testes toxicológicos OECD TG 414, OECD TG 415, OECD TG 416 e OECD TG 443 (Processo n.: 25351.053371201/79-6).

Com relação à abordagem de peso da evidência, serão consideradas a qualidade, a consistência, a reproduzibilidade, a magnitude da resposta, a dose-resposta e a relevância dos achados provenientes dos estudos disponíveis. Ainda, será atribuído maior peso aos estudos epidemiológicos bem delineados e aos estudos em animais com desenho experimental adequado (espécie, regime de doses, via e tempo de exposição) e que evidenciem efeitos adversos em quaisquer desfechos diretamente relacionados à função reprodutiva/desenvolvimento.

Especificamente quanto ao procedimento a ser adotado pela Anvisa para a avaliação da TR na reavaliação, inicialmente serão consideradas as conclusões das análises efetuadas pela USEPA e EFSA, quando disponíveis, bem como de outras autoridades regulatórias internacionais. Além da qualidade e da força das evidências fornecidas por cada estudo individualmente, será considerada também a adequabilidade dessas avaliações internacionais ao contexto regulatório no Brasil. Assim, em caso de alinhamento entre as discussões internacionais e de concordância com a abordagem do peso da evidência conduzida pela Anvisa, as conclusões dessa agência serão alcançadas exclusivamente com base nas discussões internacionais. Por outro lado, em caso de discordâncias relevantes entre as autoridades internacionais; superficialidade da análise ou discrepâncias no modo de avaliação da qualidade dos estudos; diferenças significativas na quantidade de estudos incluídos nas análises e existência de novas evidências; a Anvisa realizará uma análise completa e aprofundada de todos os estudos relevantes disponíveis – em uma abordagem de peso da evidência – para se concluir quanto ao potencial de TR associado ao ingrediente ativo de agrotóxico.

Por meio da abordagem estruturada a ser seguida e a partir das conclusões obtidas quanto ao potencial de TR, os ingredientes ativos poderão classificados nas categorias de perigo 1A, 1B ou 2, conforme disposto na RDC nº 294/2019. Poderão ainda ser enquadrados na categoria adicional para efeitos na lactação ou na via de lactação, ou não serem enquadrados em nenhuma dessas categorias, caso se conclua pela ausência de potencial de TR associado à sua exposição.

A avaliação dose-resposta para TR é realizada conforme diretrizes do Guia de determinação de PoD e derivação de doses de referência. Modelos de relatórios a serem elaborados pelas empresas registrantes para ingredientes ativos em reavaliação são disponibilizados no portal eletrônico da Anvisa.

## **12. LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**ADME:** absorção, distribuição, metabolismo e excreção

**AO:** Adverse outcome (Evento adverso)

**AOP:** Adverse outcome pathway (Via do efeito adverso)

**ALT:** Alanina aminotransferase

**AR:** Avaliação de risco

**AST:** Aspartato aminotransferase

**BHE:** Barreira hematoencefálica

**BHT:** Barreira hematotesticular

**BMD:** Benchmark dose

**DG:** Dia gestacional

**DL:** Dia lactacional

**DNT:** Developmental neurotoxicity (Neurotoxicidade para o desenvolvimento)

**DNT IVB:** Developmental Neurotoxicity In Vitro Battery (bateria de testes *in vitro* de neurotoxicidade para o desenvolvimento)

**DPN:** Dia pós-natal

**DAG:** Distância anogenital

**DMT:** Dose máxima tolerada

**EFSA:** European Food Safety Authority (Autoridade Europeia para Segurança Alimentar)

**FSH:** Follicle-stimulating hormone (Hormônio folículo estimulante)

**HHG:** Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

**IATA:** Integrated Approaches to Testing and Assessment (Abordagens Integradas para Testes e Avaliação).

**KE:** Key event (evento-chave)

**KER:** Key event relationship (relação entre eventos-chave)

**LH:** Luteinizing hormone (Hormônio luteinizante)

**LOAEL:** Lowest observed adverse effect level (Dose mais baixa de efeito adverso observável)

**MIE:** Molecular initiating event (Efeito Molecular Iniciador)

**MoA:** Mode of action (Modo de ação)

**MoE:** Margin of exposure (Margem de exposição)

**Modelo PBPK:** Physiologically-based pharmacokinetic model (modelagem farmacocinética de base fisiológica)

**NAMs:** New Approach Methodologies (novas abordagens metodológicas)

**NOAEL:** No observed adverse effect level (Dose sem efeito adverso observável)

**OECD:** Organisation for Economic Co-operation and Development (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

**PoD:** Point of Departure (Ponto de partida)

**(Q)SAR:** Quantitative Structure–Activity Relationship Model (Modelo da Relação Quantitativa Estrutura-Atividade)

**ST:** Substância teste

**SNC:** Sistema nervoso central

**SNP:** Sistema nervoso periférico

**TR:** Toxicidade reprodutiva

**USEPA:** *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

**WoE:** *Weight of Evidence* (Peso da evidência)

### 13. GLOSSÁRIO

Ablefaria: Ausência das pálpebras (geralmente congênita).

Acefalia: Anomalia caracterizada pela ausência do crânio.

Acardia: Ausência congênita de coração.

Adactilia: Ausência de dedos.

Agenesia: Atrofia de um órgão ou tecido por interrupção do desenvolvimento na fase embrionária.

Amelia: Ausência congênita total de um ou mais membros do corpo (braços ou pernas).

Agnatia: Ausência congênita do maxilar inferior.

Anencefalia: Anomalia caracterizada pela ausência total ou parcial do encéfalo.

Anotia: Ausência congênita das orelhas.

Anoftalmia: Ausência congênita do globo ocular.

Azoospermia: Ausência de espermatozoides ativos no sêmen ejaculado.

Braquidactilia: Encurtamento, em proporções anormais, dos dedos nas mãos e pés.

Cardiomegalia: Aumento do tamanho do coração em proporções anormais.

Craniósquise: Fenda congênita nas suturas cranianas.

Cranioraquísquise: Fenda congênita no crânio e na raque.

Dextrocardia: Anomalia congênita relativamente rara em que o coração está posicionado para o lado direito do corpo.

Distocia: Qualquer problema, tanto de origem materna quanto fetal, que dificulte ou impeça o parto.

Ectrodactilia: Ausência de um ou mais dedos centrais das mãos ou dos pés.

