

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Avaliação da toxicidade pré-natal do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos

Marcia Sarpa

Rio de Janeiro  
2003

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Avaliação da toxicidade pré-natal do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos

Marcia Sarpa

Dissertação apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública – Fundação Oswaldo Cruz – para obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública – área de concentração em Toxicologia

Rio de Janeiro  
2003

## Ficha Catalográfica

Sarpa, Marcia

Avaliação da toxicidade pré-natal do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos/ Marcia Sarpa - 2003

xviii, p. 88

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Junho de 2003

1. TPTH 2. Embriofeto-toxicidade 3. Toxicidade materna

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública  
Mestrado em Saúde Pública  
Área de Concentração Toxicologia

Avaliação da toxicidade pré-natal do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos

Marcia Sarpa

**Orientadora: Isabella Fernandes Delgado**

Aprovada em \_\_\_\_ de Junho de 2003 pela banca examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Jaime Silva de Lima (externo)

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Francisco J.R. Paumgartten (interno)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Isabella F. Delgado (orientadora)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Isabel C.G.Leite (suplente externo)

Prof. Dr<sup>a</sup>. \_\_\_\_\_  
Silvana do Couto Jacob (suplente interno)

Rio de Janeiro  
2003

A meus queridos pais,  
**Salvatore e Lia**, e ao **Luís**  
que, em troca de todas as  
minhas ausências, me  
ofereceram ajuda, incentivo e  
amor.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**. Obrigada pela vida!

A **meus pais**, pelo amor e carinho. Obrigado pelo exemplo de honestidade, humanidade, trabalho e força de vontade. Vocês são tudo para mim!

Ao **Luis**, pela tranquilidade para lidar com o meu estresse e mau humor, e que nos dias mais cansativos de experimento me dava paz para continuar.

Aos meus amados sobrinhos **Gabi e Vitor**. Obrigado pela alegria!

A **Isabella Fernandes Delgado**, minha orientadora desde a monografia, que contribuiu como exemplo para a minha formação científica. Obrigado pelo incentivo e pelo aprendizado ao longo desses anos.

Ao **Prof. Francisco Paumgartten** que sempre esteve presente despertando minha curiosidade e me incentivando a pesquisar e estudar mais e mais.

A **Maria Regina Gomes Carneiro** que me ensinou, orientou e a ajudou a fazer toda a estatística da dissertação. Obrigado por me ouvir, pelos conselhos, pela amizade e pelo carinho.

A querida e grande amiga **Karen Friedrich** que mesmo a distância esteve presente em todas as etapas do mestrado e da minha vida pessoal. Obrigado pela paciência e por ajudar na confecção final da dissertação, formatando tabelas, figuras, fotos e páginas.

A amiga **Vanilda** que me ensinou, acompanhou e ajudou em toda a parte experimental do cruzamento e tratamento dos animais sempre com muita dedicação e bom humor.

A minha “irmã de coração” **Isabel** pela sua amizade, carinho, atenção e companheirismo.

A **Elza** por ajudar a solucionar os problemas relativos ao banco de dados alemão e a tudo relacionado ao computador, e também pela alegria com que recebia as minhas dúvidas.

A **Elaine, Kátia, Flavia e Sandra** pela ajuda durante a cesárea dos animais e pela amizade, a **Bárbara** por ensinar um pouco mais sobre os moluscos, ao **Igor** pela confecção do pôster para o COBEA, a **Jéssica e a Jamile** por me darem a chance de ensinar um pouquinho de embriologia, a **Deise Ribas** pela ajuda na digitação do banco de dados, enfim, a todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental que direta ou indiretamente me apoiaram e incentivaram no decorrer dessa dissertação.

Ao **Prof Jaime Lima** pela orientação no estágio docente e aos monitores e alunos da UNIRIO que me receberam com muito carinho.

Ao **Eduardo, Marcelo Eduardo e a Lucianne** da Secretaria Acadêmica da ENSP pela atenção nesses dois anos.

Ao **João** do INCQS por ajudar a solucionar os problemas relacionados ao banco de dados e ao Windows.

A **Fiocruz e a CAPES** pelo auxílio financeiro.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Esta dissertação só se realizou devido a uma pessoa muito especial, que dispensou parte do seu tempo ao meu aprendizado, a leitura de todo o esqueleto fetal e a confecção “artística” das fotos.

**Rose**, você sempre foi amiga e companheira. Com sua simplicidade, dedicação e conhecimento você me orientou e mostrou o caminho que eu devia seguir na leitura das vísceras e dentro da embriotoxicologia.

Tudo que você me proporcionou não tem preço ou agradecimentos compatíveis.

Obrigada pela seriedade e responsabilidade dispensadas em nosso trabalho.

# ÍNDICE

Lista de abreviaturas	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
I. Introdução	01
I.1 Compostos organoestanhosos	01
I.2 Trifenil Hidróxido de Estanho (TPTH)	06
I.2.1 Identidade e propriedades físico-químicas	06
I.2.2 Fontes de exposição humana e ambiental	07
I.2.3 Métodos Analíticos	07
I.2.4 Transformação, distribuição e transporte no ambiente	08
I.2.5 Exposição humana	08
I.2.6 Toxicidade aguda e sub-crônica	09
I.2.7 Toxicidade crônica e carcinogenicidade	09
I.2.8 Genotoxicidade	10
I.2.9 Imunotoxicidade	11
I.2.10 Neurotoxicidade	11
I.2.11 Toxicidade Reprodutiva	11
I.3 Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos	12
I.4 Relevância do Estudo	16
II. Objetivos	17
III. Material e Métodos	18
III.1 Reagentes	18
III.2 Preparo de soluções	19
III.3 Animais	20
III.4 Acasalamento	20
III.5 Tratamento	20
III.6 Cesariana	21
III.7 Análise de Anomalias Viscerais	22
III.8 Análise de Anomalias Esqueléticas	23

III.8.1	Processo de diafanização e coloração com Alizarina <i>Red S</i>	23
III.8.2	Análise de Anomalias do Esqueleto Fetal	24
III.9	Análise Estatística	25
IV.	Resultados	26
IV.1	Efeitos sobre o organismo materno	26
IV.2	Efeito sobre os órgãos maternos	29
IV.3	Embriofetotoxicidade	31
IV.4	Razão entre fetos fêmeas e machos	32
IV.5	Retardo do Crescimento Pré-Natal (intra-uterino)	32
IV.6	Malformações	43
IV.6.1	Anomalias Visíveis Externamente	43
IV.6.2	Malformações Viscerais	43
IV.6.3	Anomalias de Esqueleto	53
V.	Discussão	60
V.1	Correlação entre toxicidade materna e embriofetotoxicidade	69
V.2	Efeitos do TPTH sobre órgãos maternos	71
V.3	Embriofetotoxicidade	72
V.4	Retardo do crescimento intra-uterino e teratogenicidade	73
V.5	Considerações Finais	77
VI.	Conclusões	80
VII.	Referências Bibliográficas	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

*ad libitum* – a vontade

ANOVA – Análise de variância (estatística)

*apud* – do latim “junto a”, fonte de uma citação direta

*b. wt.* – *body weight* (peso corporal)

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

DBTC1 – di-*n*-butil dicloreto de estanho

DBTs – dibutil de estanho

*e.g.* – por exemplo (*exempli gratia*)

EEC – Comunidade Econômica Européia

FDA – Agência de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

*i.e.* - isto é (“*id est*”)

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

IDA – Ingestão Diária Aceitável

Igs – Imunoglobulinas

IPCS – Programa Internacional de Segurança de Químicos

JMPR – Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues

NOAEL – No Observed Adverse Effect Level

OECD – Organização para Cooperação Econômica e sobre o Desenvolvimento

*per se* – por si só

PHD – Falange distal da pata dianteira

Php – Falange proximal da pata dianteira

TBT – Compostos Tributil de Estanho

TBTA – Tri-*n*-butil Acetato de Estanho

TBTC1 – Tri-*n*-butil Cloreto de Estanho  
TBTO – Tributil Óxido de Estanho  
TPH dist – Falange distal da pata traseira  
TPH méd – Falange medial da pata traseira  
TPT – Compostos Trifenil de Estanho  
TPTA – Trifenil Acetato de Estanho  
TPTCl – Trifenil Cloreto de Estanho  
TPTH – Trifenil Hidróxido de Estanho  
US EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos  
WHO – Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa de consumo de compostos organoestanhosos em 1985, antes da regulamentação de tintas antiincrustantes (Fonte: *Fent*, 1996).

Figura 2 – Vias de entrada dos compostos organoestanhosos no ambiente.

Figura 3 – Estrutura química geral de compostos trifenil de estanho.

Figura 4 – Esquema geral dos estudos de Toxicidade Reprodutiva denominados Segmentos I, II e III, recomendados pelo FDA (US FDA, 1996).

Figura 5 – Ganho de peso corpóreo de fêmeas tratadas oralmente com TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 6 – Sinal de retardo de ossificação de esqueleto (**pata traseira**) produzido em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 7 – Sinal de retardo de ossificação de esqueleto (**osso parietal**) produzido em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 8 – Incidência de fetos expostos *in útero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação apresentando forma irregular do timo (*a* diferente do controle).

Figura 9 – Posição irregular do corno uterino de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação (seta).

Figura 10 – Posição irregular dos testículos de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação (seta).

Figura 11 – Incidência de fetos expostos *in útero* ao TPTH com posição irregular do corno uterino e dos testículos (*a* diferente do controle).

Figura 12 – Diferentes graus de fenda palatina de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 13 – Anomalia esquelética (forma irregular do osso basioccipital) encontrada em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 14 – Anomalia esquelética (forma irregular do osso basisfenóide) encontrada em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Figura 15 – O ciclo reprodutivo.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos Protocolos Regulatorios *in vivo* para avaliação da toxicidade sobre o desenvolvimento.

Tabela 2 – Ganho de peso materno de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 3 – Peso dos órgãos maternos de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 4 – Dados da cesárea de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 5 – Alteração do peso dos órgãos de fetos expostos *in útero* ao TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 6 – Alteração do peso dos órgãos (*pool*) de fetos expostos *in útero* ao TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 7 – Ocorrência de sinais de retardo de ossificação em fetos expostos *in útero* ao TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 8 – Ocorrência de Anomalias Viscerais Visíveis Externamente em ninhadas de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 9 – Ocorrência de Anomalias Viscerais em ninhadas de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 10 – Malformações esqueléticas em fetos expostos *in útero* ao TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tabela 11 - Levantamento Bibliográfico da Toxicidade Reprodutiva de Compostos Tributílicos e Trifenílicos de Estanho.

Tabela 12 - Estudos de toxicidade reprodutiva do TPTH.

## RESUMO

O grupo de compostos organoestanhos inclui uma variedade de químicos amplamente empregados na agricultura e na indústria em geral. Os triorganoestanhos são biologicamente mais ativos e são largamente usados como biocidas. Compostos trifenil de estanho em adição com compostos tributil de estanho são usados como algicidas, moluscicidas e como preservativo da madeira.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial embriofeto-tóxico do trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos. Camundongos *Swiss Webster* (FIOCRUZ) foram acasalados, sendo considerado dia '0' de gravidez as 24 horas que se seguiram à confirmação do cruzamento pela presença do *plug* vaginal. As fêmeas grávidas foram tratadas com doses de 0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg de peso corpóreo/dia por entubação gástrica nos dias 6-17 de gravidez. O grupo controle recebeu apenas o veículo (óleo de milho). No dia 18, as fêmeas foram submetidas à cesariana sendo registrado o número de fetos vivos, mortos e reabsorções. Os fetos foram pesados, sendo  $\frac{1}{2}$  de cada ninhada fixada em Bouin para análise de vísceras e a  $\frac{1}{2}$  restante diafanizada e corada (alizarina red S) para avaliação de esqueleto.

Morreram 01 mãe tratada com 3,75 mg/kg, 01 com 15mg/kg e 02 com 30mg/kg. Drástica redução de peso materno foi notada a partir de 15mg/kg, mas a análise do ganho de peso durante todo o período de gravidez (dia 0-18), descontado o peso do útero, indicou que o TPTH causou consistentemente toxicidade materna a partir de 7,5mg/kg. Um aumento de reabsorções foi notado nas doses de 15 e 30mg TPTH/kg. Não houve alteração do número de sítios de implantação. A partir de 15mg/kg, o TPTH causou evidente redução do peso corpóreo fetal. Sinais de malformações viscerais, tais como alterações de timo, testículos e útero, foram evidentes a partir de 7,5mg/kg. Sinais de retardo de ossificação (pobremente calcificado, osso não calcificado e esponjoso) e uma alta incidência de malformações de esqueleto foram observadas a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg.

Estes achados indicam que o TPTH foi tóxico para a mãe a partir da dose de 7,5mg/kg e embriofeto-tóxico a partir da dose 3,75 mg TPTH/kg; apontando para uma certa seletividade dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal.

## ABSTRACT

Organotin compounds are a broad-group of chemicals widely used in agriculture and industry. Trisubstituted organotin compounds are biologically very active, and are widely used as biocides. TPTs in addition to TBTs have been used extensively in antifouling products as algaecides, molluscicides and for wood preservation.

This study was undertaken to provide data on the embryo-foetotoxic potential of TPTH. *Swiss Webster* mice were mated and the day on which copulation was confirmed by the presence of a vaginal plug was designated as day '0' of pregnancy. Pregnant mice were treated by gavage with 0; 3.75; 7.5; 15 e 30 mg TPTH/kg body wt /day on days 6-17 of gestation. The vehicle-control group received corn oil only. Caesarean sections were performed on pregnancy day 18, and the number of resorptions, implantation sites and live and dead fetuses was recorded. Fetuses were weighed, examined for external malformations, and either fixed for visceral examination, or cleared and stained with Alizarin Red S for skeleton evaluation.

Maternal deaths were observed in animals treated with 3.75, 15 and 30mgTPTH/kg. Doses equal to or higher than 15mg/kg drastically reduced pregnancy weight gain. Reductions of pregnancy wt gain minus gravid uterus wt indicated that doses equal to or higher than 7.5 mg TPTH/ kg b.wt/day were maternally toxic. An increased number of resorptions was observed at 15 and 30mg TPTH/kg. The number of implantations per litter was not altered. Reductions of foetal body wt were noted in groups treated with 15 and 30mg TPTH /kg body wt. Soft tissue (visceral) abnormalities, such as misshapened thymus, and malpositioned testes and uterus were also observed at doses equal to or higher than 7.5mg/kg. Signs of delayed ossification (poorly ossified and not ossified bones as well as irregular spongy bones) and higher incidence of skeletal malformations were observed at doses of 3.75mgTPTH/kg body weight or more.

Results indicated that TPTH was maternally toxic at doses equal to or higher than 7.5mg/kg and embryofetotoxic at doses equal to or higher than 3.75mgTPTH/kg, pointing to an specific embryofetotoxic effect.

# I. INTRODUÇÃO

## I.1 Compostos organoestanhosos

O grupo dos compostos organoestanhosos inclui uma variedade de químicos amplamente empregados na agricultura e na indústria em geral. A grande maioria destes compostos tem origem antropogênica, com exceção do metil estanho, que pode também ser produzido por biometilação ambiental. O primeiro registro de comercialização de compostos organoestanhosos data de 1936, quando foram usados como estabilizadores de polímeros sintéticos (Fent, 1996). Desde que sua propriedade biocida foi reconhecida em 1950, observou-se um aumento considerável de sua aplicação, consumo e produção, que cresceu de 5.000 t no ano de 1955 para cerca de 35.000 t no ano de 1985, o que naquele momento, representava aproximadamente 7% do consumo mundial total de estanho por ano.

Os compostos diorganoestanhosos e monoorganoestanhosos são usados, principalmente, como estabilizadores de PVC e catalisadores na produção de poliuretanos, silicone e em outros processos industriais. Os compostos triorganoestanhosos são utilizados como pesticidas de uso agrícola; como agentes preservativos da madeira, algodão, papel, na indústria de vidros; e como aditivos de tintas para uso náutico (efeito antiincrustante). Já os compostos tetraorganoestanhosos são basicamente usados como estabilizadores de óleos e intermediários na produção dos seus derivados (Fait *et al*, 1994). Dentre os diferentes grupos de compostos a base de estanho, são os compostos triorganoestanhosos os mais estudados sob o ponto de vista toxicológico (Guard *et al*, 1981). Um levantamento do consumo estimado de produtos a base de compostos organoestanhosos realizado na década de 1980 encontra-se ilustrada na Figura 1.

Compostos tributil estanho (TBT) têm sua principal aplicação como agentes biocidas. O TBT foi inicialmente proposto como bactericida (*e.g* desinfetante de uso hospitalar), e como moluscicidas no combate da *Biomphalaria glabrata*, vetor do *Shistosoma mansoni* em áreas endêmicas (Cardarelli, 1977 e Duncan, 1980). No entanto, após a descoberta de sua potente ação antiincrustante, a adição de TBT em tintas para uso próprio em embarcações, redes de pesca, plataformas para exploração de

petróleo, bóias para auxílio à navegação e tubulações de usinas nucleares, passou a representar a principal aplicação deste composto. A utilização de tintas contendo acima de 20% de TBT em sua composição previne a adesão e o crescimento de crustáceos, plâncton, bactérias, algas e outros organismos nos cascos de embarcações, o que reduz o custo de manutenção com limpeza e o consumo excessivo de combustível devido às incrustações biológicas (Boyer, 1989). A bioincrustação, além de provocar graves danos nas estruturas submersas, causa prejuízos econômicos óbvios, porque torna irregular e rugosa a superfície dos cascos aumentando o arrasto e reduzindo a velocidade das navegações. Estima-se uma economia anual de 2 bilhões de dólares com o uso destes compostos (Champ, 1999).

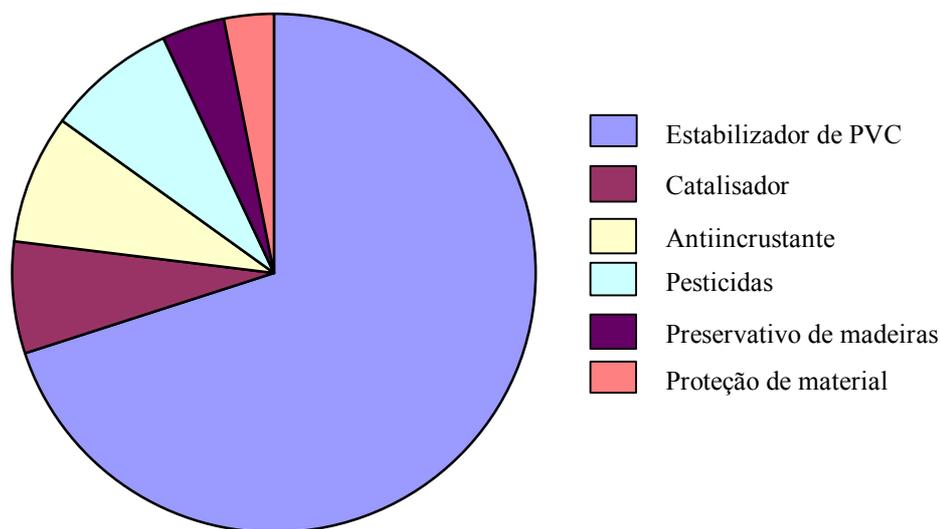


Figura 1: Estimativa de consumo de compostos organoestanhosos em 1985, antes da regulamentação de tintas antiincrustantes (*Fonte: Fent, 1996*)

O emprego de compostos tributil estanho em tintas de uso náutico faz com que essa seja a principal via de entrada do TBT no ambiente aquático (WHO, 1980). Outras possíveis vias de entrada e distribuição dos compostos organoestanhos no meio ambiente ocorrem através da aplicação agrícola de compostos trifenil estanho (TPT), o que contamina o solo e os corpos de água. Apesar do TPT ser também usado como agente antiincrustante em adição ao TBT, sua principal aplicação é agrícola, onde este é usado como agente fungicida, sobretudo nas plantações de batata, beterraba, café e arroz. Apesar das estimativas serem escassas, alguns relatos demonstram que o consumo de TPT como fungicida agrícola não é raro. Em países europeus, como *e.g.* a Holanda, o consumo anual de trifenil acetato de estanho (TPTA) na safra de batata do ano de 1987 foi de 300 t, o que representa aproximadamente 8% do total de fungicidas utilizados neste país (Fent, 1996).

A Figura 2 ilustra algumas outras vias importantes de entrada de compostos organoestanhos no meio ambiente. A contaminação com TBT pode decorrer da lixiviação ou do próprio desgaste de produtos a base de PVC e outros inúmeros produtos industriais revestidos e/ou protegidos por este composto, sobretudo os compostos mono-butil de estanho e di-butil de estanho, que contaminam, via de regra, os sistemas de tratamento de esgotos municipais. O descarte de produtos contendo compostos organoestanhos em aterros sanitários pode levar a contaminação do solo e do lençol freático. Já em incineradores municipais, compostos organoestanhos são decompostos em óxido de estanho e em outros produtos de combustão, considerados de toxicidade relativamente baixa.

Embora ocorra a emissão de compostos organoestanhos no ar durante a aplicação de pesticidas, ou a partir de superfícies revestidas com estes compostos, esta forma de contaminação ambiental não é considerada de grande importância. Isto porque TBT e TPT, além de apresentarem baixa pressão de vapor, são rapidamente decompostos por fotodegradação (Fent, 1996).

1. MAR, LAGOS E BAÍAS
2. SISTEMA DE TRATAMENTO DE ESGOTO
3. INCINERAÇÃO
4. ATERRO SANITÁRIO
5. AR
6. SOLO
7. LENÇOL FREÁTICO

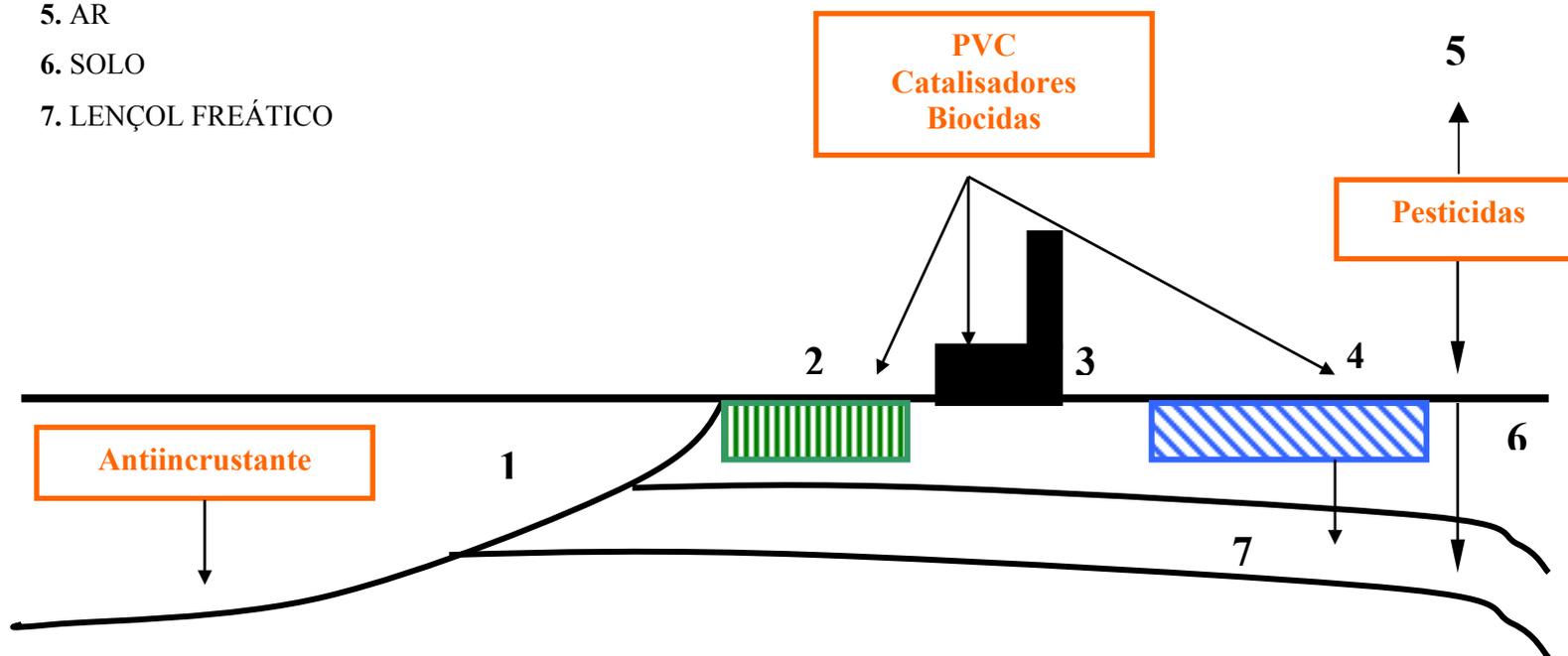


Figura 2: Vias de entrada dos compostos organoestanhosos no ambiente

A contaminação mundial de peixes e outros organismos de origem marinha por TBT e TPT é apreciável. Apesar de nas últimas décadas a adição de TBT em produtos antiincrustantes ter sido mais abundante do que a adição de TPT, os níveis residuais destes dois compostos em peixes e mariscos são comparáveis, havendo, entretanto diferenças consideráveis quanto aos níveis residuais encontrados nas diferentes espécies de peixes estudadas (WHO, 1999). Os níveis residuais são bem mais elevados em peixes de cativeiro e naqueles encontrados em baías e em áreas costeiras, quando comparados com peixes pelágicos. Apesar dos compostos TPT serem degradados por defenilação seqüencial e serem excretados em forma conjugada vários estudos têm demonstrado que tais compostos sofrem bioacumulação ao longo da cadeia alimentar e que a exposição humana pode ocorrer através da ingestão de frutos do mar contaminados (WHO, 1999).