Estérnebra: Cada um dos elementos que primitivamente constituem o esterno e que se unem durante o desenvolvimento do osso, tornando-se suas peças menores.

Exencefalia: Posicionamento do encéfalo, em grande parte, fora da caixa craniana.

Exoftalmia: Protusão anormal do globo ocular.

Gastrosquise: Alteração da parede abdominal anterior, caracterizada pela presença de uma abertura localizada na junção da cicatriz umbilical com a pele normal e à direita do umbigo, tornando possível a extrusão de vísceras abdominais, como estômago e intestinos, as quais não ficam recobertas pelo saco peritoneal.

Hepatomegalia: Aumento anormal do tamanho do fígado.

Hidropericárdio: Acumulação excessiva de líquido seroso no pericárdio.

Hidronefrose: Dilatação da pélvis e dos cálices renais, como consequência da obstrução do trato urinário.

Hidroureter: Dilatação anormal do ureter por acumulação de urina devido a um obstáculo à sua eliminação.

Hidrometra: Alteração uterina que leva ao acúmulo de líquido dentro do órgão.

Macroftalmia: Aumento anormal do tamanho do globo ocular.

Meningoencefalocele: Protusão do encéfalo ou de parte das meninges por meio de uma abertura ou falha no crânio.

Microftalmia: Redução anormal do tamanho do globo ocular.

Micrognatia: Mandíbula em tamanho menor que o normal.

Oligospermia: Redução na quantidade dos espermatozoides presentes no líquido ejaculado.

Onfalocele: Hérnia umbilical (alteração da parede abdominal em que as vísceras saem por meio da base do cordão umbilical, com a formação de uma hérnia para dentro do saco peritoneal).

Orquite: Denominação genérica de qualquer tipo de inflamação nos testículos.

Polidactilia: Presença de um dedo adicional no membro inferior ou superior do indivíduo.

Polidrâmio: Excesso de líquido amniótico no útero.

*Situs inversus*: Transposição de um lado para o outro em torno do plano sagital de todas ou algumas estruturas do tórax e do Abdômen.

Tampão vaginal: Massa esbranquiçada de espermatozoides encontrada na abertura vaginal e indicativa da ocorrência de acasalamento.

## 14. REFERÊNCIAS

**Beekhuijzen, M.; Zmarowski, A.; Emmen, H.; Frieling, W.** To mate or not to mate: a retrospective analysis of two generation studies for evaluation of criteria to trigger additional mating in the extended one-generation design. *Reprod Toxicol.*, 28(2):203-8; **2009**.

**Beekhuijzen M.** The era of 3Rs implementation in developmental and reproductive toxicity (DART) testing: Current overview and future perspectives. *Reprod Toxicol.*;72:86-96; **2017**.

**BRASIL.** Lei nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins; revoga as Leis nºs 7.802, de 11 de julho de 1989, e 9.974, de 6 de junho de 2000, e partes de anexos das Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, e 9.782, de 26 de janeiro de 1999. D.O.U página: 28 de 28/12/2023.

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 221, de 28 de março de 2018. Dispõe sobre os critérios e os procedimentos para o processo de reavaliação toxicológica de ingredientes ativos de agrotóxicos no âmbito da Anvisa. D.O.U. - Edição: 61, de 29/03/2018.

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica

de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. D.O.U. - Edição: 146, Seção: 1, Página: 78 de 31/07/2019.

**BRASIL.** Ministério da Saúde. Anvisa. RDC nº 296, de 29 de julho de 2019. Dispõe sobre as informações toxicológicas para rótulos e bulas de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira. D.O.U. - Edição: 146, Seção: 1, Página: 86 de 31/07/2019.

**EC. European Comission.** Temporal aspects in the testing of chemicals for endocrine disrupting effects (in relation to human health and the environment). Final Report, 27/11/2017. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/58430e34-f4ef-11e7-be11-01aa75ed71a1/language-en>.

**ECETOC. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.** Guidance on Evaluation of Reproductive Toxicity Data. Monograph No. 31. ISSN-0773-6347-31. **2002**

**ECHA. European Chemicals Agency.** Guidance for Human Health Risk Assessment for Biocidal Active Substances and Biocidal Products. Guidance on the BPR: Volume III Assessment & Evaluation (Parts B+C) Version 2.1. ECHA-13-G-18-EN. February, **2017**

**ECHA. European Chemicals Agency.** Evaluating Results from 55 Extended One-Generation Reproductive Toxicity Studies under REACH: Final Report of the EOGRTS Review Project. ECHA-23-R-04-EM. doi:10.2823/92503; March, **2023**.

**EFSA. European Food Safety Authority.** Guidance on the use of the weight of evidence approach in scientific assessments. EFSA-Q-2015-00007. **2017**

**EFSA. European Food Safety Authority.** Scientific Opinion of the PPR Panel on the follow-up of the findings of the External Scientific Report 'Literature review of epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects'. EFSA Journal,15(10):5007. **2017**.

**EFSA. European Food Safety Authority.** Evidence integration in risk assessment: the science of combining apples and oranges. EFSA/EBTC colloquium on evidence integration in risk assessment. EFSA-Q-2017-00712. **2018**

**EU. European Union.** Regulation (EC) Nº 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. Official Journal of the European Union, L309, p.1-50. 24/11/2009.

**GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals.** ST/SG/AC.10/30/Rev.9. United Nations, **2021**.

**HOOD, Ronald D.** Developmental and reproductive toxicology a practical approach: a practical approach. 3. ed. London: Informa Healthcare, **2012**.

**IARC. International Agency for Research on Cancer.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Preamble, Lyon, France, **2006**.

**IARC. International Agency for Research on Cancer,** World Health Organization. Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Preamble, Lyon, France, **2019**.

**OECD (2001),** Test No. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

**OECD (1996),** Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070981-en>.

**OECD (2007),** Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264067394-en>.

**OECD (2008)**, Guidance document on mammalian reproductive toxicity testing and assessment. ENV/JM/MONO(2008)16. Series on testing and assessment. Number 43.

**OECD (2013)**, Guidance document supporting OECD Test Guideline 443 on the extended one generation reproductive toxicity test. ENV/JM/MONO(2013)10. Series on testing and assessment. Number 151.

**OECD (2016)**, Test No. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

**OECD (2018)**, Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185371-en>.

**OECD (2018)**, Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070820-en>.

**OECD (2018)**, Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>.

**OECD (2023)**, Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) *In-Vitro* Testing Battery. Series on Testing and Assessment No. 377. ENV/CBC/MONO(2023)13.