Desde que as tintas contendo TBT e TPT começaram a ser utilizadas em larga escala, no início da década de 1970, pensou-se que essa seria a solução para o antigo e oneroso problema da bioincrustação. No entanto, já nessa época surgiram as primeiras evidências de efeitos prejudiciais em muitas outras formas de vida marinha além dos organismos incrustantes. Os primeiros apontamentos de problemas ambientais decorrentes do uso de compostos a base de estanho foram registrados no final dos anos 1970, após a observação de um drástico declínio na produção de espécies economicamente importantes na Baía de Arcachon, na França. A principal alteração biológica atribuída ao amplo uso de compostos organoestanhosos foi a morte de ostras e larvas de moluscos, além do aparecimento de órgão sexual masculino em gastrópodes fêmeas (Fernandez *et al*, 2002). Esse último efeito, um fenômeno observado após distúrbio hormonal induzido é denominado *imposex*, e altera a proporção sexual desses organismos no meio ambiente. Compostos organoestanhosos são por isso considerados desreguladores endócrinos.

Diante do acidente ocorrido na Baía de Arcachon, a França foi o primeiro país a regulamentar o uso de compostos organoestanhosos com aplicação antiincrustante, na tentativa de reduzir as concentrações ambientais. Em 1982, a França banuiu o uso de tintas a base de estanho em embarcações com dimensões menores que 25 metros de comprimento. Essa proibição foi posteriormente adotada por outros países (Champ, 1999), tais como Inglaterra (1987), Estados Unidos (1988), Suécia e Nova Zelândia

(1989), Austrália e Japão (1990) e Dinamarca (1991). Alemanha, Áustria e Suíça impuseram também restrições em ambientes de água doce. Recentemente, a Comissão de Proteção Ambiental Marinha (CPAM) pertencente à Organização Internacional Marítima (IMO) recomendou que no ano de 2008 haja a proibição global do uso de compostos organoestanhosos em tintas de navios, além da suspensão de novas aplicações em embarcações já a partir do ano de 2003 (Champ, 1999). Entretanto, é importante que se ressalte, que no Brasil, bem como em outros países em desenvolvimento, não existe legislação impondo restrições ou estabelecendo níveis permissíveis desses compostos no meio ambiente.

## I.2 Trifenil Hidróxido de Estanho (TPTH)

### I.2.1 Identidade e propriedades físico-químicas

Compostos trifenil estanho (TPT) são derivados trifenílicos do estanho tetravalente. Eles apresentam a fórmula geral  $(C_6H_5)_3 Sn-X$ , onde X é um ânion ou um grupo aniônico, *i.e.* o cloro, o hidróxido ou o acetato.

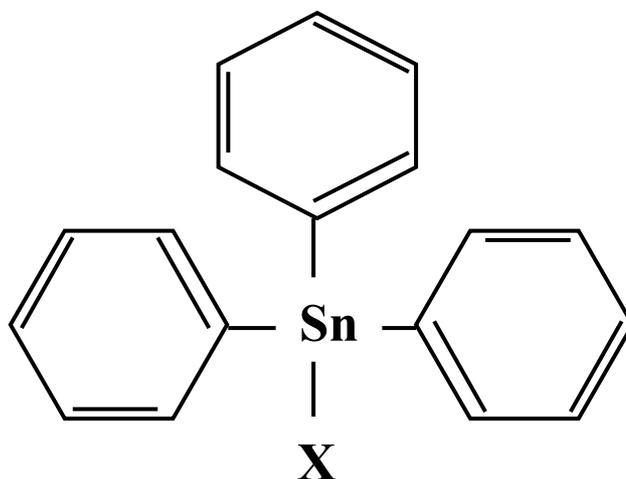


Figura 3: Estrutura química geral de compostos trifenil estanho.

As propriedades físico-químicas do TPT dependem do ânion ligado ao estanho. Em temperatura ambiente, com pH entre 3-8, o TPTA (trifenil acetato de estanho) e TPTCl (trifenil cloreto de estanho) são rapidamente hidrolisados em TPTH. Como

consequência, os resultados de muitos estudos com TPTA e TPTCl são aplicados ao TPTH. Esses compostos são lipofílicos e têm baixa solubilidade em água.

### **I.2.2 Fontes de exposição humana e ambiental**

O TPTH apresenta potente ação algicida, fungicida e moluscicida. Como descrito anteriormente, a adição deste composto em tintas próprias para uso em embarcações impede a bioincrustação, o que promoveu seu amplo uso na década de 1970. Anos depois, observou-se que o TPTH apresenta potente ação tóxica para organismos aquáticos não-alvo. Por ser extremamente tóxico à vida marinha, a produção de TPTH foi banida em muitos países desenvolvidos, apesar das vantagens econômicas que representava a aplicação de um agente biocida tão potente. Entretanto, o TPTH, assim como outros compostos a base de estanho, ainda vêm sendo usados como estabilizadores de PVC, em preservativos da madeira e na produção de pesticidas. O TPTH é utilizado no Brasil como pesticida agrícola, com aplicação em lavouras e no tratamento de sementes para plantio em culturas de amendoim, arroz, batata, cacau, cenoura e feijão (ANVISA, 1985).

Além de representar risco ao ecossistema, principalmente às populações aquáticas não-alvo, estudos realizados em mamíferos demonstram que o TPTH pode induzir uma variedade de alterações fisiológicas. Os efeitos induzidos pelo TPTH incluem: marcante neurotoxicidade e imunotoxicidade, indução de apoptose em timócitos, indução de hiperplasia/adenomas em órgãos endócrinos, e irritação ocular (WHO, 1999). O TPTH apresenta toxicidade aguda moderada em roedores e não é carcinogênico, entretanto, alguns dados sugerem uma possível ação co-clastogênica (WHO, 1999).

### **I.2.3 Métodos analíticos**

TPT e seus produtos de degradação podem ser analisados em alimentos e em amostras ambientais ou de origem biológica a partir da utilização de uma variedade de técnicas, dependendo do meio e da sensibilidade necessária para cada análise.

Normalmente, o processo tem início com a extração líquida ou adsorção em matrizes sólidas, seguido por re-extração e/ou concentração (WHO, 1999). A quantificação pode ser realizada utilizando-se espectrometria de absorção atômica, cromatografia gasosa com detector fotométrico de chama, espectrometria de massa, ou ainda cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Os limites de detecção destas técnicas situam-se na faixa de ng/litro para amostras de água e <1 µg/kg para sedimento e amostras de origem biológica (WHO, 1999). Não encontramos na literatura trabalhos relacionados a toxicocinética do TPTH em roedores.

#### **I.2.4 Transformação, distribuição e transporte no ambiente.**

A degradação do TPT ocorre através de uma seqüência de defenilação resultante da clivagem da ligação estanho-carbono através de mecanismos biológicos, químicos ou térmicos e irradiação ultravioleta. A clivagem biológica e por irradiação ultravioleta são consideradas os processos mais importantes. Fatores abióticos, tais como, temperatura elevada, aumento da intensidade da luz solar, e condições aeróbicas parecem aumentar a degradação de TPT no ambiente (WHO, 1999).

O TPTH é fortemente adsorvido pelo solo e sedimentos, portanto, a contaminação de plantas, via raízes, é extremamente baixa. A persistência do TPTH depende do tipo de solo e de seu pH. Em solo arenoso e sedimentado sua meia-vida foi registrada como sendo cerca de 1 a 3 meses, já em solo inundado a meia-vida foi estimada em 126 dias. Em água, a meia-vida estimada do TPT é de 2 a 3 semanas (WHO, 1999).

#### **I.2.5 Exposição humana**

Não existem dados disponíveis sobre exposição ocupacional ao TPTH. Os poucos relatos de envenenamento que foram divulgados até hoje registram efeitos neurotóxicos que, aparentemente, são persistentes (WHO, 1999).

Além da exposição ocupacional, a exposição humana pode se dar através da ingestão de alimentos contaminados, sobretudo produtos agrícolas e frutos do mar. Em países como Inglaterra, Alemanha e Estados Unidos, em que TPT têm freqüente aplicação agrícola, os níveis de resíduos encontrados nos alimentos são periodicamente monitorados pelos órgãos federais de vigilância sanitária (FAO, 1991) e a ingestão diária aceitável (IDA=25µg/kg de peso corpóreo dia) estabelecida pelo JMPR (*Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*) é criteriosamente obedecida. No Brasil, apesar de serem livremente comercializados, não há dados disponíveis na literatura sobre a exposição humana ou ambiental a compostos organoestanhosos.

### **I.2.6 Toxicidade aguda e sub-crônica**

Após administração oral de TPTH, os sinais tóxicos observados em várias espécies incluem anorexia, vômito, tremor, diarreia e ataxia. A DL<sub>50</sub> aproximada, calculada após administração oral de TPTH é 160 mg/kg de peso corpóreo para ratos e 100-245 mg/kg de peso corpóreo para camundongos (WHO, 1999).

A avaliação da toxicidade sub-crônica oral do TPTH evidencia alguns sintomas comuns em diferentes espécies estudadas, *i.e* diminuição do nível sérico de imunoglobulinas (Igs), redução do ganho de peso corpóreo e aumento do peso do fígado, além da morte de camundongos, ratos e cães tratados com doses relativamente baixas (WHO, 1999). Os efeitos induzidos em camundongos foram observados a partir de 3,4mg TPTH/kg/dia. Tais efeitos foram igualmente observados em ratos tratados por via oral com doses maiores que 0,30mg TPTH/kg/dia. Em estudos realizados em cães, o *NOAEL* (*No Observed Adverse Effect Level*, ou *nível máxima de dose em que não observa-se efeitos adversos*) foi estabelecido em 0,21mg TPTH/kg/dia. Desta forma, podemos dizer que camundongos são aparentemente mais resistentes aos efeitos deletérios induzidos pela exposição sub-crônica ao TPTH.

### **I.2.7 Toxicidade crônica e carcinogenicidade**

Os estudos de toxicidade crônica evidenciam uma maior suscetibilidade do organismo feminino aos efeitos deletérios de compostos TPT (*e.g.* redução do peso

corpóreo, alteração de componentes do sistema imune e aumento da taxa de mortalidade). A maior susceptibilidade feminina foi observada tanto em ratos como em camundongos.

Em estudos de carcinogenicidade, observou-se aumento da incidência de adenoma hepatocelular em ambos os sexos e da incidência de carcinoma hepatocelular exclusivamente em fêmeas tratadas com TPTH. Um aumento da incidência de adenoma hipofisário foi observado exclusivamente em fêmeas, enquanto que em doses maiores que 4,8 mg TPTH/kg, este mesmo estudo revelou um aumento da incidência de tumores de células intersticiais do testículo (células de Leydig) em ratos machos (WHO, 1999).

Embora o aparecimento de alguns tumores tenha sido detectado nestes estudos, tais achados não foram considerados estatisticamente significativos. Além disso, estudos recentes sugerem que a hiperplasia de células de Leydig é extremamente rara no homem, e que o desenvolvimento de adenomas e alterações neoplásicas observados em ratos são processos provocados por alterações hormonais específicas da fisiologia de roedores e que apresentam pouca, ou nenhuma, relevância sob o ponto de vista da carcinogenicidade humana. Portanto, segundo comitê formado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1992), não se pode afirmar que o TPTH é carcinogênico.

### **I.2.8 Genotoxicidade**

Testes *in vitro* e *in vivo* de genotoxicidade, tal como, testes da mutagenicidade da *Salmonella* (Teste de Ames), ensaios de aberrações cromossômicas, testes de micronúcleos em camundongos, ensaio citogenético em células de hamster chinês, teste dominante letal em ratos, entre outros, mostraram resultados negativos, mesmo em altas doses. Porém, dados recentes indicam que o TPT potencializa a genotoxicidade de outras substâncias. Sasaki *et. al.* (1993) identificaram que compostos TPT potencializam a indução de aberrações cromossômicas pela mitomicina C em cultura de células de ovário de hamster chinês quando tratados durante a fase G<sub>2</sub>. Da mesma forma, uma ação co-clastogênica foi encontrada por Yamada *et. al.* 1993, ao registrarem um aumento na frequência de micronúcleos induzida pela mitomicina C em reticulócitos periféricos de camundongos tratados por via intraperitoneal com TPTCl, embora o TPTCl *per se* não apresente ação clastogênica (WHO, 1999).

### **I.2.9 Imunotoxicidade**

Efeitos sobre o sistema imune foram observados tanto em estudos de toxicidade a longo prazo como em estudos a curto prazo. Como outros compostos organoestanhos, o TPTH mostrou propriedades imunossupressoras tais como, promoção de linfopenia e diminuição dos pesos de órgãos imuno-relacionados, *i.e.*, baço e timo, resultando em alterações nas respostas humoral e celulares em ratos, camundongos e cobaias.

### **I.2.10 Neurotoxicidade**

Após administração oral de TPT em roedores, observou-se aumento dos níveis de estanho no tecido cerebral (WHO, 1999). No entanto, o TPT induz efeitos neurotóxicos relativamente fracos quando comparados com aqueles induzidos após exposição a outros compostos a base de estanho, tais como TBT, trietil estanho, e outros.

### **I.2.11 Toxicidade reprodutiva**

Com relação à toxicidade reprodutiva e efeitos sobre o desenvolvimento pré- e pós-natal induzidos por compostos organoestanhos, pode-se dizer que, pelo menos até o momento em que concluímos o levantamento bibliográfico desta dissertação, não existiam na literatura dados disponíveis sobre o potencial embriofeto-tóxico do TPTH em camundongos. No entanto, alguns estudos demonstram que os TPTs causam efeitos sobre a reprodução de ratos, coelhos e hamster a partir de doses relativamente baixas, em geral, tóxicas também para o organismo materno. Diminuição do número de sítios de implantações, do número de fetos vivos, e do peso médio fetal ao nascimento, além de aumento do número de reabsorção são alguns dos efeitos encontrados nestas espécies.

Apesar do estudo conduzido em ratas grávidas (Chernoff *et al* 1990 e Rodwell, 1985, *apud* WHO, 1999) não demonstrar nenhuma alteração estrutural que sugerisse efeito teratogênico do TPTH, avaliações conduzidas em hamster (Carlton & Howard, 1982 *apud* WHO, 1999) evidenciam um discreto aumento na incidência de hidronefrose e hidrocefalia, em níveis de dose em que sinais de toxicidade materna já eram evidentes. Além disso, estudo realizado recentemente com outro composto organoestanhoso, *i.e.* o tributil óxido de estanho (TBTO), em camundongas grávidas, revelou um aumento da incidência de fenda palatina, encurtamento da mandíbula e fusão dos ossos exoccipital/basooccipital, sugerindo que o TBTO induz efeito teratogênico nesta espécie (Faqi *et al*, 1997).

### **I.3 Avaliação da toxicidade reprodutiva de xenobióticos**

O estudo da toxicidade pré-natal é considerado uma nova ciência, mas relatos sobre observações em teratologia, *i.e.* alterações estruturais ao nascimento, são descritos antes mesmo da linguagem escrita. Esculturas em mármore vindas do sul da Turquia, que datam 6500 a.C., descrevem gêmeos unidos (Warkany, 1983) e pinturas nas paredes egípcias que demonstram anomalias humanas, *e.g.* fenda palatina, tiveram origem há 5000 anos. Acredita-se que figuras da mitologia, tais como centauros e minotauros, surgiram da observação dessas anomalias (O`Rahilly, 1992a).

Entretanto, a importância da teratogênese induzida por fatores ambientais despertou a atenção de pesquisadores, sanitaristas e médicos em geral após a ocorrência de dois eventos distintos, hoje considerados marcos importantes no desenvolvimento de métodos para a investigação da etiologia das malformações congênitas em mamíferos. Até meados da década de 1930, acreditava-se que o útero materno representava uma barreira para o ambiente externo, proporcionando um ambiente protegido para o feto, e que as malformações em mamíferos tinham origem essencialmente genética. No entanto, uma epidemia de rubéola na Austrália associada ao aumento de casos de crianças nascidas com uma síndrome que incluía malformações oculares, cardiovasculares, surdez e retardo mental, como relatado por Gregg em 1941 (*apud* O`Rahilly, 1992), derrubou o conceito anterior e tornou claro que o ambiente externo poderia comprometer o desenvolvimento fetal.

O segundo evento se deu no final da década de 1950, quando a talidomida (Contergan<sup>®</sup>) – um medicamento sedativo/hipnótico desenvolvido pela indústria alemã *Chemie Grünenthal*, amplamente prescrito e utilizado em larga escala por mulheres grávidas em vários países levou ao aparecimento de malformações raras, conhecidas como amelia e focomelia, que se caracterizam pela redução em diferentes graus (focomelia) ou pela total ausência (amelia) de um ou mais membros (Taussig, 1962).

Em virtude deste acontecimento, que ficou registrado na história como a “Tragédia da Talidomida” a inquietude quanto à inocuidade de xenobióticos durante a gravidez e a prevenção de defeitos congênitos, através da identificação de teratógenos em potencial passou a ser uma preocupação da Saúde Pública. As agências regulatórias e os organismos internacionais pertinentes, por sua vez, tornaram mais rigorosas as exigências quanto aos estudos de segurança e eficácia de novos medicamentos, aí incluídos os estudos de toxicidade reprodutiva, e estenderam tais exigências a outros produtos, tais como pesticidas, aditivos alimentares e substâncias químicas em geral.

Na verdade os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases. Um agente químico pode, por exemplo, impedir ou inibir temporariamente a reprodução, pode ainda causar defeitos de desenvolvimento na prole exposta e assim por diante. Desta forma os estudos de Toxicidade Reprodutiva têm que ser igualmente abrangentes para que se possa detectar diferentes tipos de agravos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo. As diretrizes internacionais do FDA (*US Food & Drug Administration*) e da ECC (*European Economic Community*) recomendam a realização do estudo de Toxicidade Reprodutiva em três segmentos (Figura 4).

Recentemente, vários fatores, tais como o aumento do conhecimento do processo reprodutivo básico e a crescente divergência nos desenhos de estudos empregados em diferentes países, levou a publicação de novos protocolos aceitos internacionalmente, que estão resumidos, ao lado dos três segmentos anteriores, na Tabela 1. Essas diretrizes harmonizadas são resultados da Conferência Internacional de Harmonização de técnicas necessárias para o registro de drogas de uso humano (ICH) (Riecke, 2002).

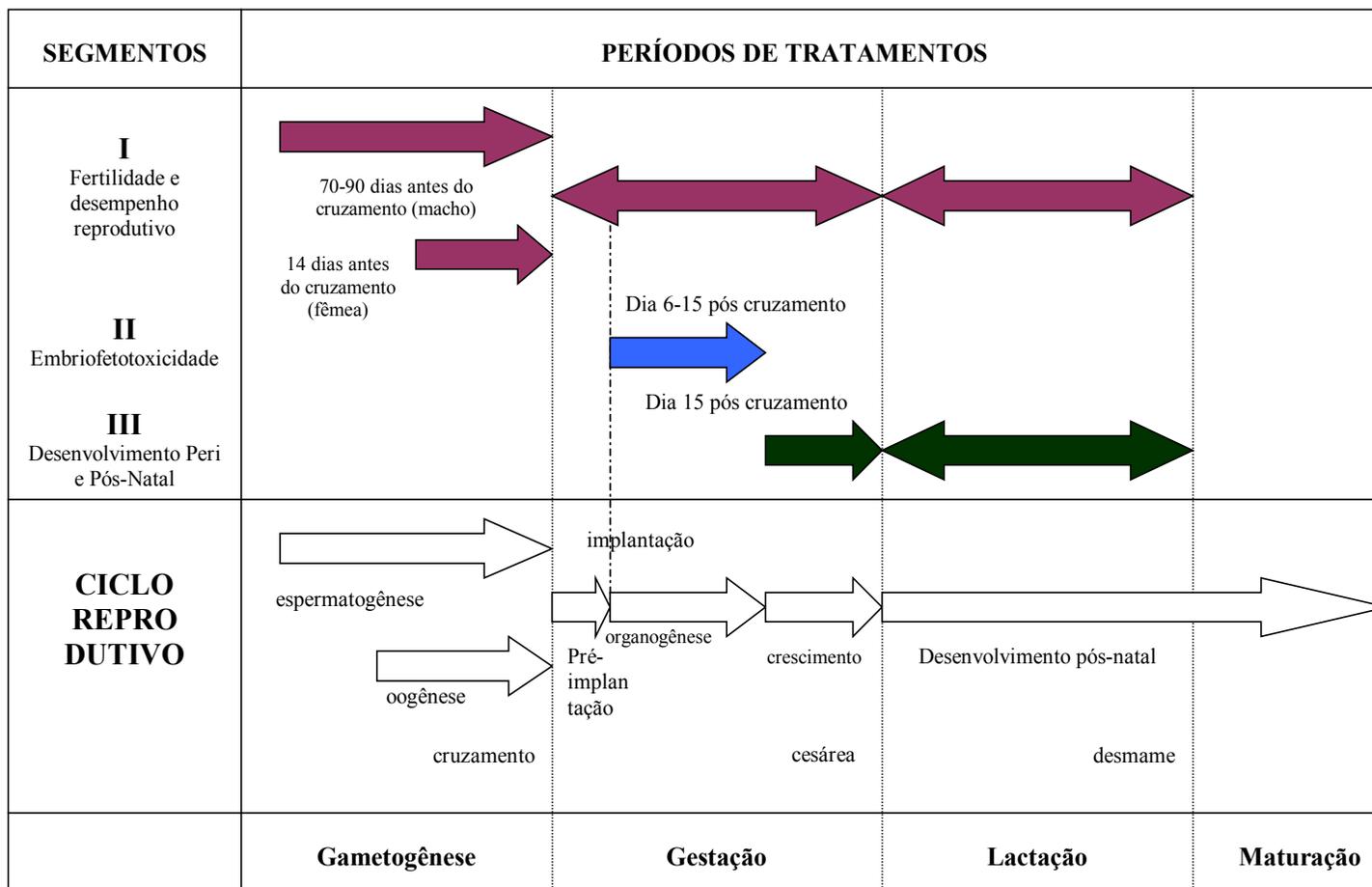


Figura 4: Esquema geral dos estudos de Toxicidade Reprodutiva, denominados Segmentos I, II e III, recomendados pelo FDA (US FDA, 1996)

**Tabela 1:** Resumo dos Protocolos Regulatórios *in vivo* para avaliação da toxicidade sobre o desenvolvimento

ESTUDO	EXPOSIÇÃO	DESFECHOS REGISTRADOS	COMENTÁRIOS
<b>Segmento 1</b> Fertilidade e Desempenho reprodutivo	Machos: 10 semanas antes do acasalamento  Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Desenvolvimento do gameta, fertilidade, viabilidade pré-e pós-implantação, nascimento e lactação.	Avalia a capacidade reprodutiva de machos e fêmeas após a exposição por todo o ciclo espermatogênico e oogênico
<b>Segmento 2</b> Embriofeto-toxicidade	Da implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia (análise externa, visceral e esquelética) do concepto antes do nascimento.	Exposição curta para prevenir adaptação do metabolismo materno e fornece alta exposição ao embrião durante período de vulnerabilidade associado à gastrulação e organogênese
<b>Segmento 3</b> Desenvolvimento peri e pós-natal	Do último trimestre da gestação até a lactação	Sobrevivência pós-natal, crescimento e morfologias externas	Observa os efeitos sobre o desenvolvimento dos principais órgãos funcionais durante o período peri-natal
<b>ICH 4.1.1</b> Protocolo de fertilidade	Machos: 4 semanas antes do acasalamento Fêmeas: 2 semanas antes do acasalamento	Machos: peso e histologia dos órgãos reprodutivos, motilidade e contagem dos espermatozoides. Fêmeas: viabilidade do concepto na metade da gravidez ou mais tarde	Avaliação dos desfechos reprodutivos dos machos; duração do tratamento é menor do que no <i>Segmento 1</i>
<b>ICH 4.1.2</b> Efeitos sobre o desenvolvimento pré-natal e pós-natal, incluindo funções maternas.	Da Implantação ao final da lactação	Toxicidade relativa de fêmeas grávidas vs não grávidas; viabilidade pós-natal, crescimento, desenvolvimento, e déficits funcionais (incluindo comportamento, maturação e reprodução).	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 1</i>
<b>ICH 4.1.3</b> Efeitos sobre o desenvolvimento embriofetal	Da Implantação ao final da organogênese	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).
<b>OECD 414</b> Estudo da toxicidade sobre o desenvolvimento pré-natal	Da Implantação (ou acasalamento) até um dia antes da cesárea	Viabilidade e morfologia dos fetos (análise externa, visceral e esquelética) antes do nascimento.	Semelhante ao estudo de <i>Segmento 2</i> , usualmente conduzido em duas espécies (roedor e não-roedor).