**Piersma, A.H.; Baker, N.C.; Daston, G.P., et al.** Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity. *Curr Res Toxicol.* 3:100074; **2022**. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crtox.2022.100074>.

**Sachana, M.; Shafer, T.J.; Terron, A.** Toward a Better Testing Paradigm for Developmental Neurotoxicity: OECD Efforts and Regulatory Considerations. *Biology (Basel)*. 10(2):86; **2021**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency.** Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. EPA/600/FR-91/001. December, **1991**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency.** Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. EPA/630/R-96/009. October, **1996**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency.** Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.6300 Developmental Neurotoxicity Study. EPA 712-C-98-239. August, **1998**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency,** Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, **2005**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency.** Office of Pesticide Programs' Framework for Incorporating Human Epidemiologic & Incident Data in Risk Assessments for Pesticides. December, **2016**.

**USEPA. United States Environmental Protection Agency.** Benchmark Dose Technical Guidance. EPA/100/R-12/001. June, **2012**.

## ANEXO I

**Quadro 1.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade reprodutiva.

<b>1. Peso dos órgãos</b>			
<b>Órgão</b>	<b>Evidência</b>	<b>Nível de preocupação</b>	<b>Observação</b>
Testículo, epidídimo, vesículas seminais, próstata, glândula de coagulação; Útero e ovário	Alteração do peso	Moderado, quando não reforçada por outros dados; Ausente, quando há redução intensa do peso corporal e não é reforçada por outros dados.	Para os órgãos femininos, deve-se correlacionar com a fase do ciclo sexual.
Hipófise	Alteração do peso	Moderado, quando não reforçado por outros dados.	-
<b>2. Alterações macroscópicas</b>			
<b>Órgão</b>	<b>Evidência</b>	<b>Nível de preocupação</b>	<b>Observação</b>
Testículos	Alteração do tamanho	Moderado, quando não reforçada por outros dados (excluindo peso do testículo); Ausente, quando há redução intensa do peso corporal e não é reforçada por outros dados.	-
	Alteração da consistência	Baixo, quando não reforçada por outros dados.	-
Útero	Acúmulo de líquidos	Alto, quando não há relação com ciclo sexual.	-
Ovários	Alteração do tamanho	Moderado, quando não reforçada por outros dados (excluindo o peso do ovário); Ausente, quando há redução intensa do peso corporal e não é reforçada por outros dados.	-
<b>3. Histopatologia</b>			
<b>Órgão</b>	<b>Evidência</b>	<b>Nível de preocupação</b>	<b>Observação</b>
Testículo	Degeneração/necrose do epitélio germinativo; Alteração da maturação espermática.	Alto, se multifocal ou difusa, bilateral.	-
	Azoospermia	Alto	-
	Oligospermia	Alto, se moderada a grave, multifocal ou difusa, bilateral.	-
	Degeneração/necrose/ nº reduzido de células de Sertoli	Alto, se multifocal ou difusa, bilateral.	Difícil avaliação quantitativa
	Orquite	Alto, se multifocal ou difusa, bilateral	-
Epidídimo	Inflamação e fibrose	Alto, se multifocal ou difusa, bilateral	-
	Acúmulo de detritos no lúmen dos túbulos; Granulomas espermáticos	Alto, se bilateral.	-

**Quadro 1.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade reprodutiva.

<b>Próstata</b>	Atrofia	Alto, se difusa.	-
	Inflamação	Alto, se multifocal ou difusa.	-
	Hipertrofia Redução da secreção prostática	Moderado, quando não reforçada por outros dados.	-
<b>Vesículas seminais e glândula de coagulação;</b>	Hipotrofia/atrofia Hiperplasia focal	Moderado, quando não reforçada por outros dados.	Ver próstata
<b>Ovário</b>	Interrupção do ciclo ovariano (redução/ ausência de folículos secundários e/ou terciários)	Alto	Ver ciclo estral
	Cisto de folículo/ de corpo lúteo	Moderado, se múltiplo e bilateral	Ver ciclo estral
<b>Útero</b>	Atrofia	Alto	Ver ciclo estral
	Inflamação/piometra, se moderada ou grave	Moderado	Ver ciclo estral
	Hiperplasia Hidrometra	Moderado, quando não reforçada por outros dados.	Ver ciclo estral
<b>Hipófise</b>	Células do lobo anterior com citoplasma vacuolado; presença de células de Crooke	Alto	Sinal de degeneração e/ou desregulações endócrinas
	Atrofia de basófilos no lobo anterior	Alto	Perturbação do eixo HHG

#### 4. Parâmetros gerais

Desfecho	Parâmetro alterado	Nível de preocupação	Observação
<b>Desenvolvimento sexual/reprodutivo</b>	Momento de abertura vaginal e separação prepucial	Alto, se não relacionado a alterações no peso corporal	Geração F1
	DAG	Alto, no caso de mudança na razão entre sexos e/ou no desenvolvimento sexual	Geração F2
<b>Ciclo estral</b>	Duração do ciclo	Baixo, quando não reforçado por outros dados.	Depende das concentrações hormonais sanguíneas
<b>Índices reprodutivos</b>	Período gestacional	Baixo a moderado, quando não acompanhado por alteração no comportamento sexual/ de acasalamento	-
	Tempo para acasalamento	Alto, quando não relacionado à toxicidade sistêmica e observado em uma dose que não causa toxicidade parental.	Alterações hormonais podem prolongar o tempo para acasalamento (ver ciclo estral)
	Índice de acasalamento		
	Índice de fertilidade		
	Perda perinatal		
<b>Parâmetros espermáticos</b>	Perda pré-natal		
	Tamanho da ninhada ao nascer		
<b>Desenvolvimento pós-natal</b>	Nº de espermátides resistentes à homogeneização e de reservas de espermatozoides no epidídimos caudal	Baixo a moderado, quando não reforçado por outros dados.	-
	Motilidade, contagem, morfologia		
	Sobrevivência durante a lactação/ desmame	Alto, quando não relacionado à toxicidade sistêmica e observado em uma dose que não causa toxicidade parental.	-
	Peso corporal ganho de peso corporal;		-
	Condição clínica		-