Fonte: Rogers & Kavlock, 2001.

#### **I. 4 Relevância do Estudo**

A constatação de que compostos organoestanhosos agridem fortemente o meio ambiente ocorreu há mais de duas décadas atrás. No entanto, como a própria história nos mostra, as tentativas de substituição por novos agentes antiincrustantes não se consumaram e os processos de regulamentação da produção, consumo e utilização destes compostos, além de serem extremamente lentos, diferem fortemente entre as diferentes nações.

Enquanto a maioria dos países europeus e o Estados Unidos baniram o uso de tintas antiincrustantes a base de estanho em embarcações de pequeno porte ainda na década de 1980, no Brasil e em países em desenvolvimento não existe legislação impondo restrições ou estabelecendo níveis permissíveis destes compostos no meio ambiente.

Como resultado da restrição de uso de compostos organoestanhosos como agentes antiincrustantes em alguns países, a aplicação do TBT e TPT se tornou menor na década de 1990. No entanto, os compostos organoestanhosos permanecem no ambiente aquático porque ainda são amplamente usados em embarcações de grande porte e em estruturas de auxílio a embarcações, e devido ao acúmulo na cadeia biológica e a falta de controle da produção, aplicação e monitoramento dos níveis de contaminação humana e ambiental em países em desenvolvimento. Além disso, como se trata de um produto de uso agrícola, a preocupação com a exposição ocupacional deve prevalecer, sobretudo em países como o nosso, em que o consumo de pesticidas tem crescido rapidamente, mas na maioria dos casos, não existe controle eficaz sobre a venda destes produtos, não há monitoramento da exposição ocupacional, os diagnósticos dos casos de intoxicação são falhos e os equipamentos de proteção individual não são utilizados rotineiramente (Delgado *et al.* 1998 e Forget, 1991).

Desta forma, podemos dizer que a resposta à questão levantada neste estudo é importante em termos de possível reavaliação de risco do TPTH, sobretudo em países como o nosso, em que compostos organoestanhosos são livremente comercializados, sem que, no entanto, haja dados disponíveis sobre contaminação humana ou ambiental.

## II. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial embriofeto-tóxico do TPTH em camundongos, investigando mais especificamente os seguintes efeitos induzidos *in utero* por este composto:

1. embriofetalidade,
2. retardo do crescimento fetal, e
3. aparecimento de malformações viscerais e esqueléticas (*i.e.* efeito teratogênico).

## III. MATERIAL E MÉTODOS

### III. 1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram usados neste estudo:

1) Trifenil Hidróxido de Estanho – TPTH

Pureza: 97,3%

Lote: AARA 00192

AGREVO

2) Óleo de milho Mazola®

Procedência: Refinações de milho Brasil, Brasil.

3) Ácido clorídrico

Lote: 1216036003

Merck

4) Ferrocianeto de potássio

Lote: A813384510

Merck

5) Sulfeto de amônio

Lote: 737U617242

Merck

6) Formaldeído

Lote: 011656

ISO FAR

7) Álcool benzílico

Lote: 931521

Vetec Química Fina Ltda



### **III. 3 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss Webster, machos e fêmeas, com idade entre 50 e 60 dias, originários do Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável (33,5 x 40,5 x 17,0 cm) e cama de maravalha de pinho branco, e aclimatados durante os 10 dias que antecederam o início do experimento.

Os animais receberam água e ração comercial para ratos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos no biotério, com os seguintes controles ambientais: temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa do ar (cerca de 70%) e ciclo claro-escuro constante (período claro de 8 às 20 horas). As trocas das camas de maravalha e água foram feitas duas vezes por semana, e a ração foi substituída semanalmente.

### **III. 4 Acasalamento**

O acasalamento dos animais foi realizado segundo o procedimento proposto por Chahoud & Kwasigroch (1977). Duas fêmeas foram transferidas para a gaiola de um macho durante as duas últimas horas do período escuro (6 às 8 horas da manhã). Em seguida as fêmeas foram retiradas e examinadas para a verificação da ocorrência do cruzamento. O cruzamento foi confirmado pela presença do *plug* (massa esbranquiçada de espermatozóides) na abertura vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do cruzamento foram consideradas como dia '0' de gravidez.

### **III. 5 Tratamento**

Após a confirmação do cruzamento as fêmeas foram pesadas (dia 0), alojadas em gaiolas individuais e incluídas aleatoriamente a um dos seguintes grupos experimentais:

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Nº de fêmeas grávidas (Salewisk positivo)*</b>
Controle (óleo de milho)	N = 20
3,75mg TPTH/kg de peso corporal	N = 21
7,50mg TPTH/kg de peso corporal	N = 19
15,0mg TPTH/kg de peso corporal	N = 21
30,0mg TPTH/kg de peso corporal	N = 17

\*Sítios de implantação detectados pelo método de Salewisk (Salewisk, 1964).

O TPTH foi diluído em óleo de milho e administrado por via oral (entubação gástrica) do dia 6 ao dia 17 de gestação. O grupo controle foi tratado de forma semelhante ao grupo tratado recebendo porém, apenas o veículo (óleo de milho). O tratamento foi realizado sempre na parte da manhã (8 às 12 horas). Os animais foram pesados diariamente durante todo o período de tratamento.

### **III. 6 Cesariana**

No dia 18 de gestação as fêmeas grávidas foram sacrificadas por inalação de CO<sub>2</sub> (gelo seco). As cavidades abdominais foram abertas por uma ampla incisão longitudinal e o útero gravídico, o fígado, o baço e o timo de cada animal foi examinado. Os pesos do fígado, baço e timo foram registrados. O útero foi pesado com todo o seu conteúdo e posteriormente aberto, mantendo sempre a mesma posição que ocupava no ventre materno. A parede uterina foi seccionada com cuidado para evitar danos aos fetos. O número de sítios de implantação, fetos vivos e mortos e o número de reabsorções (intermediária e tardia) foram registrados. Todos os fetos foram identificados de acordo com sua posição no interior do útero (feto número 1 corresponde ao primeiro feto do corno direito) e examinados para verificar a presença

de malformações externas. Após o exame, todos os fetos foram marcados com uma caneta adequada segundo um código de identificação estabelecido pelo laboratório e os pesos foram registrados. Depois da pesagem, metade dos fetos foi escolhido aleatoriamente e fixado em solução formol a 5% para leitura de esqueleto, e o restante foi fixado em solução de Bouin para posterior análise de vísceras.

Após os conteúdos dos úteros terem sido examinados, os sítios de implantação foram identificados pelo método descrito por Salewisk (1964). O útero foi imerso em solução de sulfeto de amônio a 10%, por 10 minutos. Em seguida, o útero foi lavado em água corrente e mergulhado por mais 10 minutos em uma solução formada por partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1%. Após a coloração, os sítios de implantação, que aparecem como pontos escuros na parede uterina, foram localizados e contados.

### **III. 7 Análise de Anomalias Viscerais**

As anomalias viscerais foram avaliadas segundo método de microdissecção adaptado de Sterz (1977).

Após ter sido cuidadosamente seco, o feto, já fixado, foi pesado. Em seguida o feto foi colocado em decúbito dorsal e preso com duas agulhas a uma base de cortiça. Os fetos foram examinados individualmente sob um estereomicroscópio (Zeiss SV11, Alemanha) quanto a presença de anomalias viscerais. Com o uso de um bisturi o abdome foi aberto por uma incisão feita transversalmente acima do umbigo. Com o auxílio de uma pinça a parede abdominal foi levantada deixando exposto o seu conteúdo interno.

Testículos e úteros foram localizados e observados quanto à presença de malformações, *i.e.*, posição ou forma irregular. Em seguida todos os demais órgãos abdominais foram retirados observando-se sempre tamanho, posição e forma. O fígado foi pesado e teve seus lóbulos contados. Os rins, após a avaliação do calibre e tamanho dos ureteres, foram retirados e armazenados até o fim da leitura da ninhada. Então, o *pool* dos rins foi pesado e foi feito um corte longitudinal, em cada um, para exame do

interior do órgão. O baço foi examinado e armazenado. Após a leitura da ninhada o *pool* de baço foi pesado.

O diafragma foi cuidadosamente pinçado e observado para verificar se o mesmo possuía perfurações.

As costelas foram então cortadas com uma tesoura, pelos lados direito e esquerdo até a altura da clavícula. O esterno foi levantado, com o uso de uma agulha, e fixado na própria base de cortiça que já prendia o feto.

O coração e os pulmões foram cuidadosamente pesados após terem sido enxugados. O exame do coração foi meticuloso. Retirou-se o pericárdio e as aurículas para melhor visualização de artérias e veias. A retirada do coração foi realizada fazendo-se um corte nas artérias e veias bem próximo ao órgão.

O timo foi retirado e armazenado em solução salina até o fim da leitura para, posteriormente, o *pool* ser pesado. Por apresentarem baixo peso, o baço, timo e os rins foram pesados ao final da leitura de cada ninhada.

Foi feito um corte transversal na boca do feto para a visualização do palato. A cabeça foi seccionada para exame do cérebro e ventrículos.

### **III. 8 Análise de Anomalias Esqueléticas**

Após sofrerem processo de diafanização os fetos foram analisados quanto à presença de anomalias de esqueleto.

#### **III. 8.1 Processo de diafanização e coloração com Alizarina *Red S***

Os fetos foram diafanizados e corados para análise de esqueleto segundo o método proposto por Dawson (1926) com pequenas adaptações.

Após permanecerem uma semana imersos em solução formol a 5%, os fetos selecionados para exame de esqueleto foram lavados em água durante dois dias. Em

seguida os fetos foram eviscerados, segundo o procedimento anteriormente descrito e confirmado o sexo. Depois da evisceração os fetos foram dispostos em celas individuais, na divisória metálica contida na cuba de diafanização, separados por ninhada, seguindo a ordem como foram numerados logo após a cesárea. Assim, embora a marca inicial desapareça com a diafanização, ainda é possível identificar cada feto de acordo com a posição que ocupava originalmente no útero materno. Em seguida os fetos foram imersos em solução de éter etílico/etanol (1:4) durante uma semana e, posteriormente, lavados em água por mais um dia.

A etapa seguinte de diafanização e coloração teve então início. Os fetos foram imersos em solução formada pela adição de 2ml de Alizarina *Red S* (0,3% em água) a 998ml de solução de hidróxido de potássio a 10% (Alizarina-KOH). Após um a dois dias, quando a solução se tornou marrom, houve troca da solução de Alizarina-KOH. A troca de solução se repetiu com os intervalos necessários até os ossos ficarem bem corados. Quando a visualização do osso Atlas se tornou nítida, a concentração da solução de Alizarina-KOH foi reduzida (1ml de Alizarina a 0,3% + 400ml de KOH a 10% + água até completar 1200ml) e os fetos foram expostos a ela por um período adicional de um a dois dias, no máximo.

Os fetos (com as partes moles transparentes e o esqueleto corado em vermelho) foram lavados exaustivamente em água e depois imersos em solução de álcool benzílico/glicerol/etanol (1:2: 2) por um período de 24 horas. Em seguida os fetos foram imersos e mantidos na cuba de diafanização até o exame do esqueleto. Toda a etapa de diafanização/coloração durou, em média, duas semanas e foi realizada ao abrigo da luz solar.

### **III. 8.2 Análise de Anomalias do Esqueleto Fetal**

Os fetos diafanizados e corados foram retirados da cuba, colocados em uma placa de Petri e examinados individualmente, sob um estereomicroscópio (ZEISS SV11, Alemanha), para a presença de anomalias de esqueleto.

Todos os ossos do esqueleto foram meticulosamente analisados quanto à: 1.presença ou ausência, 2.forma, 3.tamanho, 4.localização e 5.calcificação (normal,

pobrememente calcificado, esponjoso e não calcificado). Foram examinados os ossos do crânio, da coluna vertebral, as costelas, o esterno, os ossos da pelve, da cauda e dos membros anteriores e posteriores.

### **III. 9 Análise Estatística**

O tratamento estatístico dos dados foi realizado pela análise de variância de uma via (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, quando os dados não se ajustavam a uma curva normal. A existência de diferença significativa entre dois grupos foi estabelecida pelo teste de Duncan para amostras independentes, *i.e.*, não-pareadas ou, no caso de dados não-paramétricos, pelo teste *U* de Mann-Whitney. As comparações envolvendo proporções foram feitas pelo teste do Qui-quadrado ou, alternativamente, pelo teste exato de Fisher.

As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa MINITAB® 10.5 (MINITAB Statistical Software, MTB Inc., PA, USA, 1995).

## IV. RESULTADOS

### IV. 1 Efeitos sobre o organismo materno

A Tabela 2 mostra a evolução ponderal de fêmeas tratadas com TPTH durante a gravidez. Antes do início do tratamento com TPTH, *i.e.* até o dia 6 de gravidez, não houve diferenças estatisticamente significativas de peso materno entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, ao final da gravidez, *i.e.* no dia 18, observamos uma redução do peso materno nos grupos tratados com 15 mg TPTH/kg de peso corpóreo ( $48,18 \pm 12,98$ ) e 30 mg TPTH/kg de peso corpóreo ( $41,50 \pm 10,85$ ) quando comparados com o grupo controle ( $62,10 \pm 8,45$ ). Logo nos primeiros dias de tratamento com TPTH (peso no dia 11 *menos* o peso no dia 6) a redução do ganho de peso corporal das fêmeas expostas a 15 mg TPTH/kg e 30 mg de TPTH/kg já se fazia visível. O ganho médio de peso corporal durante toda a gravidez (peso no dia 18 *menos* o peso no dia 0) foi de  $16,68 \pm 12,60$  na dose de 15 mg TPTH/kg e de  $8,58 \pm 10,72$  na dose de 30 mg TPTH/kg, ou seja, cerca de 2 e 3 vezes menores, respectivamente, do que o ganho de peso observado no grupo controle ( $30,19 \pm 8,53$ ). A análise do ganho de peso durante todo o período de gravidez (dia 18-0), descontado o peso do útero, indicou que o TPTH causou consistentemente toxicidade materna a partir de 7,5mg/kg (Figura 5).

A partir da dose de 15 mg TPTH/kg foram observadas alterações clínicas e comportamentais sugestivas de toxicidade materna, tais como, perda de pêlo, hipoatividade e redução do consumo de ração.

Tabela 2: Ganho de peso materno de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

TRATAMENTO	TPTH (mg/kg peso corporal)				
	0	3,75	7,5	15	30
Fêmeas tratadas (N)	22	23	22	23	21
Fêmeas grávidas (N)	20	21	19	21	17
Fêmeas tratadas/ grávidas (%)	90,90	91,30	86,36	91,30	80,95
Ganho de peso materno (g)					
Dia 0	31,91 ± 2,03	32,08 ± 3,28	30,99 ± 2,42	31,46 ± 1,81	32,83 ± 2,46
Dia 18	62,10 ± 8,45	62,27 ± 6,15*	58,25 ± 9,69	48,18 ± 12,98* <sup>a,b,c</sup>	41,50 ± 10,85** <sup>a,b,c</sup>
Peso do útero gravídico	20,36 ± 6,40	20,74 ± 3,38* <sup>♠</sup>	19,82 ± 6,41	14,20 ± 9,15* <sup>a,b,c</sup>	8,33 ± 9,47** <sup>a,b,c,d</sup>
Peso do dia 18 - útero	41,73±3,90	41,61±4,44* <sup>♠</sup>	38,42±4,91	33,98±5,01* <sup>a,b,c</sup>	33,17±3,39** <sup>a,b,c</sup>
Ganho de peso materno (g)					
Dia 6-0	4,34 ± 2,01	4,61 ± 1,53	4,18 ± 2,08	4,36 ± 1,17	3,94 ± 1,30
Dia 11-6	5,08 ± 1,63	4,93 ± 1,21	4,91 ± 1,08	1,28 ± 2,96 <sup>a,b,c</sup>	-0,79 ± 3,29 <sup>a,b,c</sup>
Dia 15-6	15,39 ± 3,90	14,67 ± 3,38*	14,56 ± 4,09	6,99 ± 7,55 <sup>a,b,c</sup>	3,53 ± 6,58 <sup>a,b,c</sup>
Dia 18-15	10,46 ± 3,64	10,90 ± 3,45*	8,51 ± 4,85	4,90 ± 5,82* <sup>a,b,c</sup>	1,09 ± 4,13** <sup>a,b,c,d</sup>
Dia 18-0	30,19 ± 8,53	30,20 ± 4,15*	27,26 ± 9,24	16,68 ± 12,60* <sup>a,b,c</sup>	8,58 ± 10,72** <sup>a,b,c</sup>
Dia 18-0 (menos o útero)	9,83 ± 3,10	9,41 ± 2,32* <sup>♠</sup>	7,43 ± 4,12 <sup>a</sup>	2,48 ± 5,05* <sup>a,b,c</sup>	0,24 ± 2,61** <sup>a,b,c</sup>

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 15mgTPTH/kg. (♠ útero de um animal não foi pesado; \* uma mãe morreu durante o experimento; \*\* duas mães morreram durante o experimento).

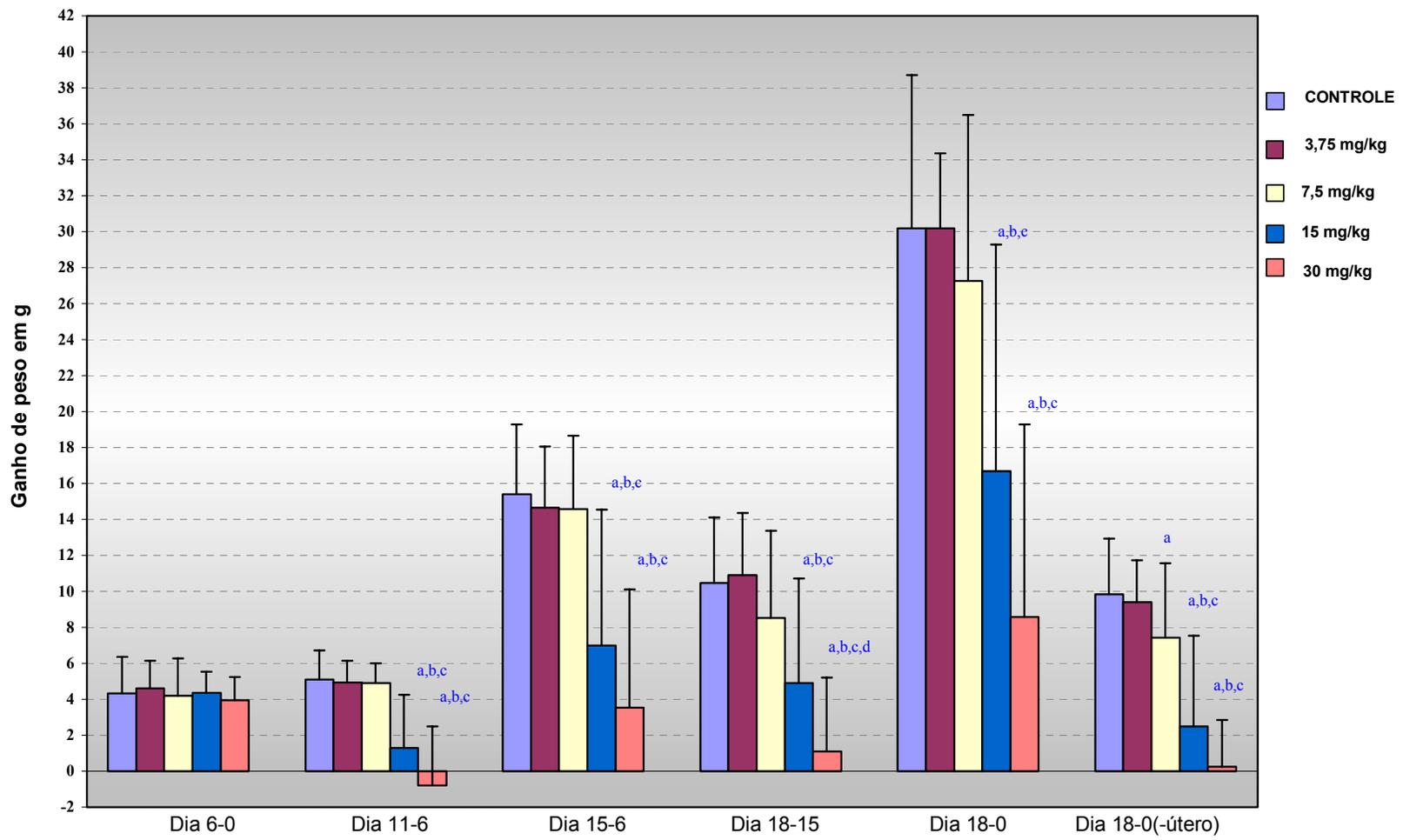


Figura 5: Ganho de peso corpóreo de fêmeas grávidas tratadas oralmente com TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação

## IV. 2 Efeito sobre os órgãos maternos

Na Tabela 3 podem ser encontrados os valores de peso absoluto do timo, fígado e baço maternos no dia da cesárea, assim como o peso relativo [(peso do órgão ÷ peso corporal no dia 18 *menos* o peso do útero) x 100] destes órgãos.

No organismo materno, foi observada uma redução estatisticamente significativa do peso absoluto e relativo de órgãos imuno-relacionados, tais como timo e baço. Como demonstrado na Tabela 3, observamos drástica redução dos pesos absoluto e relativo do baço a partir da dose de 7,5mg TPTH/kg de peso corpóreo. O TPTH também induz redução do peso relativo do timo. Esta redução ocorreu nas doses de 7,5, 15 e 30mg TPTH/kg, apesar de não apresentar-se estatisticamente significativa ( $p=0,0553$ ) na maior dose estudada.

A partir da dose de 15 mg TPTH/kg houve uma diminuição do peso absoluto do fígado ( $2,64 \pm 0,56$ ) em relação ao controle ( $3,24 \pm 0,48$ ). Para verificar até que ponto essa redução da massa hepática seria apenas um reflexo da diminuição de massa corporal total produzida pelo TPTH, comparamos também os pesos relativos do fígado nos grupos tratados e controle. A análise dos resultados referentes aos pesos relativos dos fígados maternos mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos, o que sugere ausência de um efeito direto do TPTH sobre a massa hepática.

**Tabela 3:** Peso dos órgãos maternos de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	0	3,75	7,5	15	30
Fêmeas grávidas	20	21	19	21	17
Fêmeas com reabsorção total de ninhada	1	0	1	5	8
Baço (g)	0,17±0,05	0,15±0,07	0,13±0,03 <i>a,b</i>	0,09±0,03 <i>a,b</i>	0,08±0,03 <i>a,b,c</i>
Baço %	0,39±0,11	0,37±0,16	0,33±0,05 <i>a</i>	0,29±0,06 <i>a,b</i>	0,26±0,06 <i>a,b,c</i>
Timo (g)	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,02	0,01±0,01 <i>a</i>	0,01±0,01
Timo %	0,06±0,02	0,05±0,02	0,05±0,05 <i>a, b</i>	0,04±0,04 <i>a,b</i>	0,04±0,04 <i>aψ</i>
Fígado (g)	3,24±0,48	3,20±0,34	2,94±0,62 <i>a,b</i>	2,64±0,56 <i>a,b,c</i>	2,53±0,41 <i>a,b,c</i>
Fígado %	7,74±0,65	7,72±0,63	7,59±0,84	7,73±0,93	7,60±0,87
Peso do animal no dia 18 menos o útero (g)	41,73±3,90	41,61±4,44*♠	38,42±4,91	33,98±5,01* <i>a,b,c</i>	33,17±3,39** <i>a,b,c</i>

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: *a*: diferente do controle; *b*: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg; *c*: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg e *d*: diferente da dose de 15mgTPTH/kg. (♠ útero de um animal não foi pesado; \* uma mãe morreu durante o experimento; \*\* duas mães morreram durante o experimento), *bψ*: ( $p=0,0577$ ), e *aψ* ( $p=0,0553$ ).

### IV. 3 Embrioletalidade

Não houve alteração do número de sítios de implantação (Tabela 4). Entretanto, a diminuição no número de implantações por ninhada sugere a ocorrência de perdas gestacionais pré- e/ou peri-implantação e como o tratamento com TPTH teve início após a implantação (dia 6), esse resultado já era esperado.

O TPTH causou um aumento na proporção de reabsorções por sítio de implantação nas doses de 15 mg TPTH/kg (29,73%) e 30 mg TPTH/kg (58,29%) em relação ao controle (11,36%), bem como um aumento do número médio de reabsorções por ninhada, sobretudo na maior dose estudada ( $7,27 \pm 6,15$ ). Esses resultados, portanto, demonstram que a partir da dose de 15 mg/kg o TPTH induziu um aumento na frequência de perdas pós-implantação (Tabela 4). Vale ressaltar que tais perdas são predominantemente do tipo precoce, *i.e.* ocorrem logo após a implantação, e que quando consideramos o número total de perdas dos tipos intermediárias e tardias, não há diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. O número de fetos mortos também não difere entre as ninhadas tratadas *in utero* com TPTH e o grupo controle.

A proporção de fetos vivos por sítios de implantação nas mães tratadas com doses de 15 mg TPTH/kg (69,11%) e 30 mg TPTH/kg (42,78%) foi claramente inferior à proporção encontrada nas mães do grupo controle (88,64%). Esse efeito embrioletal também pode ser evidenciado quando analisamos o número médio de fetos vivos por ninhada.

O número de fetos vivos por implantação é inversamente relacionado ao número de reabsorções por implantação. Portanto, o aumento de reabsorções e a diminuição do número de fetos vivos indicam que o tratamento com TPTH durante a gravidez causou uma expressiva embrioletalidade a partir da dose de 15mg/kg.

#### IV. 4 Razão entre fetos fêmeas e machos

A razão entre o número de fetos fêmeas e machos (Tabela 4) dos grupos tratados foi similar àquela do grupo controle, indicando que ambos os sexos respondem com igual susceptibilidade à exposição pré-natal ao TPTH.

#### IV. 5 Retardo do Crescimento Pré-Natal (intra-uterino)

Pode-se observar na Tabela 4 o ganho médio de peso corporal fetal individual e por ninhada. Quando o peso fetal foi analisado considerando a ninhada como unidade estatística, o TPTH causou evidente redução do peso corporal fetal nas doses de 15 mg TPTH/kg ( $1,12 \pm 0,21$ ) e 30 mg TPTH/kg ( $1,08 \pm 0,12$ ) quando comparado com o grupo controle ( $1,31 \pm 0,07$ ). No entanto, o TPTH levou a uma clara diminuição do peso fetal a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg ( $1,28 \pm 0,20$ ), se considerarmos o peso individual como unidade de medida. Esse procedimento estatístico pode superestimar o efeito devido ao grande número de animais avaliados, levando a um significado biológico questionável.

Os dados referentes às alterações do peso dos órgãos dos fetos e do peso do *pool* dos órgãos encontram-se resumidos nas Tabelas 5 e 6. A exposição *in utero* ao TPTH induziu um aumento do peso relativo do fígado fetal (7,5 mg TPTH/kg =  $7,96 \pm 0,94$ ; 15 mg TPTH/kg =  $7,75 \pm 0,72$ ; 30 mg TPTH/kg =  $8,85 \pm 0,73$ ) quando comparado com o controle ( $6,92 \pm 0,73$ ). A partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg houve uma redução estatisticamente significativa do peso absoluto e relativo dos pulmões quando comparado com o grupo controle (Tabela 5). Apesar da redução induzida pela exposição ao TPTH do peso médio dos pulmões e do peso médio corporal dos fetos, observou-se um aumento do peso absoluto e relativo do coração a partir da dose de 3,75 mg/kg de peso corporal (Tabela 5).

A Tabela 6 mostra a média de peso [peso do *pool* do órgão ÷ soma do peso dos fetos] do timo, baço, rim direito e rim esquerdo. Pode-se observar que nenhuma alteração estatisticamente significativa foi encontrada em relação ao peso do baço após a administração do TPTH, e que o aumento do peso do timo em relação ao grupo

controle ocorreu somente nas doses de 3,75 mg/kg e 7,5mg/kg. O TPTH causou aumento do peso dos rins direito e esquerdo nas doses de 7,5mg/kg e 15 mg/kg.

Tabela 4: Dados da cesárea de camundongos tratados oralmente com TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	0	3,75	7,5	15	30
<b>Sítios de implantação</b>					
Total ( ninhada)	264 (20)	252 (20)	253 (19)	259 (20)	187(15)
N por ninhada (média ±DP)	13,20±2,73	12,60±2,26	13,32±2,31	12,95±1,76	12,47±2,72
<b>Reabsorções</b>					
Total ( ninhada)	30(14)	16(10)	32(12)	77(15)	109(13)
Por sítios de implantações (%)	11,36	6,35 <b>a</b>	12,65 <b>b</b>	29,73 <b>a,b,c</b>	58,29 <b>a,b,c,d</b>
Por ninhada (média ±DP)	1,50±1,85	0,80±1,10	1,68±2,38	3,85±5,25 <b>b</b>	7,27±6,15 <b>a,b,c,d</b>
Precoce(N)	9	1	11	64	101
Mediana (min.-máx.)	0 (0-7)	0 (0-1)	0 (0-9)	0 (0-14)	7 (0-15) <b>a,b,c</b>
Intermediária(N)	17	7	18	7	5
Mediana (min.-máx.)	0 (0-5)	0 (0-2)	0 (0-5)	0 (0-2)	0 (0-2)
Tardia(N)	4	8	3	6	3
Mediana (min.-máx.)	0 (0-1)	0 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-1)
Fetos mortos	2	2	4	4	0
<b>Fetos vivos</b>					
Total(N)	234(19)	238(20)	217(18)	179(15)	80(7)
Por sítios de implantações (%)	88,64	94,45 <b>a</b>	85,77 <b>b</b>	69,11 <b>a,b,c</b>	42,78 <b>a,b,c,d</b>
Por ninhada (média ±DP)	11,70±3,87	11,90±2,10	11,42±4,07	8,95±5,61	5,33±6,15 <b>a,b,c,d</b>
<b>Peso corporal (g)</b>					
Por ninhada (média ±DP)	1,31±0,07	1,30±0,08	1,30±0,16	1,12±0,21 <b>a,b,c</b>	1,08±0,12 <b>a,b,c</b>
Individual (média ±DP)	1,31±0,12	1,30±0,12	1,28±0,20 <b>a</b>	1,12±0,21 <b>a,b,c</b>	1,06±0,15 <b>a,b,c,d</b>
Fêmeas/ Machos	115/118	127/111	116/101	87/91	43/37
razão	0,97	1,14	1,15	0,95	1,16

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney, ou por Qui-quadrado. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 15mgTPTH/kg.

Tabela 5: Alteração do peso dos órgãos de fetos expostos *in útero* a TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	0	3,75	7,5	15	30
N ( ninhada)	19	20	18	15	7
Fígado absoluto (g)	0,09±0,01	0,09±0,01	0,11±0,02 <b>a</b>	0,09±0,02 <b>c</b>	0,09±0,02
Fígado %	6,92±0,73	7,27±0,63	7,96±0,94 <b>a,b</b>	7,75±0,72 <b>a,b</b>	8,85±0,73 <b>a,b,c,d</b>
Pulmão absoluto (g)	0,040±0,008	0,031±0,006 <b>a</b>	0,031±0,007 <b>a</b>	0,022±0,006 <b>a,b,c</b>	0,018±0,002 <b>a,b,c</b>
Pulmão %	3,09±0,49	2,31±0,36 <b>a</b>	2,31±0,41 <b>a</b>	1,93±0,30 <b>a,b,c</b>	1,70±0,12 <b>a,b,c</b>
Coração absoluto (g)	0,008±0,001	0,009±0,001 <b>a</b>	0,010±0,002 <b>a,b</b>	0,009±0,002 <b>a</b>	0,009±0,002
Coração %	0,63±0,08	0,71±0,08 <b>a</b>	0,79±0,10 <b>a,b</b>	0,82±0,09 <b>a,b</b>	0,83±0,10 <b>a,b</b>
Peso médio corporal dos fetos fixados	1,30±0,14	1,33±0,15	1,33±0,18	1,15±0,24 <b>a,b,c</b>	1,08±0,13 <b>a,b,c</b>

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão. Os valores percentuais foram analisados pelo teste kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Outros parâmetros foram avaliados pela análise de variância de um critério (ANOVA), seguida pelo teste de Duncan. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 15mgTPTH/kg. Em toda a análise utilizou-se a ninhada como unidade de medida.

Tabela 6: Alteração do peso dos órgãos (*pool*) de fetos expostos *in útero* ao TPTH (0; 3,75; 7,5; 15 e 30mg/kg de peso corporal) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

TRATAMENTO	TPTH (mg/kg de peso corporal)				
	0	3,75	7,5	15	30
N ( ninhada)	19	20	18	15	7
Soma do peso dos fetos fixados±DP (g)	7,80± 2,32	7,65± 1,76	7,56± 2,12	6,55± 2,04	5,78±1,22
Média de peso do Timo (mg)	2,25 ± 0,00	2,80 ± 1,00 <b>a</b>	3,35 ± 1,00 <b>a, b</b>	2,60 ± 1,00 <b>c</b>	2,35 ± 1,00 <b>b, c</b>
Média de peso do Baço (mg)	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
Média de peso do Rim esquerdo (mg)	3,40 ± 0,00	3,36 ± 0,00	3,75 ± 1,00 <b>a, b</b>	3,86 ± 0,00 <b>a, b</b>	3,77 ± 1,00
Média de peso do Rim direito (mg)	3,52 ± 1,00	3,61 ± 1,00	4,06 ± 1,00 <b>a, b</b>	4,27 ± 0,00 <b>a, b</b>	3,90 ± 1,00

Os dados são apresentados como média ±desvio padrão (Peso do *pool* do órgão÷soma do peso dos fetos). Os valores percentuais foram analisados pelo teste kruskal-Wallis, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a**: diferente do controle; **b**: diferente da dose de 3,75 mg TPTH/kg; **c**: diferente da dose de 7,5 mg TPTH/kg e **d**: diferente da dose de 15mgTPTH/kg.

O retardo de desenvolvimento intra-uterino foi ainda mais evidente após análise do esqueleto fetal. Na Tabela 7 podemos verificar a ocorrência de sinais de retardo de animais expostos *in utero* às doses de 3,75 mg TPTH/kg e 30 mg TPTH/kg. Observou-se um aumento da proporção de fetos apresentando sinais de retardo de ossificação, *i.e.* ossos não calcificados, ossos pobremente calcificados e ossos esponjosos na menor dose (3,75 mg TPTH/kg) estudada. O atraso de desenvolvimento esquelético foi particularmente visível nos ossos do crânio, patas dianteiras, patas traseiras, esterno, coluna vertebral e cauda (Tabela 7) (Figuras 6 e 7).

Estes dados indicam que o TPTH retardou o desenvolvimento intra-uterino a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg. É importante ressaltar que este retardo ocorreu inclusive em doses da substância (3,75 mg TPTH/kg) em que não se observou qualquer sinal de toxicidade materna.

Tabela 7: Ocorrência de sinais de retardo de ossificação em fetos de camundongos tratados oralmente com TPTH (0, 3,75, 7,5, 15 e 30 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação

Tratamento	TPTH (mg/kg peso corporal)		
	0	3,75	30
<b>Nº fetos examinados ( ninhadas)</b>	121(19)	123(20)	42(7)
<b>Nº Fetos com retardo (%):</b>			
<b>CRÂNIO</b>			
<b>Basioccipital</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	5 (3,99)	22 (52,25) <sup>a,b</sup>
<b>Basisfenóide</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	8 (6,46) <sup>a,ψ</sup>	23 (54,72) <sup>a,b</sup>
<b>Escamoso</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	9 (21,47) <sup>a,b</sup>
<b>Exooccipital</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	14 (11,21) <sup>a</sup>	3 (7,22) <sup>a</sup>
<b>Frontal</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	6 (4,94)	33 (26,41) <sup>a</sup>	31 (73,72) <sup>a,b</sup>
<b>Gonialo</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	3 (2,47)	4 (9,5) <sup>a</sup>
<b>Hamulus</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	2 (1,52)	6 (14,25) <sup>a</sup>
<b>Interparietal</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	27 (21,85)	63 (50,54) <sup>a</sup>	27 (64,22) <sup>a</sup>
<i>Esponjoso</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Lâmina orbital do frontal</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	29 (23,18) <sup>a</sup>	25 (59,47) <sup>a,b</sup>
<b>Maxilar</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	10 (23,75) <sup>a</sup>
<b>Orbitosfenóide</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	27 (21,66) <sup>a</sup>	27 (64,62) <sup>a,b</sup>
<b>Palato</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	8 (6,46) <sup>a,ψ</sup>	1 (2,47)
<b>Parietal</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	6 (4,94)	32 (25,65) <sup>a</sup>	39 (92,72) <sup>a</sup>
<i>Esponjoso</i>	4 (3,23)	0	14 (33,25) <sup>a,b</sup>
<b>Preesfenóide</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	8 (6,46) <sup>a</sup>	15 (35,72) <sup>a</sup>
<i>Ossos não calcificados</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Nasal</b>			
<i>Ossos não calcificados</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Lacrimar</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	25 (59,47) <sup>a,b</sup>
<b>Mandíbula</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Premaxilar</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	9 (21,47) <sup>a</sup>
<b>Processo Jugar Escamoso</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	9 (21,47) <sup>a</sup>
<b>Processo Jugar Maxilar</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	9 (21,47) <sup>a</sup>
<b>Processo Palatino Maxilar</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	2 (1,52)	9 (21,47) <sup>a</sup>
<b>Pterigóide</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	17 (13,68) <sup>a</sup>	9 (21,47) <sup>a</sup>
<b>Supraoccipital</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	0	40 (95,0) <sup>a,b</sup>
<i>Ossos não calcificados</i>	0	0	1 (2,47)

(continuação Tabela 7)

<b>Timpânico</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	3 (2,47)	5 (11,97) <sup>a,b</sup>
<b>Vomer</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Zigomático</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	30 (24,13) <sup>a</sup>	8 (19,0) <sup>a</sup>
<b>COLUNA VERTEBRAL</b>			
<b>Cervical vertebral</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	23 (18,43) <sup>a</sup>	3 (7,22) <sup>a</sup>
<b>Torácica lateral</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Torácica vertebral</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	33 (26,41) <sup>a</sup>	10 (23,75) <sup>a</sup>
<b>Lombar vertebral</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	33 (26,41) <sup>a</sup>	18 (42,75) <sup>a,b</sup>
<b>Sacral vertebral</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	37 (29,64) <sup>a</sup>	39 (92,72) <sup>a,b</sup>
<b>ESTERNO</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	13 (10,64)	40 (32,11) <sup>a</sup>	13 (30,97) <sup>a</sup>
<b>Esternébra 1</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Esternébra 2</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Esternébra 3</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	3 (7,22) <sup>a</sup>
<b>Esternébra 4</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	2 (1,52)	5 (11,97) <sup>a</sup>
<b>Esternébra 5</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	47 (38,19)	60 (48,07)	20 (47,5)
<i>Ossos não calcificados</i>	2 (1,71)	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Esternébra 6</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	0	20 (47,5) <sup>a,b</sup>
<i>Ossos não calcificados</i>	2 (1,71)	2 (1,52)	1 (2,47)
<b>COSTELAS</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	4 (3,23)	36 (28,88) <sup>a</sup>	10 (23,75) <sup>a</sup>
<b>PATAS DIANTEIRAS</b>			
<b>Clavícula</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	5 (3,99) <sup>a</sup>	0
<b>Escápula</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	27 (21,66) <sup>a</sup>	2 (4,75)
<b>Úmero</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	29 (23,18) <sup>a</sup>	2 (4,75)
<b>Rádio</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	30 (24,13) <sup>a</sup>	3 (7,22)
<b>Ulna</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	2 (1,71)	30 (24,13) <sup>a</sup>	3 (7,22)
<b>Metacarpo</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	11 (8,93)	34 (27,17) <sup>a</sup>	12 (28,5) <sup>a</sup>
<b>Metacarpo 3</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	1 (0,76)	2 (1,52)	0
<b>Metacarpo 5</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	34 (27,55)	8 (6,46)	6 (14,25)
<i>Ossos não calcificados</i>	2 (1,71)	0	1 (2,47)
<b>Dedos</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	15 (12,16)	30 (24,13) <sup>a</sup>	13 (30,97) <sup>a</sup>
<i>Ossos não calcificados</i>	6 (4,94)	3 (2,47)	2 (4,75)
<b>Dedo 2</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	9 (7,22)	1 (0,76)	10 (23,75) <sup>a</sup>
<i>Ossos não calcificados</i>	4 (3,23)	2 (1,52)	3 (7,22)

(continuação Tabela 7)

<b>Dedo 5</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	0	18 (42,75) <sup>a,b</sup>
<i>Osso não calcificado</i>	0	20 (15,96) <sup>a</sup>	3 (7,22) <sup>a</sup>
<b>Falange distal</b>			
<i>Osso não calcificado</i>	0	0	1 (2,47)
<b>PATAS TRASEIRAS</b>			
<b>Metatarso</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	0	23 (54,72) <sup>a,b</sup>
<i>Osso não calcificado</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<b>Metatarso 1</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	3 (2,47)	15 (11,97) <sup>a</sup>	14 (33,25) <sup>a</sup>
<b>Dedos</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	0	0	31 (73,72) <sup>a,b</sup>
<i>Osso não calcificado</i>	19 (15,39)	36 (28,88) <sup>a</sup>	9 (21,47)
<b>Fêmur</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>Fíbula</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>Tíbia</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>TPH dis</b>			
<i>Osso não calcificado</i>	0	0	1 (2,47)
<b>PELVIS</b>			
<b>Púbis</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>Ílio</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>Ísquio</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	10 (8,17)	34 (27,17) <sup>a</sup>	7 (16,72)
<b>CAUDA</b>			
<i>Pobremente calcificado</i>	19 (15,39)	41 (32,87) <sup>a</sup>	41 (97,47) <sup>a</sup>

Os sinais de retardo de ossificação foram: osso não calcificado (todo o osso não corado), Pobremente calcificado (todo o osso pobremente corado), osso esponjoso irregular (apresenta buracos). As percentagens foram analisadas pelo teste de qui-quadrado ou, alternativamente pelo teste exato de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a** assinala os valores que diferem do controle, **b** os valores que diferem da dose de 3,75mg TPTH/kg, e **aψ** assinala  $p=0,056$ . Em toda a análise utilizou-se o feto como unidade de medida.

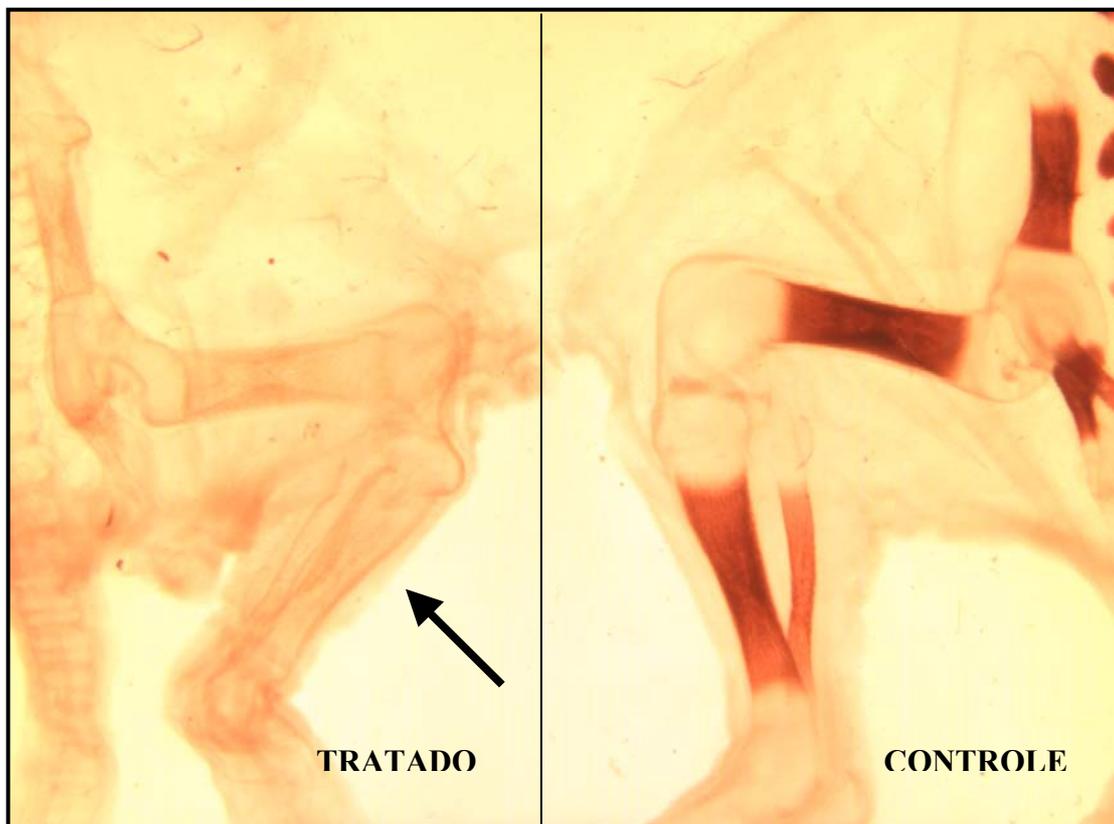


Figura 6: Sinal de retardo de ossificação de esqueleto (**pata traseira - pobremente calcificada**) produzido em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

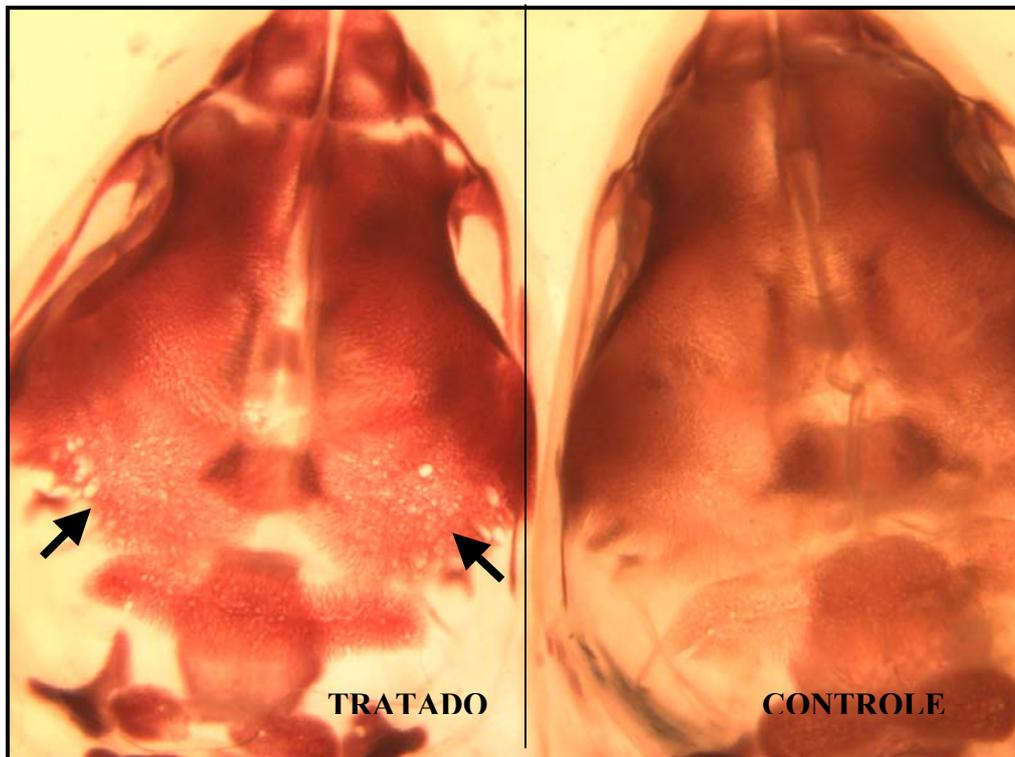


Figura 7: Sinal de retardo de ossificação de esqueleto (**osso parietal - esponjoso**) produzido em fetos de camundongos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação.