## ANEXO II

**Quadro 1.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais externas

Anormalidades e malformações <sup>1</sup> – Nível de preocupação: Alto		
Geral	Tronco	Crânio
Edema generalizado Feto pequeno (metade do tamanho dos demais da ninhada) Gêmeos siameses Aplasia cútis congênita Hemorragia/hematoma Oligo/polidrâmnio	Atresia anal (imperfuração) Craniorraquísque Gastrosquise DAG aumentada/diminuída Onfalocele Espinha bífida Hérnia umbilical Escoliose	Acefalia Anencefalia Craniosquise Exencefalia Macrocefalia Meningoencefalocele Microcefalia
Orelha	Olho	Nariz
Anotia (agenesia) Macrotia (ampliada) Microtia (reduzida) Pina deformada Posicionamento incorreto	Ablefaria Anoftalmia Exoftalmia Macroftalmia Microftalmia	Arrinia (agenesia) Posicionamento incorreto Deformação Narina única Atresia da narina (imperfurada)
Boca e mandíbula	Membro superior/inferior, mão/pé e dedo	Rabo
Agnatia (agenesia) Micrognatia Lábio leporino Fenda palatina Protusão da língua	Adactilia Amelia (agenesia) Braquidactilia Ectrodactilia (oligodactilia) Focomelia Polidactilia Tálide equinovaro (pé torto)	Acaudado (agenesia) Enrolado/torcido Fino Curto

<sup>1</sup> Os termos entre parênteses são sinônimos ou explicações.

**Quadro 2:** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais esqueléticas.

Variações e retardos <sup>1</sup> Nível de preocupação: baixo a moderado <sup>2</sup>	Anormalidades e malformações <sup>1</sup> Nível de preocupação: Alto
Crânio	Crânio
<ul style="list-style-type: none"> <li>Osso hióide: Ossificação incompleta (reduzida)</li> <li>Ossos do crânio: Pequeno (hipoplásico, rudimentar, reduzido) Ossificação incompleta (reduzida)</li> <li>Fontanela (moleira): Ampliada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Osso hióide: Agenesia (ausente) Deformação</li> <li>Ossos do crânio: Agenesia (ausente) Deformação</li> <li>Fontanela (moleira): Fechada</li> </ul>

**Quadro 2:** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais esqueléticas.

Coluna vertebral	Coluna vertebral
<ul style="list-style-type: none"> <li>Atlas (C1), axis (C2):           <ul style="list-style-type: none"> <li>Pequeno (hipoplásico, rudimentar, reduzido)</li> <li>Ossificação incompleta (reduzida)</li> </ul> </li> <li>Alterações no corpo vertebral<sup>3</sup>:           <ul style="list-style-type: none"> <li>Bipartido (dois centros de ossificação)</li> <li>Formato <i>dumb-bell</i></li> <li>Ossificação incompleta (reduzida)</li> <li>Supranumerário (adicional)</li> </ul> </li> <li>Alterações no arco vertebral:           <ul style="list-style-type: none"> <li>Pequeno (hipoplásico, rudimentar, reduzido)</li> <li>Ossificação incompleta (reduzida)</li> <li>Supranumerário (adicional)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Atlas (C1), axis (C2):           <ul style="list-style-type: none"> <li>Agenesia (ausente)</li> <li>Desalinhamento</li> <li>Deformação</li> </ul> </li> <li>Alterações no corpo vertebral<sup>3</sup>:           <ul style="list-style-type: none"> <li>Agenesia (ausente)</li> <li>Fusão</li> <li>Hemicêntrico (assimétrico, unilateral)</li> <li>Desalinhamento</li> <li>Deformação</li> </ul> </li> <li>Alterações no arco vertebral:           <ul style="list-style-type: none"> <li>Agenesia (ausente)</li> <li>Fusão</li> <li>Desalinhamento</li> <li>Deformação</li> </ul> </li> </ul>
Costela	Costela
Tortuosidade Costela cervical Descontinuidade (incompleta) Encurtamento (rudimentar) Ossificação incompleta (reduzida) Supranumerária (adicional) Espessamento	Agenesia (ausente) Ramificação (bifurcada, dividida) Fusão Desalinhamento Deformação
Esternébra	Estérnebra
Ossificação bipartida Ossificação extra Ossificação incompleta (reduzida) Ausência de ossificação	Agenesia (ausente) Posicionamento incorreto Desalinhamento (severo) Deformação Fendas esternais
Clavícula, escápula	Clavícula, escápula
Dobra (angulação) Pequena Ossificação incompleta (reduzida) Aumentada	Agenesia (ausente) Deformação Ausência de ossificação
Ílio, ískio, púbis	Ílio, ískio, púbis
Pequeno (hipoplásico, rudimentar, reduzido) Ossificação incompleta (reduzida) Aumentada Ausência de ossificação (púbis) Desalinhado	Agenesia (ausente) Desalinhamento (ílio, ískio) Deformação
Extremidades <sup>4</sup>	Extremidades <sup>4</sup>
Ossificação incompleta (reduzida) Ausência de ossificação (se restrito aos ossos distais das falanges)	Agenesia (ausente) Tortuosidade Fundida Posicionamento incorreto Deformação Supranumerário (adicional) Aumentada

<sup>1</sup> Os termos entre parênteses são sinônimos ou explicações.

<sup>2</sup> As evidências também podem suscitar elevada preocupação, dependendo do órgão afetado e da frequência.

<sup>3</sup> Cervical, torácica, lombar, sacral/caudal.

<sup>4</sup> Alteração de ossos individuais.