## IV. 6 Malformações

### IV. 6.1 Anomalias Visíveis Externamente

Agnatia, cauda encrespada, edema, hematomas, espinha bífida, exoencefalia, exoftalmia e protusão de língua foram alguns dos achados observados ocasionalmente nos animais do grupo controle e nos animais dos grupos tratados com TPTH (Tabela 8). No entanto, um aumento consistente da incidência das anomalias visíveis externamente em decorrência da exposição pré-natal ao TPTH não foi observado.

### IV. 6.2 Malformações Viscerais

A Tabela 9 mostra a ocorrência de anomalias viscerais em ninhadas de camundongos expostos *in útero* ao TPTH. Sinais de malformações viscerais, tais como alterações de timo, e posição irregular de testículos e corno uterino, foram evidentes a partir de 7,5 mg TPTH/kg (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Na análise de alterações viscerais do grupo controle, não encontramos nenhum feto com fenda palatina. No entanto, o aparecimento desta alteração se faz visível a partir da dose de 3,75 mg/kg (3 fetos com fenda palatina, *i.e.* 2,6% do total de fetos avaliados neste nível de dose). Nos grupos tratados com 7,5 mg/kg e 15mg/kg, observamos 1 feto (1%) e 3 fetos (3,5%) com fenda, respectivamente. Já a maior dose estudada induziu um aumento significativo da incidência de fetos com alterações de palato, *i.e.* 14 fetos com fenda palatina, representando um total de 36,84% dos fetos expostos *in utero* a este nível de dose.

Em virtude da pronunciada variabilidade no grau de intensidade desta malformação, que variam de “pequeno afastamento das rugas do palato” até “ampla abertura do palato”, analisamos também a intensidade deste efeito usando uma escala crescente de “graus” de fenda palatina. A escala inclui 4 níveis de efeito, classificados como grau 0 (ausência de efeito) e atingindo o grau máximo (grau 3) (Figura 12).

Não observamos diferença significativa entre os sexos no que diz respeito a ocorrência de anomalias viscerais.

**Tabela 8:** Ocorrência de Anomalias Viscerais Visíveis Externamente em ninhadas de camundongos tratados oralmente com TPTH (0, 3,75, 7,5, 15 e 30 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Nº de fetos examinados (ninhada)	TPTH mg/kg de peso corporal				
	0 234(19)	3,75 238(20)	7,5 217(18)	15 179(15)	30 80(7)
<b>CRÂNIO</b>					
Agnatia	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Exoencefalia	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
Exoftalmia	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
Hematoma no crânio	0(0)	3(3)	1(1)	3(3)	2(2)
Hematoma no focinho	0(0)	3(2)	0(0)	3(3)	0(0)
Hematoma próximo ao olho	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Ponta do nariz arrebitada	2(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Orelha direita mais curta	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
Nariz curto	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
Nariz longo	0(0)	0(0)	3(3)	2(2)	2(2)
Protusão da língua	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)
<b>COLUNA VERTEBRAL</b>					
Dorso flexionado	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
Espinha bífida	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hematoma no dorso	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)	4(1)
Hematoma no pescoço	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<b>PATAS</b>					
Dedos da pata traseira afastados	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hematoma na pata traseira esquerda	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)
Posição irregular da pata dianteira direita	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Posição irregular da pata traseira direita	1(1)	2(2)	1(1)	2(2)	0(0)
Posição irregular da pata traseira esquerda	3(3)	0(0)	0(0)	4(4)	0(0)
Posição irregular dedos da pata dianteira	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
<b>CAUDA</b>					
Cauda encrespada	1(1)	4(3)	0(0)	0(0)	0(0)
Cauda rudimentar	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Hematoma na cauda	2(2)	3(3)	1(1)	0(0)	0(0)
<b>OBSERVAÇÕES GERAIS</b>					
Coágulo na placenta	0(0)	3(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Edema	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	5(2)
Feto avermelhado	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Feto pálido	0(0)	2(2)	0(0)	1(1)	0(0)
Hematoma generalizado	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)

As percentagens foram comparadas pelo Teste de Qui-quadrado ou, alternativamente, pelo Teste de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

**Tabela 9:** Ocorrência de Anomalias Viscerais em ninhadas de camundongos tratados oralmente com TPTH (0, 3,75, 7,5, 15 e 30 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tratamento	TPTH (mg/kg de peso corpóreo)				
	controle	3,75	7,5	15	30
<b>Fetos examinados (ninhada)</b>	<b>113* (19)</b>	<b>115* (20)</b>	<b>103 (18)</b>	<b>85* (15)</b>	<b>38 (7)</b>
<b>Fêmeas examinadas</b>	55	62	57	34	21
<b>Machos examinados</b>	57	52	46	50	17
<b>Fêmeas/Machos (nºtotal)</b>	0,96	1,19	1,24	0,68	1,24
<b>PALATO</b>					
Fenda (grau 1)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Fenda (grau 2)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
Fenda (grau 3)	0(0)	1(1)	1(1)	3 (2)	14 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>
% de fetos com fenda (grau 1, 2 e 3)	0%	2,6%	1,0%	3,5%	36,8%
% de fetos com fenda (grau 3)	0%	0,9%	1,0%	3,5%	36,8%
<b>Total de fêmeas com <u>fenda grau 3</u> (ninhada)<sup>s</sup></b>	0(0)	1(1)	0(0)	1 (1)	10 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>
% do total de fêmeas	0%	1,6%	0%	2,9%	47,6%
<b>Total de machos com <u>fenda grau três</u> (ninhada)<sup>s</sup></b>	0(0)	0(0)	1(1)	2 (2)	4 <sup>a</sup> (3) <sup>aa</sup>
% do total de machos	0%	0%	2,2%	4,0%	23,5%
Forma irregular rugas do palato	0(0)	0(0)	6(5)	3(3)	3(3)
<b>TESTÍCULO</b>					
<b>Direito</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	1(1)	3(2)	1(1)
<b>Esquerdo</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	2(2)	4(3)	2(2)
<b>Direito e esquerdo</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	4 <sup>a</sup> (4)	6 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>	5 <sup>a</sup> (4) <sup>aa</sup>
<b>Total de fetos com posição irregular de testículo (ninhada)</b>	0(0)	0(0)	7 <sup>a</sup> (4)	13 <sup>a</sup> (8) <sup>aa</sup>	8 <sup>a</sup> (4) <sup>aa</sup>
% de fetos ♂ com posição irregular de testículo	0%	0%	6,8%	15,3%	21,1%
<b>CORNO UTERINO</b>					
<b>Direito</b>					
Posição irregular	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	4 <sup>a</sup> (3) <sup>aa</sup>
<b>Esquerdo</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
<b>Direito e Esquerdo</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	0(0)	6 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>	3 <sup>a</sup> (3) <sup>aa</sup>
<b>Total de fetos com posição irregular de corno uterino (ninhada)</b>	0(0)	1(1)	0(0)	6 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>	9 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>
% de fetos ♀ com posição irregular de corno uterino	0%	0,9%	0%	7,1%	23,7%
<b>Total de fetos com alterações de testículo ou corno uterino (ninhada)</b>	0(0)	1(1)	7 <sup>a</sup> (4)	19 <sup>a</sup> (10) <sup>aa</sup>	17 <sup>a</sup> (6) <sup>aa</sup>
% de fetos com alterações de testículo ou corno uterino	0%	0,9%	6,8%	22,35%	44,74%
<b>FÍGADO</b>					
Lóbulo extra	1(1)	4(2)	0(0)	1(1)	0(0)
Forma irregular	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)	1(1)
Nódulo	1(1)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)

(continuação da Tabela 9)

<b>TIMO</b>					
Forma irregular	0(0)	2(2)	18 <sup>a</sup> (10) <sup>aa</sup>	25 <sup>a</sup> (12) <sup>aa</sup>	19 <sup>a</sup> (6) <sup>aa</sup>
% de fetos com timo irregular	0%	1,7%	17,5%	29,4%	50%
Total de fêmeas com timo irregular ( ninhada)	0(0)	2(2)	7 <sup>a</sup> (6) <sup>aa</sup>	10 <sup>a</sup> (8) <sup>aa</sup>	11 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>
% do total de fêmeas	0%	3,2%	12,3%	29,4%	52,4%
Total de machos com timo irregular ( ninhada)	0(0)	0(0)	11 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>	15 <sup>a</sup> (9) <sup>aa</sup>	8 <sup>a</sup> (5) <sup>aa</sup>
% do total de machos	0%	0%	23,9%	30,0%	47,0%
<b>RIM</b>					
<b>Direito</b>					
Posição irregular	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
Pequeno	0(0)	0(0)	3(2)	0(0)	0(0)
Hematoma	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
Forma irregular (lobulado)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Pos irregular + pequeno	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
Pos irreg + forma irregular	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
Grande + forma irregular	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
<b>Esquerdo</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	2(2)
Tamanho	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hematoma	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Forma irregular (lobulado)	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)	0(0)
Pos irregular + hematoma	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
<b>URETER</b>					
Forma irregular + alargado	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)
Posição irreg + forma irreg	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)
<b>PULMÃO</b>					
Ausência de lóbulo acessório	0(0)	2(2)	2(2)	1(1)	1(1)
Superfície irregular	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)
<b>CORAÇÃO</b>					
Posição irregular	0(0)	0(0)	1(1)	1(1)	1(1)
Posição irreg + forma irreg	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(1)
<b>CÉREBRO</b>					
Ventrículos laterais alargados	1(1)	0(0)	2(1)	0(0)	0(0)
III ventrículo alargado	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<b>OLHOS</b>					
Pequeno grau de microftalmia	0(0)	0(0)	1(1)	0(0)	1(1)

As percentagens foram comparadas pelo Teste de Qui-quadrado ou, alternativamente, pelo Teste de Fisher. Em todos os casos, a diferença foi considerada como estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

**a** ≠ controle (feto como unidade de medida)

**aa** ≠ controle ( ninhada como unidade de medida)

**s** não observou-se diferença significativa entre os sexos.

\* Grupo em que não foi registrado o sexo de um feto.

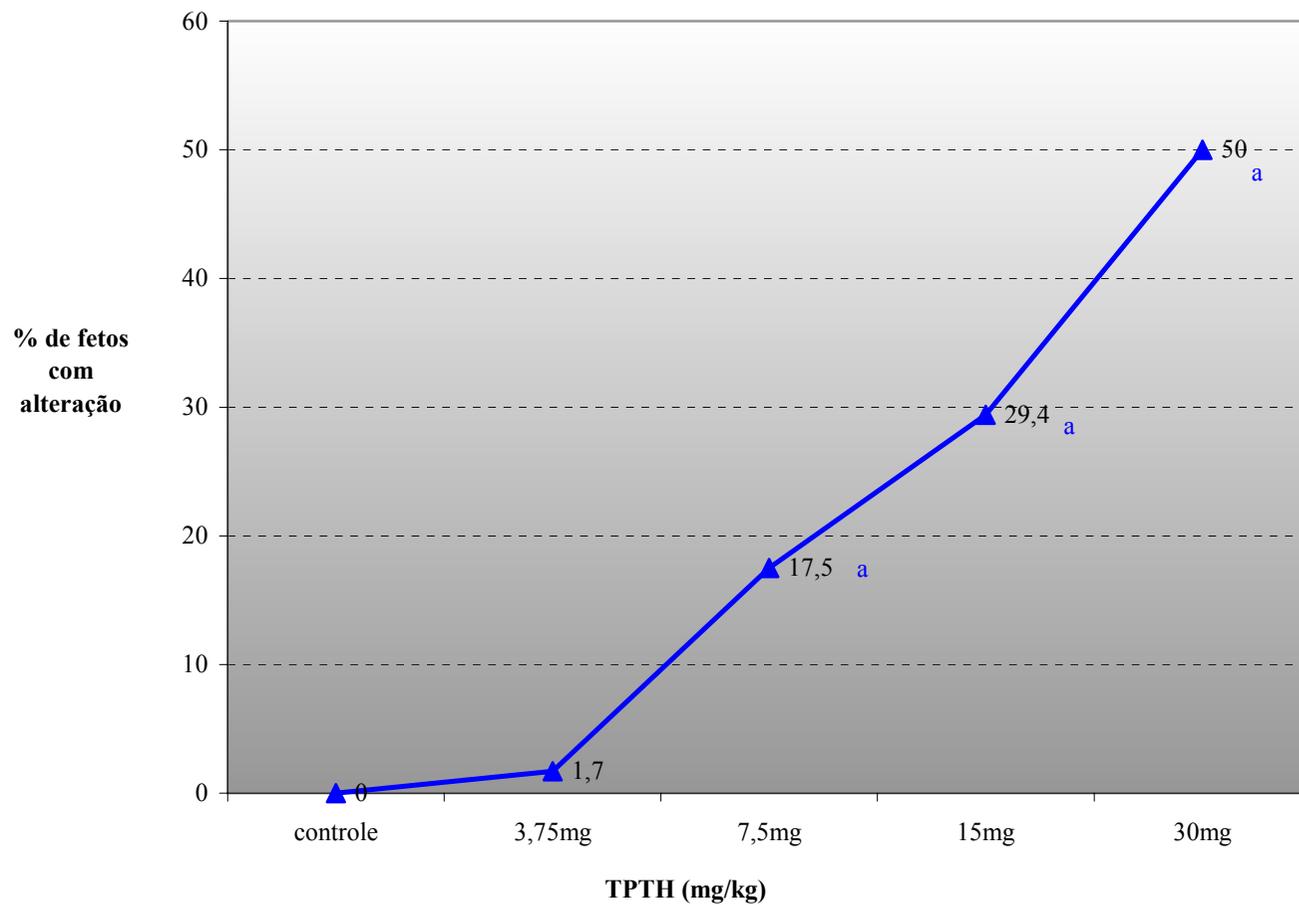


Figura 8: Incidência de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação apresentando forma irregular do timo (a diferente do controle)



Figura 9: Posição irregular do corno uterino de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação (seta)

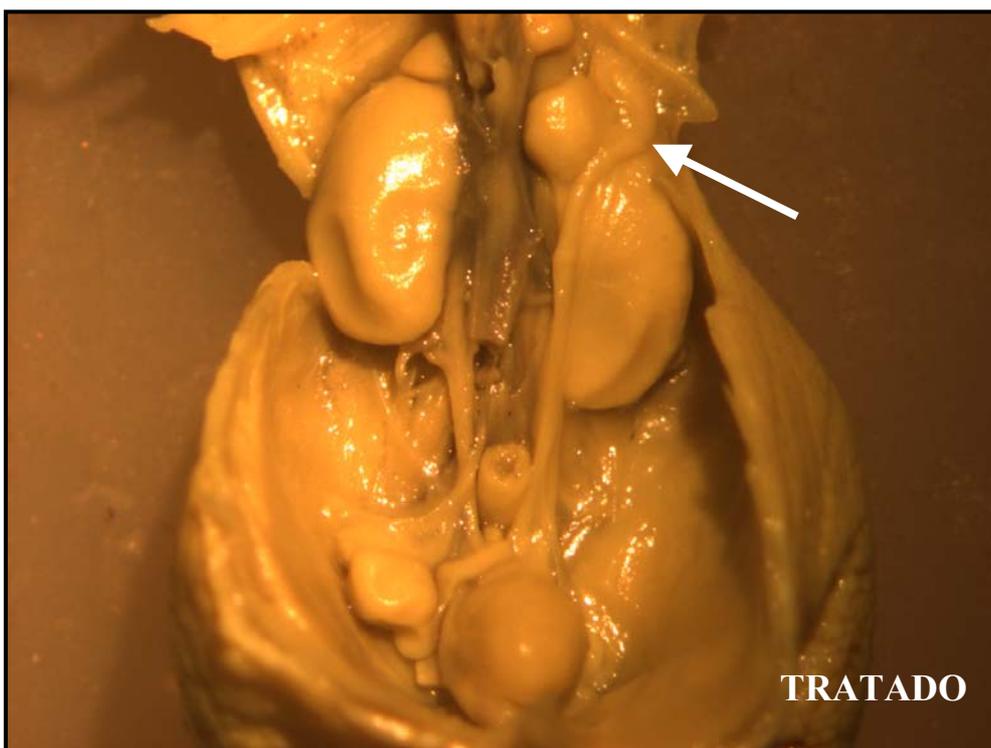
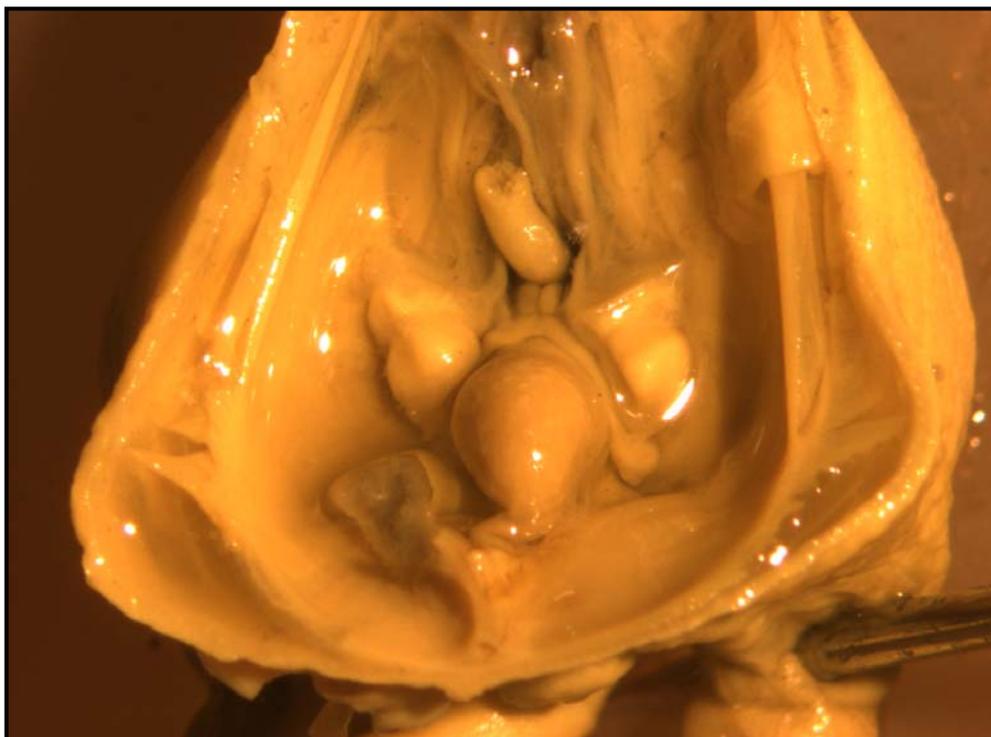
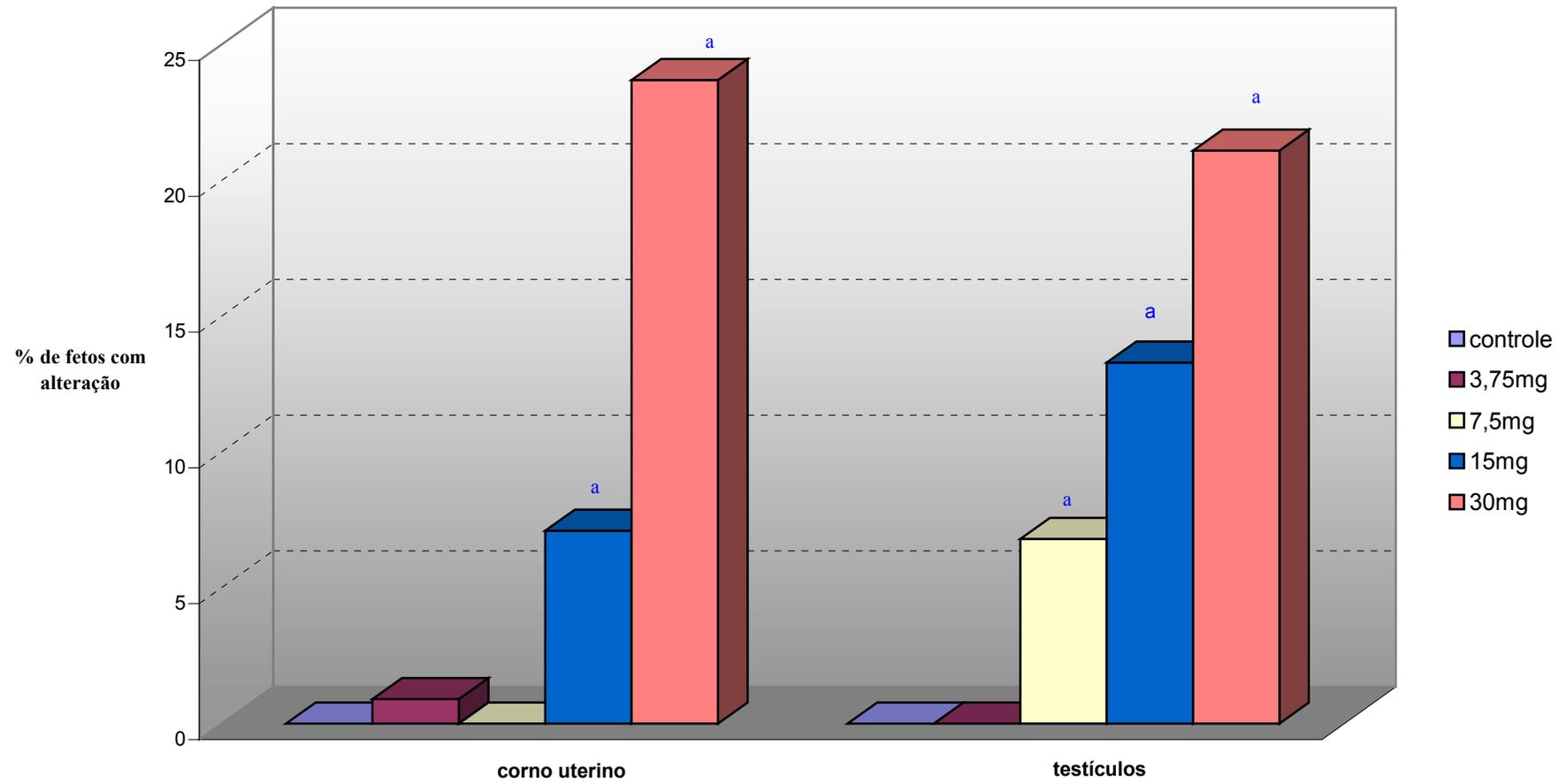
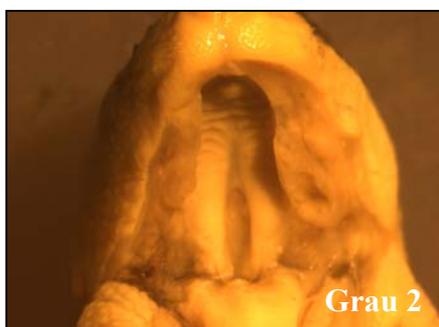
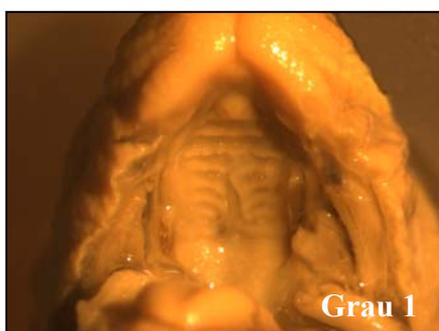


Figura 10: Posição irregular dos testículos de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação (seta)



**Figura 11:** Incidência de fetos expostos *in utero* ao TPTH com posição irregular do corno uterino e dos testículos (a diferente do controle).