**Quadro 3.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais viscerais.

Variações e retardos <sup>1</sup> Nível de preocupação: baixo a moderado <sup>2</sup>	Anormalidades e malformações <sup>1</sup> Nível de preocupação: Alto
<b>Geral</b>	<b>Geral</b>
Dilatação Hemorragia Tamanho reduzido Descoloração	Agenesia (ausente) Aneurisma Presença de líquido na cavidade abdominal (ascite; hemorragia) Congestão (se excessiva e generalizada) Posicionamento incorreto Fístula <i>Situs inversus</i> Estenose
<b>Secções coronais (cabeça)</b>	<b>Secções coronais (cabeça)</b>
Alterações do cérebro: Dilatação leve do ventrículo cerebral (<2 vezes o tamanho normal)	Alterações do cérebro: Assimetria Tamanho reduzido (hipoplásico, rudimentar) Deformação Hidrocefalia (interna, externa)
<b>Alteração da cavidade nasal</b>	<b>Alteração da cavidade nasal</b>
Dilatação leve (<2x tamanho normal; não visível externamente)	Tamanho reduzido Agenesia (ausência de septo nasal e/ou concha) Malformação do septo nasal e/ou concha
<b>Timo</b>	<b>Timo</b>
Resíduos Assimetria	Agenesia (ausente) Divisão (bipartido) Posicionamento incorreto Deformação Tamanho aumentado (> 2x normal) Tamanho reduzido (< 2x normal)
<b>Pulmão e traqueia</b>	<b>Pulmão e traqueia</b>
Lobo(s) aumentado(s) Lobos anormais (lobos fundidos se <3 lobos afetados) Descoloração/palidez Lobo(s) supranumerário (s) (se <2)	Agenesia (ausente) Hemorragia Tamanho reduzido Deformação Unilobular Posicionamento incorreto Estreitamento (estenose)
<b>Coração</b>	<b>Coração</b>
Óstio aumentado	Acardia Defeito do septo atrial e/ou ventricular Cardiomegalia Dextrocardia/Posicionamento incorreto Hidropericárdio Alteração valvar, ventricular, atrial (Deformação) Tamanho reduzido (Hipoplasia)
<b>Vasos sanguíneos<sup>3</sup></b>	<b>Vasos sanguíneos<sup>3</sup></b>
Variação de ramificação Dilatação (<2x tamanho normal) Encurtamento (de comprimento) Supranumerário (pequenos vasos)	Agenesia (ausente) Dilatação (diâmetro > 50% do normal) Hipoplasia Estreitamento (estenose)/ Interrupção Posicionamento incorreto Persistência do canal arterial Aneurisma

**Quadro 3.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais viscerais.

Diafragma	Diafragma
-	Agenesia (ausente) Hérnia diafragmática
Fígado	Fígado
Lobo(s) aumentado(s) Lóbulos fundidos (<3) Descoloração/palidez Lobo Supranumerário	Agenesia (ausente) Hemorragia Hepatomegalia Necrose isquêmica do parênquima hepático Posicionamento incorreto Deformação Tamanho reduzido
Vesícula biliar	Vesícula biliar
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações do duto biliar: Alongamento Encurtamento</li> <li>Alterações da vesícula biliar: Ausente (agenesia/aplasia) (somente coelho) Tamanho aumentado/reduzido (hipoplasia)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações do duto biliar: Agenesia (ausente) Deformação</li> <li>Alterações da vesícula biliar: Supranumerária Deformação</li> </ul>
Aparelho Digestivo <sup>4</sup>	Aparelho Digestivo <sup>4</sup>
-	Agenesia (ausente) Atresia (imperfurado) Presença de divertículo e/ou fístula Ampliação/estreitamento Posicionamento incorreto
Baço	Baço
Descoloração Supranumerário (em coelhos)	Ausente (asplenia, agenesia) Deformação Posicionamento incorreto Tamanho reduzido/aumentado (esplenomegalia)
Glândula adrenal	Glândula adrenal
Posicionamento incorreto Tamanho aumentado	Agenesia (ausente) Fusão
Rim	Rim
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações nos rins: -</li> <li>Alterações na pelve renal: Dilatação leve (papila renal ainda visível) Papila renal reduzida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações nos rins: Agenesia (ausente)/Supranumerário Tamanho aumentado/reduzido Fusão Hidronefrose Posicionamento incorreto/Deformação</li> <li>Alterações na pelve renal: Dilatação (papila renal não visível) Deformação</li> </ul>
Ureter e bexiga	Ureter e bexiga
<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações do ureter: Tortuosidade Dilatação (se não for por obstrução distal)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alterações do ureter: Agenesia (ausente) Duplicação Dilatação (hidroureter)</li> <li>Alterações da bexiga: Acistia (ausente) Tamanho aumentado/reduzido</li> </ul>

**Quadro 3.** Classificação quanto ao nível de preocupação dos parâmetros avaliados nos estudos de toxicidade no desenvolvimento: Evidências morfológicas fetais viscerais.

Órgãos sexuais <sup>5</sup>	Órgãos sexuais <sup>5</sup>
-	Agenesia (ausente) Tamanho aumentado/reduzido Hemorragia Posicionamento incorreto (deslocado, ectópico) Deformação Supernumerário

<sup>1</sup> Os termos entre parênteses são sinônimos ou explicações.

<sup>2</sup> As evidências também podem suscitar elevada preocupação, dependendo do órgão afetado e da frequência.

<sup>3</sup> Alterações da aorta, arco aórtico, carótida, canal arterial, artéria pulmonar, subclávia, veia cava, outras.

<sup>4</sup> Alterações da língua, esôfago, estômago, intestinos, pâncreas, reto.

<sup>5</sup> Ovário, oviduto, corno uterino, testículo, epidídimos, vaso deferente.

### ANEXO III

#### 1. DESENVOLVIMENTO DE REFLEXOS E ONTOGÊNESE COMPORTAMENTAL:

**Quadro 1.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação da ontogênese de reflexos e de outros comportamentos.

TIPO DE TESTE	DESCRÍÇÃO	DESFECHOS	IDADE DE ANÁLISE (DPN) <sup>1</sup>
<b>Reflexo de endireitamento em superfície</b>	Posicionar o animal em decúbito dorsal numa superfície plana e verificar a ocorrência ou não da resposta de retorno à posição de decúbito ventral, bem como o tempo gasto nessa tarefa.	Habilidades neuromotoras	2-4
<b>Reflexo de geotaxia negativa</b>	Posicionar o animal em plano inclinado com a cabeça direcionada para baixo e verificar a ocorrência da resposta de giro 180°, bem como o tempo gasto nessa tarefa.	Habilidades neuromotoras Desenvolvimento de reflexos	7-10
<b>Reflexo de retorno</b>	Posicionar o animal entre a sua gaiola de residência e uma gaiola nova e verificar a escolha, bem como o tempo gasto nessa tarefa.	Habilidades neuromotoras Desenvolvimento de reflexos Função sensorial (odor)	6-10
<b>Reflexo de endireitamento no pouso</b>	Soltar o animal de uma posição em decúbito dorsal e medir sua capacidade de pouso sobre quatro apoios.	Habilidades neuromotoras Desenvolvimento de reflexos	12-17
<b>Reflexo auditivo de sobressalto</b>	Expor o animal a um som (alto e súbito) e medir a ocorrência e a latência da resposta de sobressalto.	Habilidades neuromotoras Desenvolvimento de reflexos	10-14
<b>Ontogênese da habilidade de nado</b>	Pontuar diferentes estágios de desenvolvimento da habilidade de natação (medir posição corporal, uso dos membros e direção de locomoção).	Habilidades neuromotoras Desenvolvimento de reflexos	6-25
<b>Atividade motora</b>	Posicionar os animais em campo aberto e medir atividade espontânea e habituação <sup>2</sup> intrassessão por tempo predeterminado.	Habilidades neuromotoras	13-21

<sup>1</sup> Recomendações gerais.

<sup>2</sup> Definida como uma redução da atividade ao longo do tempo em uma única sessão de teste. Pode ser avaliada comparando-se os níveis de atividade em intervalos consecutivos da sessão de teste, a qual deve ter duração suficiente para se detectar essa habituação. A inclusão desse teste na avaliação da ontogênese comportamental se deve ao fato de a habituação intrassessão geralmente ser ausente em animais muito jovens (por exemplo, DPN 12) e se desenvolver em animais desmamados.

## 2. ATIVIDADE MOTORA

**Quadro 2.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação da atividade motora.

TIPO DE TESTE	DESCRÍÇÃO	DESFECHOS
<b>Campo aberto<sup>1</sup> (arena quadrada ou circular)</b>	Posicionar o animal no aparato e registrar os parâmetros de atividade motora: distância total percorrida, frequência de se locomover, de levantar ( <i>rearing</i> – levantamento das patas dianteiras) e de defecar; tempo total de atividade, descanso, imobilidade ( <i>freezing</i> ) e de levantar. Essa análise pode ser feita por períodos curtos (por exemplo, 2 min), apropriados para uma avaliação clínica detalhada; ou mais longos (por exemplo, 30 min), para avaliar a atividade motora em si e sua habituação.	Atividade de curto ou longo prazo; Não diferencia entre locomoção e exploração.
<b>Prancha com orifícios (Hole board: arena semelhante ao campo aberto, com orifícios no piso)</b>	Posicionar o animal no aparato e registrar, além dos parâmetros observados no campo aberto, o tempo gasto na exploração dos orifícios (comportamento de imersão de cabeça – <i>head-dipping</i> ). Uma variação possível é inserir alimentos abaixo de alguns desses orifícios, de modo a ser possível avaliar também a memória.	Atividade de curto ou longo prazo; Diferencia entre exploração e locomoção.
<b>Labirinto radial de 8 braços<sup>2</sup> (plataforma central conectada com oito braços dispostos radialmente)</b>	Posicionar o animal no centro do aparato e registrar a entrada em cada um dos braços em busca do reforço. É uma tarefa motivada por alimentação.	Atividade de curto ou longo prazo; Locomoção e aprendizado.
<b>Labirinto em 8 (Figure-8 maze)<sup>3</sup> (conjunto de corredores organizados como figura 8, geralmente com dois corredores sem saída adicionais projetando-se para fora a partir do cruzamento central)</b>	Posicionar o animal no centro do aparato e registrar sua atividade locomotora total, bem como a proporção de atividade em vários locais do labirinto (por exemplo, nos becos sem saída). Isso pode ser feito por meio de feixes fotográficos localizados no labirinto e de sistema de gravação de vídeo.	Atividade de longo prazo.
<b>Nova gaiola (novel cage) (gaiola padrão, similar à de residência, limpa)</b>	Posicionar o animal no aparato e registrar a atividade locomotora por períodos mais longos, inclusive com habituação intrassessão.	Atividade de longo prazo.

<sup>1</sup> A atividade locomotora em um ambiente novo é um comportamento complexo que pode estar relacionado tanto à habilidade motora em si, quanto a outros fatores como níveis de ansiedade, resposta ao estresse e à novidade.

<sup>2</sup> Embora inicialmente desenvolvido para avaliar a memória espacial, esse teste também pode ser usado na avaliação da atividade motora. Mais detalhes serão fornecidos no item referente aos testes de memória e aprendizado.

<sup>3</sup> Trata-se de uma variante do campo aberto e, devido ao seu desenho, é capaz de fornecer uma medida da atividade motora menos influenciada por fatores ambientais.

### 3. FUNÇÃO SENSORIAL E MOTORA

**Quadro 3.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação das funções sensorial e motora.

TIPO DE TESTE	DESCRÍÇÃO	DESFECHOS	IDADE DE ANÁLISE (DNP) <sup>1</sup>
<b>Barra rotatória (Rotarod / Acelerorod:caixa com cilindro rotativo transversal suspenso)</b>	Posicionar o animal sobre o cilindro giratório e registrar o tempo de queda, caso ocorra. A velocidade de rotação pode ser fixa ou variável (Acelerorod), sendo a última versão mais exigente e sensível.	Habilidades neuromotoras Equilíbrio Coordenação motora	Em geral, no pós-desmame
<b>Força de prensão (Grip strength ou resposta de agarrar)</b>	Posicionar o animal no aparato e registrar o intervalo de tempo em que se segura à grade, bem como a força aplicada pelos membros anteriores e posteriores.	Habilidades neuromotoras	A partir do DPN 13
<b>Teste de pouso (Hind-limb Splay)</b>	Soltar o animal de 30cm de altura acima de uma folha de papel e medir a distância entre as marcações das patas traseiras.	Habilidades neuromotoras	Em geral, no pós-desmame
<b>Reflexo de geotaxia negativa<sup>2</sup></b>	Posicionar o animal em plano inclinado com a cabeça direcionada para baixo e verificar a ocorrência da resposta de giro 180°, bem como o tempo gasto nessa tarefa.	Habilidades neuromotoras; Função do aparelho vestibular	7-10
<b>Teste em trave elevada (beam test)</b>	Posicionar o animal sobre a travé e registrar o intervalo de tempo (e o número de quedas) gasto na sua travessia até a plataforma de fuga ou gaiola.	Coordenação motora fina Equilíbrio	Em geral, no pós-desmame
<b>Inibição por pré-pulso (IPP) de resposta de sobressalto<sup>3</sup></b>	Apresentar ao animal um estímulo pré-pulso em 30-100ms antes do estímulo de sobressalto. Registrar a magnitude da resposta de sobressalto, a qual normalmente é reduzida de forma dependente da intensidade do pré-pulso.	Medida quantitativa, modificação de reflexos, integração sensório-motora (auditiva, visual, tátil)	Próximo ao desmame ou após
<b>Reflexo auditivo de sobressalto<sup>2</sup></b>	Expor o animal a um som (alto e súbito) e medir a ocorrência e a latência da resposta de sobressalto.	Quantitativo ou qualitativo	Após DPN 10
<b>Habituação da resposta auditiva de sobressalto</b>	Expor o animal ao estímulo auditivo repetidas vezes, a intervalos regulares, e registrar a intensidade do reflexo de sobressalto. Espera-se uma redução na magnitude da resposta inicial com a continuidade da exposição do animal, indicando habituação ao estímulo sonoro. Deve-se otimizar parâmetros como volume e duração do estímulo, intervalo entre sessões e níveis de ruído basal, a fim de maximizar a sensibilidade do teste.	Habituação (aprendizado não-associativo)	-