## ANÁLISE DE VÍSCERAS



## DIAFANIZAÇÃO

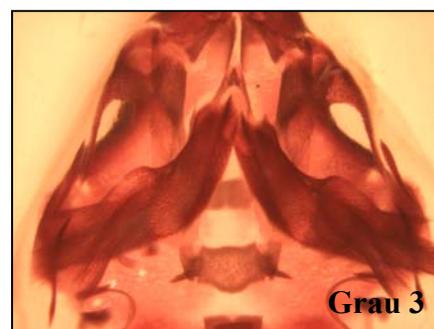
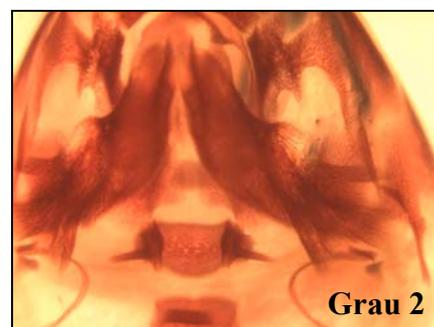
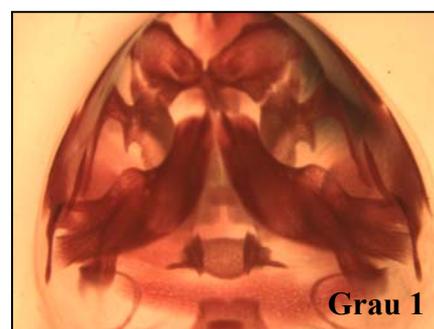


Figura 11: Diferentes graus de fenda palatina de fetos expostos *in utero* ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gestação

#### IV. 6.3 Anomalias de Esqueleto

A ocorrência de malformações de esqueleto em fetos expostos ao TPTH do dia 6 ao dia 17 de gravidez está ilustrada na Tabela 10. Observou-se um aumento marcante na frequência das principais anomalias estruturais nos grupos tratados com 3,75 mg TPTH/kg e 30 mg TPTH/kg. Este aumento se deveu, principalmente, a uma maior incidência de alterações nos ossos do crânio (Figuras 13 e 14).

Animais dos grupos tratados quando comparados aos do grupo controle apresentaram maior frequência das seguintes anomalias:

##### **CRÂNIO:**

- **Osso basioccipital** (forma irregular: controle = 3,99%; 3,75 mg TPTH/kg = 18,43% e 30 mg TPTH/kg = 30,97%);
- **Osso basisfenóide** (forma irregular: controle = 2,47% e 30 mg TPTH/kg = 40,47%);
- **Osso escamoso** (assimétrico: controle = 0,76%; 3,75 mg TPTH/kg = 0,76% e 30 mg TPTH/kg = 9,5%);
- **Osso frontal** (ossificação incompleta: controle = 0%; 3,75 mg TPTH/kg = 3,99% e 30 mg TPTH/kg = 71,25%);
- **Osso interparietal** (ossificação incompleta: controle = 0% e 30 mg TPTH/kg = 16,72%);
- **Osso pterigóide** (forma irregular: controle = 0%; 3,75 mg TPTH/kg = 0% e 30 mg TPTH/kg = 38,0%);
- **Osso preesfenóide** (forma irregular: controle = 0%; 3,75 mg TPTH/kg = 0% e 30 mg TPTH/kg = 26,22%);
- **Osso supra-occipital** (ossificação incompleta: controle = 15,39%; 3,75 mg TPTH/kg = 37,62% e 30 mg TPTH/kg = 80,75%); e (bipartido: controle = 0%; 3,75 mg TPTH/kg = 0% e 30 mg TPTH/kg = 21,47%);
- **Osso parietal** (buraco: controle = 12,16% e 30 mg TPTH/kg = 33,25%).

O aparecimento de malformações, tal como, ausência (*missing*) do interparietal (Tabela 10), está relacionada a animais que apresentaram exoencefalia (Tabela 8).

### **COLUNA VERTEBRAL:**

- **Atlas** (forma irregular: controle = 18,62%; 3,75 mg TPTH/kg = 26,41% e 30 mg TPTH/kg = 58,9%);
- **Axis** (forma irregular: controle = 0%; 3,75 mg TPTH/kg = 3,23% e 30 mg TPTH/kg = 11,97%);
- **Costela adicional rudimentar na lombar** (controle = 1,71% e 30 mg TPTH/kg = 14,25%).

### **ESTERNO:**

- **Esterno** (deslocado: controle = 30,78% e 30 mg TPTH/kg = 66,50%).

### **COSTELAS:**

- **Costela curta no tórax** (controle = 18,62%; 3,75 mg TPTH/kg = 35,44% e 30 mg TPTH/kg = 47,50%).

Além disso, verificou-se uma alta frequência de fenda palatina nos fetos dos grupos tratados com 3,75 mg TPTH/kg (28,12%) e 30 mg TPTH/kg (76,0%) quando comparados com o grupo controle (0%) (Tabela 10 e Figura 12).

Estes resultados indicam que o TPTH foi embriofeto-tóxico a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg de peso corporal, o que contrasta com a toxicidade materna que foi observada a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg de peso corporal.

**Tabela 10:** Malformações esqueléticas em fetos de camundongos tratados com TPTH (0, 3,75, 15 e 30 mg/kg de peso corporal/dia) do dia 6 ao dia 17 de gestação.

Tratamento	TPTH (mg/kg peso corporal)		
	0	3,75	30
<b>Nº fetos examinados ( ninhada):</b>	121(19)	123(20)	42(7)
<b>Nº fetos malformados (%):</b>			
<b>CRÂNIO</b>			
<b>Basioccipital</b>			
<i>Forma irregular</i>	5 (3,99)	23 (18,43) <sup>a</sup>	13 (30,97) <sup>a</sup>
<i>Distância pequena entre o basisfenóide</i>	0	3 (2,47)	2 (4,75)
<i>Fusão com o exooccipital</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Basisfenóide</b>			
<i>Fissura</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	2 (4,75)
<i>Forma irregular</i>	3 (2,47)	1 (0,76)	17 (40,47) <sup>a,b</sup>
<i>Buraco</i>	1 (0,76)	4 (3,23)	0
<b>Escamoso</b>			
<i>Assimétrico</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	4 (9,5) <sup>a,b</sup>
<i>Forma irregular</i>	1 (0,76)	0	1 (2,47)
<i>Estreito</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Centro de ossificação adicional</i>	0	0	4 (9,5) <sup>a,b</sup>
<b>Exooccipital</b>			
<i>Estreito</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Frontal</b>			
<i>Centro de ossificação adicional</i>	5 (3,99)	9 (7,22)	5 (11,97)
<i>Forma irregular</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Buraco</i>	0	0	4 (9,5) <sup>a,b</sup>
<i>Estreito</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Ossificação incompleta</i>	0	5 (3,99) <sup>a</sup>	30 (71,25) <sup>a,b</sup>
<b>Interparietal</b>			
<i>Ausente</i>	1 (0,76)	0	0
<i>Longo</i>	0	1 (0,76)	0
<i>estreito</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Ossificação incompleta</i>	0	1 (0,76)	7 (16,72) <sup>a,b</sup>
<i>Forma irregular</i>	0	0	4 (9,5) <sup>a,b</sup>
<i>Fissura</i>	0	0	3 (7,22) <sup>a,b</sup>
<b>Lacrimar</b>			
<i>Centro de ossificação adicional</i>	0	0	2 (4,75)
<b>Maxilar</b>			
<i>Curto</i>	0	0	1 (2,47)
<i>Distância muito larga</i>	0	0	2 (4,75)
<b>Palatino</b>			
<i>Buraco</i>	2 (1,71)	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Fenda palatina<sup>s</sup></i>	0	35 (28,12) <sup>a</sup>	32 (76,0) <sup>a,b</sup>
<i>Forma irregular</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Parietal</b>			
<i>Estreito</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Buraco</i>	15 (12,16)	20 (15,96)	14 (33,25) <sup>a,b</sup>
<i>Centro de ossificação adicional</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Forma irregular</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Distância muito larga</i>	0	0	4 (9,5) <sup>a,b</sup>
<b>Preesfenóide</b>			
<i>Pequeno</i>	0	1 (0,76)	1 (2,47)
<i>Forma irregular</i>	0	0	11 (26,22) <sup>a,b</sup>
<b>Processo palatino osso maxilar</b>			
<i>Curto</i>	0	0	9 (21,47) <sup>a,b</sup>
<i>Distância muito larga</i>	0	0	12 (28,50) <sup>a,b</sup>

<b>Pterigóide</b>			
<i>Centro de ossificação adicional</i>	0	0	3 (7,22) <sup>a,b</sup>
<i>Forma irregular</i>	0	0	16 (38,0) <sup>a,b</sup>
<b>Supra-occipital</b>			
<i>Buraco</i>	13 (10,64)	6 (4,75)	7 (16,72)
<i>Ossificação incompleta</i>	19 (15,39)	47 (37,62) <sup>a</sup>	34 (80,75) <sup>a,b</sup>
<i>Forma irregular</i>	3 (2,47)	1 (0,76)	0
<i>Bipartido</i>	0	0	9 (21,47) <sup>a,b</sup>
<b>Timpânico</b>			
<i>Centro de ossificação adicional</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Constricção</i>	0	1 (0,76)	0
<b>COLUNA VERTEBRAL</b>			
<b>Atlas</b>			
<i>Forma irregular</i>	23 (18,62)	33 (26,41)	25 (58,9) <sup>a,b</sup>
<i>Estreito</i>	2 (1,71)	7 (5,7)	0
<i>Cartilagem calcificada</i>	1 (0,76)	1 (0,76)	2 (4,75)
<i>Largo</i>	0	5 (3,99) <sup>a</sup>	4 (9,5) <sup>a</sup>
<i>Torto</i>	0	1 (0,76)	6 (14,25) <sup>a</sup>
<b>Axis</b>			
<i>Fissura</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Forma irregular</i>	0	4 (3,23) <sup>a</sup>	5 (11,97) <sup>a,b</sup>
<i>Largo</i>	1 (0,76)	2 (1,52)	3 (7,22) <sup>a</sup>
<i>Torto</i>	0	5 (3,99) <sup>a</sup>	0
<b>Cervical</b>			
<i>Costela adicional rudimentar</i>	64 (52,06)	95 (76,19) <sup>a</sup>	27 (64,22)
<i>Forma irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Longo</i>	0	0	1 (2,47)
<i>Col vert bent</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Torácica lateral</b>			
<i>Fusão</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Torácica ventral</b>			
<i>Vert v dumb-bell</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Vértebra ventral irregular</i>	0	0	1 (2,47)
<b>Torácica vertebral</b>			
<i>Vértebra ventral irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Vert v dumb-bell</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Lombar vertebral</b>			
<i>Fusão com 1ª vert sacral</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Espinha bifida</i>	1 (0,76)	0	0
<i>Vértebra lateral irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Vértebra ventral irregular</i>	0	2 (1,52)	1 (2,47)
<i>Adição de vértebra lombar</i>	0	1 (0,76)	5 (11,97) <sup>a</sup>
<b>Lombar lateral</b>			
<i>Costela adicional rudimentar</i>	2 (1,71)	3 (2,47)	6 (14,25) <sup>a,b</sup>
<i>Fusão</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Ausente</i>	0	1 (0,76)	0
<b>COSTELAS</b>			
<i>Curta</i>	23 (18,62)	44 (35,44) <sup>a</sup>	20 (47,5) <sup>a</sup>
<i>Fusão</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Descontínuo</i>	0	1 (0,76)	0
<i>Ausente</i>	0	2 (1,52)	0
<b>ESTERNO</b>			
<i>Deslocado</i>	38 (30,78)	41 (32,87)	28 (66,5) <sup>a,b</sup>
<b>Esternébra 2</b>			
<i>Dividida</i>	1 (0,76)	2 (1,52)	3 (7,22) <sup>a</sup>
<i>Buraco</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Esternébra 3</b>			
<i>Dividida</i>	0	3 (2,47)	5 (11,97) <sup>a</sup>
<b>Esternébra 4</b>			
<i>Dividida</i>	0	3 (2,47)	6 (14,25) <sup>a</sup>

<b>Esternébra 5</b>			
<i>Dividida</i>	21 (17,1)	20 (15,96)	9 (21,47)
<i>Buraco</i>	1 (0,76)	0	0
<b>Esternébra 6</b>			
<i>Dividida</i>	0	2 (1,52)	2 (4,75)
<b>PATA DIANTEIRA</b>			
<b>Úmero</b>			
<i>Buraco</i>	14 (11,4)	18 (14,44)	10 (23,75) <sup>a</sup>
<b>PHD 2</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>PHD 3</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>PHD 5</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Php 2</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Php 3</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Php 4</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Processo deltóide</b>			
<i>Forma irregular</i>	0	48 (38,57) <sup>a</sup>	5 (11,97) <sup>a</sup>
<b>Dedo 1</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Dedo 2</b>			
<i>Posição irregular</i>	3 (2,47)	5 (3,99)	0
<b>Dedo 4</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Dedo 5</b>			
<i>Posição irregular</i>	3 (2,47)	10 (7,98) <sup>a</sup>	2 (4,75)
<b>Dedos 2+3+4</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	2 (1,52)	0
<b>PATA TRASEIRA</b>			
<b>Dedos</b>			
<i>Posição irregular</i>	2 (1,71)	2 (1,52)	1 (2,47)
<b>Dedo 1</b>			
<i>Posição irregular</i>	7 (5,7)	3 (2,47)	1 (2,47)
<b>Dedo 2</b>			
<i>Posição irregular</i>	5 (3,99)	9 (7,22)	1 (2,47)
<i>Centro de ossifi adicional</i>	0	1 (0,76)	0
<b>Dedo 3</b>			
<i>Posição irregular</i>	4 (3,23)	9 (7,22)	0
<b>Dedo 4</b>			
<i>Posição irregular</i>	4 (3,23)	11 (8,74)	0
<b>Pata inteira</b>			
<i>Posição irregular</i>	1 (0,76)	5 (3,99)	0
<b>TPH dist 3</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	3 (2,47)	0
<b>TPH dist 4</b>			
<i>Posição irregular</i>	1 (0,76)	3 (2,47)	0
<b>TPH dist 1</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>TPH dist 2</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	3 (2,47)	0
<b>TPH dist 5</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>TPH med 3</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>TPH med 4</b>			
<i>Posição irregular</i>	0	1 (0,76)	0
<b>CAUDA</b>			
<i>Encrespada</i>	10 (8,17)	10 (7,98)	1 (2,47)
<i>Ponta da cauda curvada</i>	3 (2,47)	3 (2,47)	1 (2,47)
<i>Curta</i>	0	1 (0,76)	0

As percentagens foram analisadas pelo teste do qui-quadrado ou, alternativamente, pelo teste exato de Fisher. Em todos os casos a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os símbolos são designados como segue: **a** assinala os valores que diferem do controle; **b** os valores que diferem da dose de 3,75mg TPTH/kg e **s** não observou-se diferenças significativas entre os sexos. Em toda a análise utilizou-se o feto como unidade de medida.

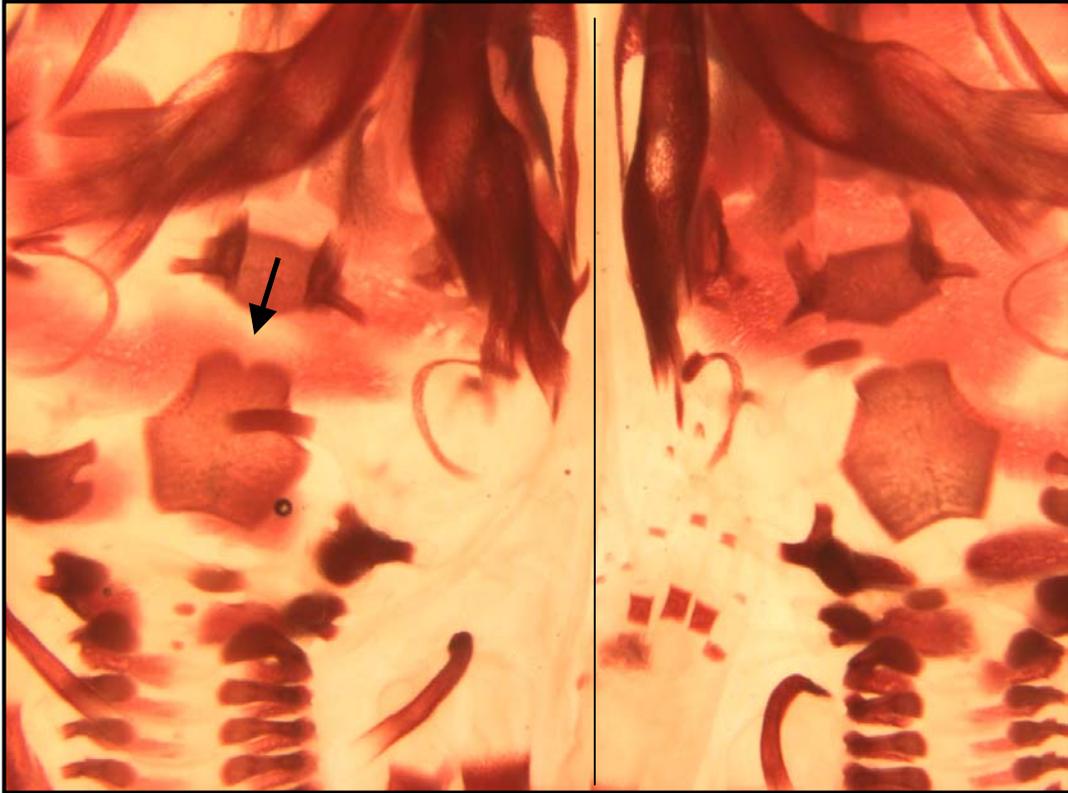


Figura 12: Anomalia esquelética (**forma irregular do osso basioccipital**) encontrada em fetos de camundongos expostos *in utero* do dia 6 ao dia 17 de gestação.

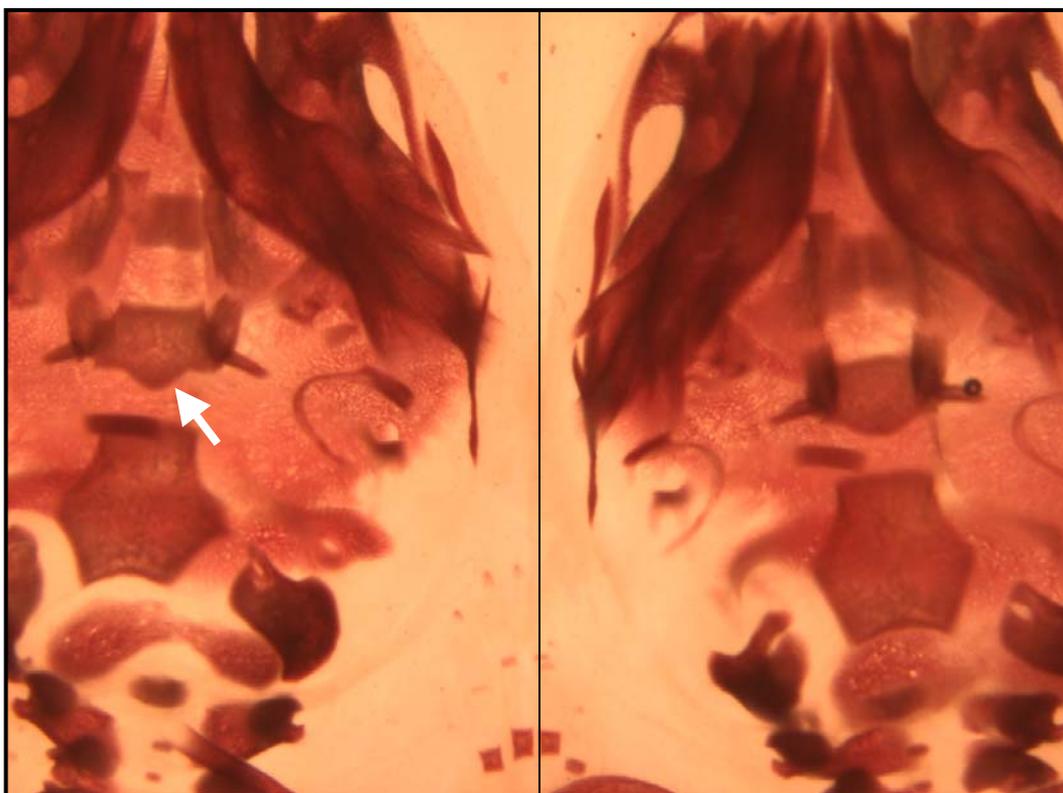


Figura 13: Anomalia esquelética (**forma irregular do osso basisfenóide**) encontrada em fetos de camundongos expostos *in utero* do dia 6 ao dia 17 de gestação.

## V. DISCUSSÃO

A toxicidade reprodutiva de compostos organoestanhos foi reportada em diversos artigos científicos. No entanto, em muitos casos, os dados da literatura são controversos, como podemos notar pelo estudo da toxicidade materna e embriofetotoxicidade do TBTO, um dos mais bem investigados compostos a base de estanho (Tabela 11).

O potencial teratogênico do TBTO foi descrito inicialmente *in vitro* (Krowke *et al* 1986), através de estudo realizado com cultura de broto de membro de camundongos (*mouse limb bud culture*). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma forte interferência do TBTO na diferenciação morfogenética a partir da concentração de 0,03 µg/ml. De acordo com os registros do autor, poucas foram as substâncias que em nível de concentração tão baixo tenham causado efeito tão evidente, tendo por isso o TBTO se destacado como uma das mais potentes substâncias já avaliadas neste sistema *in vitro*.