**Quadro 3.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação das funções sensorial e motora.

<b>Condicionamento do piscar de olhos<sup>4</sup></b>	Apresentar ao animal um estímulo condicionado (comumente um som) imediatamente antes de um estímulo não condicionado (um breve jato de ar nos olhos) repetidas vezes. Após essa etapa de pareamento, apresentar ao animal apenas o estímulo condicionado e registrar a ocorrência da resposta condicionada – piscar dos olhos em resposta ao som, por exemplo.	Capacidade auditiva, visual e tátil; Aprendizado	Em geral, no pós-desmame
<b>Técnicas de condicionamento operante<sup>5</sup></b>	Treinar o animal para associar um estímulo não condicionado (evento reforçador positivo – entrega de um alimento; ou negativo – retirada de um estímulo aversivo como choque elétrico) após determinada ação do animal (por exemplo, pressionar uma alavanca na gaiola) e registrar a ocorrência do aumento na frequência de execução dessa ação em busca do reforço. Há uma ampla gama de paradigmas que se baseiam nesse princípio e podem ser usados na determinação de limiares sensoriais.	Ampla gama de funções sensoriais	Em geral, no pós-desmame e em adultos (motivação por alimento)

<sup>1</sup> Recomendações gerais.

<sup>2</sup> Mesmo teste utilizado na avaliação da ontogênese comportamental.

<sup>3</sup> A IPP consiste na redução da resposta de sobressalto quando previamente gerado um estímulo sensório de menor intensidade (pré-pulso), em um intervalo de tempo específico. Trata-se de uma forma bem estabelecida de mensurar a modulação do filtro sensório-motor, uma vez que a presença do pré-pulso ativa mecanismos que inibem o processamento do pulso, evitando assim um excesso de informação proveniente do meio.

<sup>4</sup> Esse teste é uma forma de aprendizado clássico (pavloviano), no qual ocorre a formação de uma relação preditiva entre dois estímulos. Isto é, o estímulo condicionado normalmente não provoca nenhuma resposta por si só, enquanto o não condicionado provoca uma resposta não condicionada (nesse caso, o piscar de olhos). No entanto, após apresentações repetidas dos dois estímulos sequencialmente (de forma pareada), o som passa a desencadear o reflexo do piscar de olhos, mesmo na ausência do sopro de ar. Embora essa resposta condicionada seja usada principalmente como um indicativo de aprendizagem, é possível usar este teste para avaliar a função sensorial por meio da modificação de propriedades do estímulo condicionado (frequência, intensidade, etc.) e avaliação do seu efeito na resposta condicionada.

<sup>5</sup> Nesse tipo de teste ocorre a formação de uma relação preditiva entre uma ação e seu desfecho. A avaliação da função sensorial por meio desses procedimentos se baseia na capacidade do animal em detectar alterações nas propriedades de estímulos sensoriais (por exemplo, frequência ou intensidade do tom, frequência da luz, propriedades espectrais etc.) que controlam as respostas. Devido à possibilidade de uma ampla gama de pistas sensoriais para controlar comportamentos, os testes envolvendo condicionamento operante estão entre os mais sensíveis para avaliar a função sensorial.

#### 4. MEMÓRIA E APRENDIZADO

O aprendizado associativo pode ser avaliado por meio de uma série de tarefas diferentes, as quais podem geralmente utilizar estímulos apetitivos ou aversivos. No primeiro caso, normalmente se utiliza a privação de alimento ou água para aumentar a motivação na execução das tarefas, uma vez que a ação gera um reforço positivo para o animal. No segundo caso, a ação do animal é motivada por estímulos aversivos, desagradáveis ou dolorosos (por exemplo, choque elétrico, luzes ofuscantes, som alto, água). Nas tarefas aversivas, pode-se verificar respostas de fuga ou esquiva dos animais, a depender se eles executam essa ação

previamente ao aparecimento do estímulo aversivo (esquiva), ou após o seu aparecimento (fuga). Devido ao potencial impacto da privação de água ou alimentos em animais jovens em desenvolvimento, tarefas motivadas por apetite não são as de escolha para esse grupo de animais.

É importante mencionar que medidas de parâmetros relacionados a aprendizado ou memória podem ser afetadas por distúrbios na função motora ou sensorial, caso esses distúrbios exerçam influência sobre a capacidade dos animais de executar os testes comportamentais de memória e aprendizado.

**Quadro 4.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação da memória e do aprendizado.

TIPO DE TESTE	Descrição	Desfechos <sup>1</sup>
<b>Esquiva inibitória (passiva)<sup>2</sup></b>	Essa tarefa requer que o animal aprenda a suprimir uma ação para prevenir a ocorrência do estímulo aversivo. Esse paradigma apresenta variações: inibição do comportamento de descida de uma plataforma ( <i>step-down avoidance</i> ) e do comportamento de cruzar dois compartimentos (iluminado e escuro) ( <i>step-through</i> ). Nos dois casos, ao descer da plataforma ou adentrar no compartimento escuro, o animal recebe um choque elétrico nas patas (estímulo aversivo). Então, o aprendizado associativo é medido comparando-se as latências (de entrada na câmara escura ou de descida da plataforma) entre as sessões de treino e de teste.	Número de erros, latência de entrada no compartimento aversivo ou de descida da plataforma.
<b>Esquiva ativa<sup>2</sup></b>	Essa tarefa requer que o animal aprenda a executar uma ação para prevenir a ocorrência do estímulo aversivo. Um exemplo é a resposta de esquiva condicionada, na qual o animal é treinado para evitar um estímulo aversivo (choque nas patas) previsto por uma sugestão sensorial (estímulo condicionado como som ou luz). Espera-se que o animal aprenda a evitar o estímulo aversivo (resposta de esquiva) executando determinada ação na qual foi treinado (mudar de compartimento ou subir em uma plataforma), após percepção do estímulo de alerta. É possível que essa execução ocorra apenas em resposta ao estímulo aversivo (fuga), então deve-se registrar o número de esquivas e de fugas, bem como a latência de resposta. O aprendizado associativo é medido comparando-se esses parâmetros entre as sessões de treino e teste.	Nº de esquivas bem sucedidas e de fugas quando houve falha na esquiva; tempo de latência para resposta.
<b>Labirinto radial de 8 braços</b>	O animal é posicionado no centro do aparato, no qual há alimento disponível em cada um dos braços. Deve-se registrar o número de entradas em cada braço em busca do reforço. As medidas de memória e aprendizado incluem: latência para se obter reforço, número de braços visitados e de erros (reentrada nos braços onde o alimento já foi consumido).	Aprendizado espacial, memórias de curto e longo prazo.

**Quadro 4.** Detalhamento dos principais testes destinados à avaliação da memória e do aprendizado.

<b>Condicionamento operante (caixa de Skinner)</b>	Variedade de paradigmas que se baseiam no mesmo princípio: animais devem executar uma ação para obter reforço (água/alimento) ou evitar estímulo aversivo (luz e som intensos, choque elétrico). É possível avaliar outras funções cognitivas como atenção, inibição de resposta (impulsividade), discriminação, memória espacial e não espacial.	Nº de respostas corretas e de reforços; percentual de escolhas corretas, taxas de erros (depende do tipo de teste).
<b>Labirinto aquático<sup>3</sup> de Biel e sua variação (de Cincinnati)</b>  <b>(Labirinto com múltiplas junções em “T” dispostas de forma assimétrica e organizadas de tal maneira que os animais precisam aprender a encontrar passagens ao longo das paredes, e não nas extremidades, até o alcance da meta)</b>	Inicialmente, o animal pode ser testado em um canal de água reto para avaliar a capacidade de nado e, em seguida, posicionado no labirinto aquático. Pode-se efetuar testes adicionais posteriores, nos quais as posições de início e fim são invertidas em relação às sessões de treino. As medidas usadas para avaliar aprendizado e memória são o número de erros em cada tentativa, ou seja, virar à esquerda em vez de à direita e vice-versa. O tempo total gasto no labirinto também é registrado em cada tentativa, mas é uma medida menos adequada para avaliar aprendizagem do que medir a precisão da escolha.	Atividade de longo prazo  Nº de erros e tempo de latência para se alcançar o final do labirinto
<b>Labirinto aquático<sup>3</sup> de Morris</b>  <b>(Tanque de água circular com plataforma de escape submersa)</b>	O animal é posicionado no interior do aparato, em um dos 4 locais aleatórios, e deve localizar a plataforma de escape submersa para sair da água. Em razão das alterações na posição inicial do animal em cada sessão, ele deve aprender a localizar essa plataforma com base em pistas espaciais fora do labirinto. A capacidade de memória é avaliada no último dia de teste, no qual a plataforma é removida e se considera o tempo gasto no local anteriormente ocupado por ela como uma medida de memória. As medidas de aprendizagem são: latência para localizar a plataforma, distância e velocidade de nado até a plataforma. A redução da distância percorrida ao longo das sessões fornece uma melhor medida de aprendizado do que a latência, pois esta pode ser influenciada pela velocidade de nado.	Aprendizado e memória espacial; Distância e percurso de nado; latência para alcançar a plataforma de escape; número de sessões de treino até o aprendizado.
<b>Labirinto em T<sup>4</sup></b>  <b>(caixa inicial conectada a dois braços – esquerdo e direito; versão em labirinto seco – motivado pelo apetite; ou em labirinto aquático – motivado aversivamente)</b>	O procedimento frequentemente usado é a tarefa de posição habitual - o mesmo braço é a escolha correta ao longo de todas as tentativas. Outras possibilidades incluem alternância espontânea, a qual requer que o animal escolha o braço oposto ao anteriormente escolhido; e alternância forçada, onde cada sessão consiste em duas rodadas – na primeira, o animal pode seguir por apenas um lado do labirinto (escolha forçada), enquanto na segunda a escolha é livre e o braço alternativo ao da escolha forçada contém o reforço.	Aprendizado e memória operacional e espacial; Nº de erros, latência para alcançar o reforço, número de sessões de treino até o aprendizado.

<sup>1</sup> É possível avaliar uma ampla variedade de desfechos a partir da execução da maioria desses testes, a depender do objetivo e do uso específico de cada um deles. Os desfechos aqui listados fornecem uma visão geral dos mais comuns que podem ser avaliados.

<sup>2</sup> Os testes de esquiva passiva ou ativa são de execução fácil e rápida e requerem geralmente poucas tentativas para o aprendizado. No entanto, eles tendem a produzir resultados variáveis e podem ser sensíveis a déficits na função motora.

<sup>3</sup> Labirintos aquáticos apresentam uma série de vantagens: podem ser usados em animais jovens, uma vez que não requerem privação de alimentos; são tarefas de rápido aprendizado, isentas de confusão causada por apetites ou sabor, relativamente insensíveis ao estímulo de odor. Como limitações, podem ser afetadas por déficits motores, em especial se dependerem de medidas de latência ou velocidade, em vez de medidas de precisão de escolha.

<sup>4</sup> O aprendizado de que o mesmo braço é sempre o correto pode ser relativamente simples para ratos, e estudos mostraram que essa tarefa pode não ser afetada pela exposição a substâncias químicas. Por essa razão, recomenda-se as tarefas de alternâncias, as quais apresentam maior complexidade e, portanto, maior sensibilidade para indicar comprometimento cognitivo.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa  
SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200  
CEP: 71205-050  
Brasília – DF

[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

[www.twitter.com/anvisa\\_oficial](https://www.twitter.com/anvisa_oficial)

Anvisa Atende: 0800-642-9782

[ouvidoria@anvisa.gov.br](mailto:ouvidoria@anvisa.gov.br)