No entanto, o potente efeito teratogênico observado *in vitro* não se confirmou em todos os estudos *in vivo* publicados entre as décadas de 1980 e 1990 (Tabela 11). Baroncelli *et al* (1990), em estudo conduzido em camundongos *Swiss Webster*, registraram que a exposição ao TBTO durante a organogênese (dia 6 ao dia 15 de gestação) não induzia toxicidade materna em níveis de dose tão altos quanto 20mg/kg, e que somente a partir da dose de 40mg/kg, os primeiros sinais de toxicidade sobre a prole, tais como alterações na *performance* reprodutiva e malformações fetais externas, eram observados. Entretanto, os mesmos autores cinco anos mais tarde (Baroncelli *et al* 1995), em estudo conduzido com a mesma cepa animal previamente estudada, apresentaram dados em contradição aos publicados anteriormente, e estabeleceram o *NOAEL* para toxicidade materna como sendo inferior a 5mg TBTO/kg (Tabela 11).

Tabela 11: Levantamento Bibliográfico da Toxicidade Reprodutiva de Compostos Tributílicos e Trifenílicos de Estanho.

		<b>Espécie/ Exposição</b>	<b>Níveis de dose</b>	<b>Toxicidade Materna</b>	<b>Teratogenicidade</b>	<b>Cesárea</b>	<b>Tipo de avaliação</b>
<b>TBTO</b>	Baroncelli <i>et al</i> 1990	Camundongos/ dia 6 a 15	0,5; 20 e 40 mg/kg	≥40mg/kg	≥40mg/kg	Sim	avaliação de alterações visíveis externamente
	Baroncelli <i>et al</i> 1995	Camundongos/ dia 6 a 15	0,5;10;20 e 30 mg/kg	< 5mg/kg	dados não conclusivos	Não	avaliação dos filhotes após nascimento espontâneo
	Davis <i>et al</i> 1987	Camundongos/ dia 6 a 15	0;1,2; 3,5;5,8; 11,7; 23,4 e 35mg/kg	≥11,7mg/kg	≥11,7mg/kg	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
	Crofton <i>et al</i> 1989	Ratos/ dia 6 a 20	0;2,5;5;10;12 e 16 mg/kg	≥10mg/kg	dados não conclusivos	Não	avaliação dos filhotes após nascimento espontâneo
	Faqi <i>et al</i> 1997	Camundongos/ dia 6 a 17	0;0,5; 1,5; 4,5, 13,5 e 27 mg/kg	≥27mg/kg	≥27mg/kg	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
<b>TBTA</b>	Noda <i>et al</i> 1991	Ratos/ dia 7 a 17	0;1;2;4;8 e 16mg/kg	≥16mg/kg	≥16mg/kg	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
<b>TBTCI</b>	Itami <i>et al</i> 1990	Ratos/ dia 7 a 15	0;5;9;15 e 25 mg/kg	≥ 9mg/kg	Nenhum Efeito*	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
	Ema <i>et al</i> 1995	Ratos/ dia 7 a 9	0;25;50 e 100 mg/kg	Nenhum efeito	Nenhum Efeito*	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
		dia 10 a 12	idem	≥100 mg/kg	≥100 mg/kg	idem	idem
		dia 13 a 15	idem	≥100 mg/kg	≥25 mg/kg**	idem	idem

\* Após avaliação sistemática de esqueleto e vísceras não foram encontrados efeitos teratogênicos.

\*\* Registro de efeito teratogênico em níveis de dose não-tóxico para o organismo materno.

(continuação da Tabela 11)

		<b>Espécie/ Exposição</b>	<b>Níveis de dose</b>	<b>Toxicidade Materna</b>	<b>Teratogenicidade</b>	<b>Cesárea</b>	<b>Tipo de avaliação</b>
<b>TPTCI</b>	Ema <i>et al</i> 1997	Ratos/ dia 0 a 3	0;3,1;4,7 e 6,3mg/kg	$\geq 6,3$ mg/kg	Nenhum Efeito *	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
		dia 4 a 6	0; 6,3; 12,5 e 25mg/kg	$\geq 12,5$ mg/kg	Nenhum Efeito *	idem	idem
	Ema <i>et al</i> 1999b	Ratos/ dia 7 a 9	0;3,1;6,3;9,4 e 12,5mg/kg	$\geq 6,3$ mg/kg	Nenhum Efeito *	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
		dia 10 a 12	0; 6,3; 9,4 e 12,5 mg/kg	$\leq 6,3$ mg/kg	Nenhum Efeito *	idem	idem
		dia 13 a 15	0; 6,3; 9,4 e 12,5 mg/kg	$\leq 6,3$ mg/kg	Nenhum Efeito *	idem	idem
<b>TPTA</b>	Noda <i>et al</i> 1991a	Ratos/ dia 7 a17	0;1,5;3;6;9 e 12mg/kg	$\geq 9$ mg/kg	Nenhum Efeito*	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
<b>TPTH</b>	Chernoff <i>et al</i> 1990	Ratos/ dia 6 a 15	0 e 13 mg/kg	13mg/kg	Nenhum Efeito*	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras
	Viana, 2002#	Camundongos/ dia 6 a 17	0; 7,5;15 e 30mg/kg	$\geq 15$ mg/kg	dados não conclusivos	Não	avaliação dos filhotes após nascimento espontâneo
	Nossos dados	Camundongos/ dia 6 a 17	0;3,75;7,5;15 e 30mg/kg	$\geq 7,5$ mg/kg	$\geq 3,75$ mg/kg**	Sim	avaliação de alterações de esqueleto e vísceras

\* Após avaliação sistemática de esqueleto e vísceras, não foram encontrados efeitos teratogênicos.

\*\* Registro de efeito teratogênico em níveis de dose não-tóxico para o organismo materno.

# Estudo realizado em nosso laboratório.

Davis *et al* (1987), em estudo realizado com camundongos NMRI expostos durante o período de organogênese registraram que em níveis de dose tóxicos para o organismo materno, *i.e.* acima de 11,7mg TBTO/kg, há severa redução do peso fetal e aumento dose-relacionado do número de reabsorções e da incidência de alterações morfológicas, tais como fenda palatina e fusão dos ossos exooccipital/basooccipital. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos em ratos Long Evans (Crofton *et al* 1989), em que o TBTO induziu redução do tamanho médio das ninhadas, do peso fetal e da viabilidade total das ninhadas expostas *in utero* do dia 6 ao dia 20 de gestação, em doses que produziram toxicidade materna severa ( $\geq 10$ mg/kg). Um discreto aumento na incidência de fenda palatina foi observado na dose de 12mg/kg, no entanto, os dados obtidos neste estudo não são suficientes para concluir um efeito teratogênico do TBTO em ratos.

É importante destacar que os estudos citados acima apesar de contribuírem para o entendimento geral da toxicidade reprodutiva induzida pelo TBTO, apresentam importantes limitações no que diz respeito à avaliação plena do potencial teratogênico desta substância. Em alguns estudos (Crofton *et al* 1989 e Baroncelli *et al* 1995) as fêmeas grávidas não foram submetidas à cesárea ao final da gravidez, e desta forma, a gama de alterações morfológicas registradas na prole é somente aquela visível em filhotes nascidos vivos ou nos natimortos que não foram canibalizados no período peri-/pós-natal. Como se sabe, na grande maioria dos casos, os filhotes nascidos com alterações morfológicas não são aceitos pela mãe e são canibalizados. Assim sendo, este tipo de desenho experimental, *i.e.* em que a prole é avaliada após o nascimento espontâneo, apesar de em alguns casos fornecer indícios de efeitos teratogênicos, não deve ser considerada quando se deseja avaliar sistematicamente possíveis malformações induzidas *in utero* por uma dada substância.

Outra importante limitação dos estudos citados acima (Baroncelli *et al* 1990 e Baroncelli *et al* 1995) é o fato dos exames realizados na prole exposta *in utero* englobarem somente alterações visíveis externamente, sem que se tenha levado em consideração possíveis malformações que só são detectadas após minucioso exame de esqueleto (através da coloração de todos os ossos do feto com alizarina *Red S*) ou de vísceras (após análise de todos os tecidos moles), como o realizado por nós no presente estudo.

Um dos primeiros estudos conduzidos com TBTO em que se avaliou não somente malformações visíveis externamente, mas que, através de avaliação sistemática, investigou-se alterações de esqueleto foi aquele publicado por Faqi *et al* em 1997 (Tabela 11). Estes autores estabeleceram o *NOAEL* tanto para toxicidade materna como para embriofetotoxicidade em 13,5 mg TBTO/kg, em camundongos NMRI expostos *in utero* do dia 6 ao dia 17 de gestação. Nesta investigação concluiu-se que o TBTO é teratogênico na espécie estudada a partir da dose de 27mg TBTO/kg, induzindo aumento da incidência de malformações, tais como fenda palatina (em cerca de 11% dos fetos do grupo exposto, comparado com 0,8% dos fetos do grupo controle), encurtamento da mandíbula (em cerca de 5% dos fetos do grupo exposto comparado com 0% dos fetos do grupo controle) e fusão de ossos do crânio (em cerca de 3% dos fetos do grupo exposto comparado com 0% dos fetos do grupo controle). É importante destacar, que os efeitos teratogênicos do TBTO só foram visíveis em níveis de dose tóxicos para o organismo materno e que neste estudo, nenhuma alteração visceral foi detectada.

Com relação à toxicidade reprodutiva de outros compostos organoestanhos, alguns trabalhos merecem atenção (Tabela 11). Após administração oral de tri-*n*-butil acetato de estanho (TBTA) durante o período de organogênese, Noda *et al* (1991b) relataram um aumento da incidência de fenda palatina em ratas Wistar e da mortalidade embriofetal, efeitos encontrados somente no maior nível de dose estudado (16mg/kg). Também nesta faixa de dose observou-se redução severa do ganho de peso materno e do consumo de ração, indicando mais uma vez, que os efeitos teratogênicos observados na prole só ocorrem a partir de níveis de dose tóxicos para o organismo materno.

O tri-*n*-butil cloreto de estanho (TBTCI) apresentou efeito teratogênico em sistema *in vitro* (Yonemoto *et al* 1993), inibindo os processos de diferenciação e proliferação celular em cultura de broto de membro de rato (*rat limb bud culture*). No entanto, Itami *et al* (1990), em estudo realizado com o TBTCI em ratas Wistar expostas durante todo o período de organogênese (do dia 7 ao dia 15 de gestação), não observaram evidência de teratogenicidade após administração oral de doses tão altas quanto 15 e 25mg TBTCI/kg, apesar do TBTCI ter induzido sinais de toxicidade materna a partir da dose de 9mg/kg (Tabela 11), e causado a morte de 70% das fêmeas grávidas e de 100% dos fetos expostos *in utero* à dose de 25mg/kg.

A primeira vista, estes dados estão em discordância com aqueles publicados posteriormente pelo mesmo grupo (Ema *et al* 1995), em que o efeito teratogênico do TBTCI foi evidente a partir da dose de 25mg/kg (Tabela 11), e que mesmo em doses tão elevadas quanto 100mg/kg, a taxa de letalidade materna permaneceu igual a 0%. Entretanto, neste último estudo, Ema *et al* concluíram que a natureza e a intensidade dos efeitos induzidos por este composto dependem fortemente do estágio de desenvolvimento no qual o organismo é exposto. O aumento da incidência de fenda palatina, por exemplo, fez-se visível a partir de 25mg TBTCI/kg em animais expostos diariamente entre os dias 13 e 15 (14% dos fetos expostos), enquanto que em animais expostos durante os dias 10, 11 e 12 foram necessárias doses diárias de 100mg TBTCI/kg para induzir o mesmo aumento na ocorrência de fenda (13% dos fetos expostos). Também o número de perdas pós-implantação parece depender fortemente do período de exposição, tendo sido estabelecido como o intervalo de maior vulnerabilidade aos efeitos embrioletais do TBTCI o início da organogênese, *i.e.* o período compreendido entre os dias 7 e 9 de gestação.

Assim sendo, enquanto o efeito teratogênico do TBTCI parece ser, preferencialmente, induzido na fase mais adiantada do processo do desenvolvimento embriofetal, a exposição a este composto logo após o período de implantação induz preferencialmente efeito embrioletal. Neste contexto, estudos adicionais, ampliando o número de compostos organoestanhos a serem investigados, avaliando a susceptibilidade embriofetal em diferentes fases do desenvolvimento e o efeito de uma única dose na embriogênese de roedores devem ser e serão conduzidos em nosso laboratório.

Com relação aos derivados trifenílicos do estanho, *i.e.* TPTH, TPTCl e TPTA, poucos são os estudos que tenham realizado uma avaliação sistemática de seus potenciais teratogênicos (Tabela 11). Em estudo conduzido por Ema *et al* (1997) nenhuma malformação externa, interna ou de esqueleto foi registrada após exposição a doses entre 3,1 e 25mgTPTCl/kg em ratas expostas durante o período precoce da gestação (período pré-implantação). O TPTCl, no entanto, parece produzir efeito severo antiimplantação, sobretudo quando administrado na fase mais precoce do processo de blastogênese, *i.e.* entre os dias 0 e 3 de gestação. Em outra investigação, na qual ratas foram tratadas oralmente com TPTCl por três dias consecutivos durante o período de organogênese (entre os dias 7-9, ou dias 10-12, ou dias 13-15), Ema *et al* (1999b) não

encontraram alterações morfológicas em decorrência à exposição ao TPTCl. Assim, não há evidências conclusivas que sustentem a teratogenicidade do TPTCl (Tabela 11).

A situação é a mesma para o TPTA. Há, pelo menos até o momento de levantamento bibliográfico desta dissertação, somente um artigo científico publicado a respeito da toxicidade materna e do potencial embriofeto-tóxico do TPTA (Noda *et al* 1991a). Este estudo foi realizado em ratos e não evidenciou efeito teratogênico, nem mesmo em níveis de dose tóxicos para mãe.

Também os artigos científicos sobre a toxicidade reprodutiva do TPTH são escassos, apesar do interesse óbvio que tais estudos representam em termos de Saúde Pública. Nos últimos anos, apenas algumas avaliações foram realizadas, a grande maioria delas pela indústria química (Carlton & Howard 1982; Rodwell, 1987; Rodwell, 1985 e Young, 1986; *apud* WHO, 1999). Estes dados estão compilados na Tabela 12.

É importante destacar, que nenhum destes estudos foi publicado em revista científica, estando disponíveis somente em formato resumido em publicações da Organização Mundial de Saúde (OMS), como no *Concise International Chemical Assessment Document 13* (WHO, 1999), tal qual reproduzidas na Tabela 12. Desta forma, apesar de apresentar indícios de toxicidade reprodutiva, esta forma de apresentação de resultados não nos permite avaliar o verdadeiro grau de severidade das alterações funcionais e morfológicas encontradas, nem tão pouco, descrevem detalhes sobre a metodologia e métodos estatísticos empregados na interpretação final dos resultados.

Além dos registros citados acima, somente um trabalho completo anterior ao nosso sobre a toxicidade reprodutiva do TPTH está disponível até o momento, *i.e.* Chernoff *et al* 1990 (Tabela 11). Ao contrário de nossos achados em camundongos, Chernoff *et al* 1990 (assim como Rodwell, 1985, *apud* WHO, 1999) não observaram efeito teratogênico do TPTH em ratos.

É interessante notar que a grande maioria dos estudos conduzidos com TPT e TBTs em ratos (Crofton *et al* 1989, Itami *et al* 1990, Ema *et al* 1997, Ema *et al* 1999a, Chernoff *et al* 1990 e Rodwell, 1985) não evidenciaram efeito teratogênico nesta espécie, com duas únicas exceções, *i.e.* aqueles realizados com TBTCl (Ema *et al* 1995)

e TBTA (Noda *et al* 1991b) (Tabela 11). Por outro lado, em todos os estudos conduzidos em camundongos, inclusive o nosso, encontrou-se efeito teratogênico desta classe de compostos (Baroncelli *et al* 1990, Davis *et al* 1987, Faqi *et al* 1997 e Viana, 2002), sendo o aumento da incidência de fenda palatina um achado consistente em todos eles. Nos dois únicos estudos citados acima em que se observou efeito teratogênico em ratos (Ema *et al* 1995 e Noda *et al* 1991b), o aumento da ocorrência de fenda também foi observado. Os dados compilados em WHO 1999 sobre os estudos realizados com TPTH em hamsters e coelhos (Tabela 12) não estão suficientemente detalhados a ponto de nos permitir uma avaliação sobre o potencial teratogênico deste composto nestas espécies.

Tabela 12: Estudos de toxicidade reprodutiva do TPTH

Espécie (cepa/N/sexo/dose)	Desenho Experimental	Efeitos	Referência
Hamster grávidas ( <i>Syrian</i> ; 20-25/grupo).	TPTH (0; 2,25; 5,08 e 12 mg/kg/dia, entubação gástrica) do dia 5 ao dia 14 de gestação. Cesárea: dia 15. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, reabsorções, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	Três casos de hidronefrose na dose de 5,08 mg/kg e um caso de hidrocefalia na dose de 12 mg/kg. <b>NOAEL &lt; 2,25 mg/kg.</b>	Carlton & Howard, 1982
Coelhas grávidas (New Zeland albino; 22/grupo).	TPTH (0; 0,1; 0,3 e 0,9 mg/kg/dia via entubação gástrica) do dia 6 ao dia 18 de gestação. Cesárea: dia 29. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, reabsorções, implantações, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	O <b>NOAEL</b> para toxicidade materna foi de <b>0,1 mg/kg.</b> <b>NOAEL</b> para embriofeto-toxicidade foi de <b>0,3 mg/kg</b>	Rodwell, 1987
Ratas grávidas ( <i>Sprague-Dawley</i> ; 45/grupo).	TPTH (0; 0,35; 1,0; 2,8 e 8,0 mg/kg/dia, na ração) do dia 6 ao dia 15 de gestação. Cesárea: dia 20. Desfechos avaliados: toxicidade materna (sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração) e embriofeto-toxicidade (corpo lúteo, número de fetos vivos e mortos, reabsorções, implantações, peso fetal, alterações de vísceras e esqueleto).	Não houve evidência de indução de efeitos estruturais irreversíveis (teratogenicidade). O <b>NOAEL</b> para a toxicidade materna foi de <b>1,0 mg/kg,</b> e para embriofeto-toxicidade foi de <b>2,8 mg/kg.</b>	Rodwell, 1985.
Ratos ( <i>Wistar</i> ; 30/sexo/grupo).	Toxicidade reprodutiva – 2 gerações. TPTH (0; 0,4; 1,5 e 4,0 mg/kg/dia, na ração) durante o crescimento, acasalamento, gestação e lactação. Desfechos avaliados: sinais clínicos, ganho de peso corpóreo, consumo de ração, fertilidade. Peso e análise morfológica dos órgãos dos pais e filhotes. Número de filhotes vivos e mortos.	Mortalidade e redução, dose-relacionada, do peso do timo e baço nos lactentes das gerações F1 e F2, nas doses de 1,5 e 4,0 mg/kg. <b>NOAEL: 0,4 mg/kg.</b>	Young, 1986

WHO, 1999 (modificado)

## V.1 Correlação entre toxicidade materna e embriofeto-toxicidade

Há diversos exemplos que nos mostram que a manutenção da homeostasia materna é essencial para o desenvolvimento embriofetal normal. Por exemplo, o estresse experimentado pela mãe durante a gestação pode produzir *per se* efeitos sobre o desenvolvimento pré- e/ou pós-natal, além de ser capaz de potencializar o efeito teratogênico de outros agentes (Chernoff *et al* 1988). Doenças maternas, tais como diabetes mellitus e hipertemia, podem igualmente comprometer os processos normais de embriogênese, resultando em efeitos embriotóxicos. Também a ação de xenobióticos sobre o organismo materno pode, de forma inespecífica, alterar o desenvolvimento normal da prole.

A relação existente entre toxicidade materna e possíveis efeitos adversos sobre o desenvolvimento do concepto é freqüentemente discutida em estudos de toxicidade reprodutiva e em Fóruns internacionais, tais como o *Workshop on Maternal Toxicity* (Khera, 1984 e 1985; Chernoff *et al* 1988, 1989 e 1990 e Chahoud *et al* 1999). A toxicidade materna, via de regra, é confirmada por avaliações que podem incluir: 1. redução do ganho de peso corpóreo, 2. ocorrência de óbitos durante o período de tratamento, 3. redução do consumo de água e/ou ração, 4. aparecimento de sinais clínicos e 5. alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos. Nas diretrizes das agências regulatórias internacionais recomenda-se que os estudos de toxicidade reprodutiva, além de conduzidos de forma a viabilizar a avaliação da relação dose-efeito, apresentem pelo menos um nível de dose que produza toxicidade materna. Acredita-se que, ao incluirmos um nível de dose tóxico para o organismo materno, estaremos aumentando as chances de trabalhar em faixas de dose capazes de produzir algum tipo de efeito sobre o desenvolvimento embriofetal.

O papel do organismo materno no aparecimento de efeitos embriofeto-tóxicos vem sendo discutido em diversos artigos. Khera (1985) demonstrou que efeitos sobre o desenvolvimento ocorrem em níveis de dose tóxicos para a mãe, concluindo que os efeitos sobre a prole são decorrentes da toxicidade materna. Esta conclusão generalista nos leva a crer que efeitos embriofeto-tóxicos, quando na presença de toxicidade materna, são de menor significado, fato que dificulta enormemente a avaliação e o gerenciamento de risco.

Por outro lado, a toxicidade materna nem sempre está associada à indução de anormalidades do desenvolvimento embriofetal. Por exemplo, o estireno, mesmo em níveis de dose altamente tóxicos para a mãe não causa alterações embriofetais, porque seus mecanismos tóxicos não envolvem a indução de danos teciduais (Murray *et al* 1978).

A interpretação de efeitos adversos sobre o desenvolvimento da prole, em níveis de dose tóxicos para o organismo materno ainda é difícil, uma vez que é praticamente impossível distinguir os efeitos decorrentes especificamente da exposição a um dado agente (através da interação direta da substância com o embrião), daqueles induzidos indiretamente, após alteração da fisiologia materna.

Em nosso estudo, a redução do ganho de peso durante o período de gestação é mais acentuada quando descontamos o peso do útero gravídico do ganho de peso total ao longo dos 18 dias (*i.e.* ganho de peso materno corrigido). Após utilizarmos esse recurso, observamos que a toxicidade materna se torna evidente a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg (Tabela 2 e Tabela 11). É interessante notar que, enquanto os animais do grupo controle apresentaram um aumento considerável da massa corporal (descontado o útero gravídico), o peso das fêmeas tratadas com 15 e 30 mg TPTH/kg no dia da cesárea foi semelhante ao peso inicial (*i.e.* no dia “0” de gestação).

Em detrimento do que ocorreu na dose de 7,5 mg TPTH/kg, as alterações ponderais nas fêmeas tratadas com 15 e 30 mg TPTH/kg foram particularmente acentuadas durante o período de tratamento. Como, entre os dias 6 e 11 de gestação, o peso total dos embriões é muito pequeno para explicar a diminuição de ganho de peso observado, este efeito pode ser considerada também como indicativo de toxicidade materna.

Na dose de 3,75 mg TPTH/kg não foram observadas alterações de ganho ponderal ou quaisquer outros sinais de que o TPTH tenha sido tóxico para as mães. A morte de uma mãe nessa dose pode ser explicada por uma variação individual, uma vez que, ocorreu nos primeiros dias de tratamento e esse animal não apresentou sinais clínicos dignos de nota. Portanto, o intervalo de doses escolhido esta de acordo com o recomendado em diretrizes internacionais para os estudos de teratogenicidade, onde,

como já dito anteriormente, a dose mais elevada é aquela que produz sinais de toxicidade materna e a dose mais baixa não é tóxica para a mãe. Neste intervalo de doses é possível verificar se a embriotoxicidade ocorre em ausência de toxicidade materna ou se, só aparece em doses em que a substância é tóxica para a mãe. Nossos dados mostram que o TPTH induz alterações específicas de esqueleto em faixa de dose em que não há sinais de toxicidade materna, afetando exclusivamente o desenvolvimento embriofetal (*i.e.* doses  $\leq 3,75$ mg TPTH/kg).

Como na grande maioria de estudos realizados com compostos organoestanhosos (Tabela 11), alterações embriofetais, incluindo malformações severas, tais como encurtamento da mandíbula, fusão de ossos cranianos e aparecimento de fenda palatina só se fazem visíveis em nível de dose tóxica para o organismo materno, (com duas únicas exceções, o efeito teratogênico induzido pelo TBTCI [Ema *et al* 1995] e aquele encontrado no presente estudo) a maioria dos autores consideraram tais efeitos como inespecíficos. No entanto, acreditamos que nossos dados e os de Ema *et al* 1995 vêm contribuir para que se faça uma reavaliação do risco destes compostos, sobretudo no que diz respeito a seus potenciais teratogênicos.

## **V.2 Efeitos do TPTH sobre órgãos maternos**

O TPTH causou uma drástica redução do peso absoluto do fígado materno a partir da dose de 15 mg TPTH/kg (Tabela 3). Para verificar se a redução do peso do fígado estaria apenas acompanhando a diminuição do peso corporal, ou se esse órgão seria particularmente vulnerável ao TPTH, analisamos também as modificações de peso relativo. Entretanto, não observamos diferenças em relação ao peso relativo do fígado, o que confirma que a redução do peso deste órgão apenas acompanhou a redução de peso materno.

Observou-se uma redução do peso do baço, absoluto e relativo, a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg e uma pequena redução do peso relativo do timo também foi observada a partir deste nível de dose. Essa redução do peso de órgãos imunorelacionados foi semelhante ao que foi relatado por Chernoff *et al* (1990) em um estudo sobre a toxicidade materna induzida pelo TPTH (13mg/kg) em ratas grávidas.

### V.3 Embriofetotoxicidade

Não foi observada diferença da razão entre o número de fêmeas grávidas (*i.e.* com sítios de implantação detectados pelo método de Salewisk) e o número de fêmeas tratadas (*i.e.* que apresentaram “*plug*” vaginal), como mostra a Tabela 2. Esse dado indica que, no presente estudo, o TPTH não induziu perdas pré- e/ou peri-implantação, *i.e.* o desenvolvimento embrionário e a implantação do blastocisto não foram comprometidos neste esquema de tratamento (do dia 6 ao dia 17 de gestação). Por outro lado, Ema *et al* 1997 e Harazono *et al* 1998 verificaram perdas pré-implantação em ratas Wistar ao administrarem doses  $\geq 6,3$  mg TPTCl/kg e 16,3 mg TBTCI/kg, respectivamente, em intervalos que variaram entre o dia 0 e o dia 7 de gravidez. As perdas gestacionais observadas por esses autores se devem, provavelmente, ao período de tratamento ocorrer antes de um momento crítico do desenvolvimento uterino, *i.e.* o processo de implantação. No trabalho de Harazono *et al* 1998, os fetos não foram avaliados quanto alterações de esqueleto e vísceras e por isso o estudo não foi citado na Tabela 11.

Em nosso estudo, uma drástica redução do ganho de peso materno foi observada a partir da dose de 15 mg TPTH/kg e foi acompanhada por embriofetotoxicidade e pela redução do peso corporal da prole. Este achado está de acordo com diversos trabalhos, nos quais o tratamento com composto a base de estanho levou a uma diminuição do ganho de peso materno, acompanhada da diminuição do tamanho médio das ninhada (*i.e.* fetos vivos por ninhada) e da redução do peso médio dos filhotes.

A embriofetotoxicidade pós-implantação é usualmente avaliada pela proporção de fetos vivos (em relação ao número total de implantações) e pelo número de reabsorções em relação aos sítios de implantação, revelados no momento da cesárea pela técnica de Salewisk (1964). No presente estudo, observamos um aumento da proporção de reabsorções por sítios de implantação e de reabsorções por ninhada a partir da dose de 15 e 30mg TPTH/kg, respectivamente e também uma diminuição da proporção de fetos vivos por implantações ou reduções da média de fetos vivos por ninhada (Tabela 4). A embriofetotoxicidade foi um desfecho igualmente encontrado por diversos autores após a exposição de fêmeas grávidas a outros compostos organoestanhos. Por outro lado, Faqi *et al* (1997) não encontraram aumento percentual de reabsorções, nem diminuição da média dos fetos vivos por ninhada após exposição de camundongos ao TBTO.

#### V.4 Retardo do Crescimento intra-uterino e Teratogenicidade

Duas alterações ao final da gravidez demonstraram que, no intervalo de doses investigado, o TPTH retardou o desenvolvimento pré-natal: o menor peso fetal e a maior proporção de fetos apresentando sinais de retardo de ossificação de esqueleto.

Os fetos expostos *in utero* ao TPTH apresentaram uma clara diminuição de peso fetal a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg, quando o feto foi usado como unidade de medida, e nas doses de 15 e 30 mg TPTH/kg ao considerar a ninhada como unidade de medida. Nos níveis inferiores de dose não foram observadas reduções de peso dos fetos.

Contudo, quando analisamos a presença de sinais de retardo de ossificação do esqueleto fetal, *i.e.* ossos não calcificados, pobremente calcificados ou esponjosos, (Tabela 7) foi possível constatar que há um aumento dose-dependente da proporção de fetos com atraso do desenvolvimento esquelético a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg.

Como a diminuição do peso fetal e o atraso da ossificação são dois indicadores de um mesmo fenômeno, *i.e.* o retardo do crescimento intra-uterino, estes dados sugerem que a avaliação de alterações de esqueleto (retardo da ossificação) é um indicador mais sensível deste efeito do que o peso fetal. Esta constatação vem confirmar o que já havia sido descrito, em nosso laboratório, em experimentos com ratas Wistar tratadas com  $\beta$ -mirceno (Delgado *et al*, 1993) e com  $\alpha$ - terpineno (Araújo *et al*, 1996).

Outra constatação que emerge dos dados obtidos é a que o retardo do crescimento embriofetal (atraso de ossificação) já apareceu de forma evidente na dose de 3,75 mg TPTH/kg, dose esta em que não foi observado qualquer indício de toxicidade materna. Portanto, os dados obtidos sugerem que este efeito embriotóxico do TPTH é, via de regra, primário, ou seja, o efeito sobre o feto, *i.e.* o retardo do crescimento intra-uterino, não pode ser explicado unicamente pela toxicidade da substância para o organismo materno.

As anomalias evidenciadas pela microdissecção dos fetos fixados em solução de Bouin, ao contrário daquelas detectadas pelo exame externo, revelaram indícios consistentes de teratogenicidade do TPTH, *i.e.* os nossos resultados mostraram que o TPTH aumenta a ocorrência de malformações viscerais.

No presente estudo, a frequência de anomalias visíveis ao exame externo (Tabela 8) não se apresentou aumentada. Dentre as alterações encontradas nos fetos expostos *in utero* ao TPTH, o aparecimento de posição irregular das patas, cauda encrespada e hematoma, foram as que contribuíram de forma mais significativa para o aumento do número de anomalias. Entretanto, esses achados não devem ser superestimados, porque essas anomalias ocorreram em maior quantidade na menor dose testada, e também, apareceram espontaneamente no grupo controle.

Por outro lado, o exame dos órgãos internos indicou aumento consistente de anormalidades dos fetos expostos *in utero* ao TPTH. Um aumento dose-relacionado da frequência de fetos apresentando timo com forma irregular foi observado a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg. Esse efeito pode estar associado à propriedade imunotóxica dos compostos trifenil de estanho.

Relatos sobre alterações morfológicas em órgãos reprodutivos femininos em decorrência à exposição *in utero* ao TPTH, como a por nós encontrada no presente estudo (*i.e.* posição irregular de corno uterino), não haviam sido descritas na literatura.

No entanto, estudos sobre a interferência de TPT e TBT sobre o desenvolvimento sexual masculino são mais frequentes. A posição irregular de testículos observada em nosso estudo a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg foi semelhante à encontrada em ratos por Ema *et al* (1991) após a exposição a 5 mg/kg de di-*n*-butil dicloreto de estanho (DBTCI) do dia 7 ao dia 15 de gestação. Em ratos (Iwai *et al* 1981) e camundongos (Kimmel *et al* 1977) o TBT administrado por via oral é metabolizado a derivados dibutil de estanhos (DBT) e DBT são considerados teratogênicos, tanto *in vivo* (Ema *et al* 1995), quanto *in vitro* (Yonemoto *et al* 1993).

Em estudo conduzido para medir a concentração de trimetil de estanho (TMT) em vários tecidos de camundongos machos, Doctor *et al* (1983) relataram que o TMT é rapidamente distribuído nos rins, fígado, sangue, pulmões e testículos, e que o pico é

alcançado 1h após a administração. Snow & Hays (1983) mostraram que a exposição de machos adultos ao TPTCl induz distúrbios nos túbulos seminíferos em 72% dos animais tratados. Saxena *et al* (1985) registraram que a administração intratesticular de di-n-butil de estanho induz uma marcante mudança degenerativa nos testículos, com possível atrofia dos túbulos seminíferos e completa suspensão da espermatogênese. Omura *et al* (2001) realizaram um estudo de toxicidade reprodutiva de 2 gerações com o TBTCl em ratos, a fim de avaliar os efeitos deste composto sobre o desenvolvimento sexual masculino. Estes autores observaram diminuição do peso dos testículos e do epidídimo, apesar das concentrações do hormônio luteinizante e da testosterona no soro não estarem diminuídas. Concluiu-se com este estudo que as mudanças observadas correspondem à inibição da aromatase e, portanto o TBTCl deve ser um fraco inibidor da aromatase em ratos machos. No que diz respeito a masculinização de gastrópodes expostos ao TBT, o relatório do Programa Internacional de Segurança de Químicos (IPCS) sobre desreguladores endócrinos indica um possível mecanismo endócrino envolvido, com aumento do nível de andrógeno através da atividade da aromatase (Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors).

Com relação à avaliação das anomalias de esqueleto, o presente estudo demonstrou claramente que o TPTH é embriofeto-tóxico em doses  $\geq 3,75$  mg TPTH/kg. A proporção de fetos com malformações de esqueleto aumentou de forma dose-dependente, a partir de 3,75 mg TPTH/kg (Tabela 10). No crânio, as anomalias que mais contribuíram para este aumento foram a “forma irregular” do osso basioccipital e do osso basioesfenóide, a “ossificação incompleta” do frontal, do interparietal, do parietal e do supra-occipital, “buraco” no parietal e “fenda palatina” no osso palatino. Faqi *et al* (1997) registraram fusão do osso occipital com a sua parte basal em 3% dos fetos e uma alta incidência de fenda palatina (11,4%). Fusão do basioccipital com o exooccipital (2,5%) foi encontrada na maior dose testada no presente estudo, porém este achado não foi estatisticamente significativo. Na coluna vertebral observou-se “forma irregular” do Atlas e do Axis, no esterno observou-se um aumento de “deslocamento”, enquanto em relação às costelas, as anomalias encontradas foram a presença de costelas “mais curtas” e costelas rudimentares “extras na região cervical”.

A relação dose-resposta indica que malformações de esqueleto foram produzidas pelo TPTH em doses  $\geq 3,75$  mg TPTH/kg, na qual marcante retardo do crescimento pré-natal também ocorreu. No entanto, a embriofetividade foi notada somente nas doses de

15 e 30 mg TPTH/kg. Esse modelo dose-resposta sugere que malformações do esqueleto fetal e retardo do crescimento intra-uterino são diferentes graus de manifestações de um mesmo insulto primário ao embrião. É geralmente aceito que retardo do crescimento pré-natal e aumento da taxa de reabsorções podem ser secundários à indução de toxicidade materna pela substância (Manson & Kang, 1994). Como discutido anteriormente, o papel da toxicidade materna como causa das malformações fetais, é ainda motivo de controvérsia. Khera (1984) revisou dados publicados e examinou a relação entre toxicidade materna, malformações e embriotoxicidade. De acordo com Khera (1984), no camundongo, mesmo malformações tão severas quanto defeitos no tubo neural, fusão ou costelas ausentes e esternébras fundidas podem ser causadas pela toxicidade materna. Em ratos e coelhos, Khera (1985) encontrou sinais de toxicidade materna associados à anomalias estruturais graves, tais como, vértebras fundidas, ausentes ou cortada longitudinalmente, e esternébras fundidas, ausentes, não alinhadas ou onduladas. Embora muitos autores não concordem com a conclusão de Khera de que malformações importantes (*e.g.* exencefalia) podem ser secundárias à toxicidade materna, é geralmente aceito que algumas variações e anomalias estruturais reversíveis de menor importância (*e.g.* costelas “extras” ou onduladas) podem resultar dos efeitos tóxicos materno (Manson & Kang, 1994 e Rogers & Kavlock, 1996). Por conseguinte, acredita-se que um aumento da frequência de variações e malformações de menor importância encontradas somente em doses tóxicas para a mãe, não necessariamente vai refletir o potencial teratogênico da substância testada.

Acompanhando o que foi observado em relação ao retardo do desenvolvimento esquelético, o aumento da incidência de fetos com malformações de ossos manifestou-se a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg, enquanto os indícios de toxicidade materna só se tornaram evidentes a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg. Esses dados sugerem que o TPTH induziu embriotoxicidade em ausência de toxicidade materna (*i.e.* em doses nas quais não se observou distúrbio da homeostasia ou do metabolismo materno) indicando que a toxicidade pré-natal do TPTH em camundongos não é um efeito mediado diretamente pela toxicidade materna.

## V.5 Considerações finais

É importante destacar que o estudo da Toxicidade Reprodutiva de agentes químicos é uma das áreas mais complexas da Toxicologia Preditiva, e que em nossa investigação, somente um período restrito deste processo, *i.e.* o desenvolvimento embriofetal, foi avaliado.

A complexidade dos estudos de Toxicologia Reprodutiva se deve, em parte, à própria natureza e duração do processo reprodutivo<sup>1</sup>. *A priori* o processo reprodutivo é vulnerável em todas os seus estágios (Figura 15), como pode ser demonstrado, por exemplo, pelo fato de 10 a 20% dos casais dos países ocidentais industrializados não serem capazes de gerar filhos, ou pela ocorrência de cerca de 15% de abortos espontâneos com manifestações clínicas (Riecke & Stahlmann, 2000).

Além disso, dados como a morte de aproximadamente 50% dos embriões humanos logo após o processo de fertilização, o nascimento de cerca de 2-3% do total de crianças nascidas no mundo industrializado com algum defeito congênito e outras anomalias e/ou mal-funcionamento de vários órgãos que só serão detectados durante o primeiro ano de vida, demonstram que o processo reprodutivo humano é afetado com certa frequência, mesmo na ausência de fatores exógenos.

Nossa experiência com a avaliação do uso de drogas e agentes químicos em geral na gravidez indica que ambos, os estudos em animais e os estudos epidemiológicos são essenciais para a realização plena da avaliação de risco de uma dada substância. Tanto os estudos conduzidos em animais como os dados epidemiológicos apresentam algumas vantagens e, em contra partida, um certo grau de limitação. Diferenças entre espécies são, sem dúvida, a maior limitação dos estudos conduzidos em animais.

---

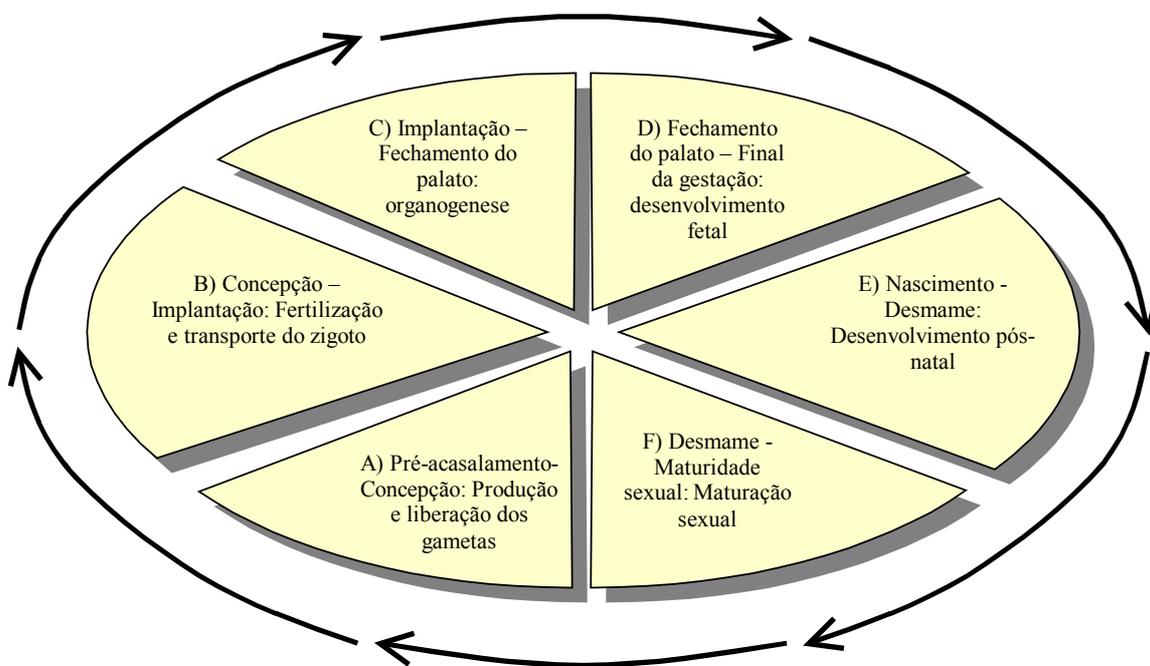
<sup>1</sup> O processo reprodutivo é o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Portanto, o ciclo reprodutivo não consiste apenas na concepção, gravidez e nascimento, mas na verdade tem início com a produção de gametas nos pais (ainda no período pré-natal), seguindo pela fertilização e desenvolvimento embriofetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto torna-se capaz de procriar (Figura 15).

Por razões óbvias, substâncias potencialmente tóxicas na gestação não são avaliadas em estudos clínicos prospectivos randomizados. Desta forma, os dados no homem são unicamente aqueles provenientes de condições de exposição pré-existentes e o tipo de informação mais freqüente neste contexto é aquela originária de registros médicos. Além disso, alguns defeitos reprodutivos, como malformações congênitas, são eventos raros e somente estudos muito extensos seriam capazes de detectá-los em associação com determinada exposição.

Mesmo na Alemanha um dos países mais afetados com a “*Tragédia da Talidomida*” (cerca de 1/3 das mães grávidas expostas a talidomida no primeiro trimestre de gravidez deram à luz filhos com malformações) foram necessários vários anos de uso e o nascimento de milhares de crianças excessivamente malformadas antes que a relação causa-efeito para o uso deste agente sedativo na gravidez fosse estabelecido, apesar de a talidomida induzir defeitos anatômicos praticamente patognomônicos para este agente. Isso serve para enfatizar a dificuldade que existe em reconhecer medicamentos e outros produtos como nocivos quando administrados na gravidez, sobretudo no caso de efeitos tóxicos que não são tão expressivos ou no caso de malformações que ocorrem espontaneamente com certa freqüência em populações não-expostas (alto *background*).

No entanto, se dados experimentais como os demonstrados nesta dissertação são disponibilizados, os achados clínicos podem ser interpretados nesta base.

Figura 15: O ciclo reprodutivo. A reprodução nos mamíferos pode ser dividida em seis partes cada qual com um grau de susceptibilidade aos diferentes efeitos adversos de drogas e químicos. Portanto, devem ser estudadas por testes de toxicidade reprodutiva específicos. (Fonte: Riecke, 2000)



Estudos específicos:

A) Pré-acasalamento até a concepção: avaliação das funções reprodutivas de adultos machos e fêmeas, desenvolvimento e maturação dos gametas, comportamento no acasalamento e fertilização.

B) Concepção até a implantação: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, desenvolvimento pré-implantação e implantação.

C) Implantação até o fechamento do palato: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, desenvolvimento embrionário e formação de órgãos principais.

D) Fechamento do palato até o final da gestação: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, crescimento e desenvolvimento fetal, e crescimento e desenvolvimento dos órgãos.

E) Nascimento até o desmame: avaliação das funções reprodutivas de adultos fêmeas, adaptação neonatal a vida extra-uterina, crescimento e desenvolvimento pré-desmame.

F) Desmame até a maturidade sexual: crescimento e desenvolvimento pós-desmame, adaptação a vida independente, e alcance da função sexual completa.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que o TPTH foi tóxico para o organismo materno, reduzindo o ganho de peso ao longo da gravidez e induzindo efeitos tóxicos nas doses de 7,5; 15 e 30 mg TPTH/kg. Em níveis de dose ainda menores, *i.e.* a partir de 3,75 mg TPTH/kg, o TPTH afetou adversamente o desenvolvimento embriofetal de camundongo, o que nos permite concluir que o TPTH é embriofeto-tóxico em doses em que não foram observados indícios de toxicidade materna, apontando para uma certa seletividade dos efeitos adversos sobre o desenvolvimento embriofetal.

Dentre os efeitos induzidos *in utero* pelo TPTH, os mais marcantes foram:

- Aumento na proporção de reabsorções e redução do número de fetos vivos a partir da dose de 15 mg/kg. Esses achados indicam a embriofetalidade causada pelo TPTH.
- Retardo do desenvolvimento intra-uterino, caracterizado por diminuição do peso corpóreo fetal a partir da dose de 7,5 mg TPTH/kg e atraso do desenvolvimento esquelético (ossos não calcificados, ossos pobremente calcificados e ossos esponjosos) a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg.
- Aparecimento de malformações viscerais, tais como, forma irregular do timo e posição irregular de testículos e cornos uterinos a partir da dose de 7,5mg/kg.
- Ocorrência de malformações esqueléticas a partir da dose de 3,75 mg TPTH/kg, *i.e.* fenda palatina, forma irregular de ossos do crânio, esterno deslocado, entre outras.

Os dados do presente estudo indicam que o TPTH é uma substância teratogênica, uma vez que induziu um aumento na frequência de malformações nos grupos tratados que não ocorreram (*e.g.* fenda palatina) ou que ocorreram em frequência relativamente baixa (*e.g.* forma irregular de ossos do crânio, tais como basioccipital e do basisfenóide) no grupo controle. Nas condições do presente estudo, não foi possível fixar o nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos (ou *NOAEL* < 3,75mg TPTH/kg), devido ao fato de na menor dose estudada terem sido observados efeitos adversos.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA, 1985. <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/h13.htm>.

ARAÚJO, I.B., SOUZA, C.A.M., DE-CARVALHO, R.R., KURIYAMA, S.N., RODRIGUES, R.P., VOLLMER, R.S., ALVES, E.N., AND PAUMGARTTEN, F.J.R., 1996. Study of the embryofetotoxicity of  $\alpha$ -terpineno in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, **34**: 477-482.

BARONCELLI, S. KARRER, D. AND TURILLAZZI, P.G., 1990. Embryotoxic evaluation of bis (tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in mice. *Toxicology Letters* **50**:257-262.

BARONCELLI, S. KARRER, D. AND TURILLAZZI, P.G., 1995. Oral bis(tri-n-butyltin) oxide in pregnant mice. I. Potential influence of maternal behavior on postnatal mortality. *J. Toxicol. Environ. Health* **46**(3):355-367.

BOYER, I. J., 1988. Toxicity of dibutyltin, tributyltin, and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, **55**: 253-298.

CARDARELLI, N. F., 1977. Controlled Release Molluscicides, University of Akron, Akron, Ohio. *Monograph*.

CARLTON, B. J. AND HOWARD, M., 1982. The evaluation of the teratogenicity of triphenyltin hydroxide (TPTH) in the Syrian hamster. Unpublished report 723-0100 (A22884) of Batelle Columbus Laboratories, Columbus, OH. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

CHAHOUD, I., LIGENSA, A., DIETZEL, L. AND FAQI, A.S., 1999. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. *Reproductive Toxicology* **13**:375-381.

CHAHOUD, I., AND KWASIGROCH, T. E., 1977. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, H. J. AND KWASIGROCH, T. E. (Editors), *Methods in Prenatal Toxicology*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 78-91.

CHAMP, M. A., 1999. The need for the formation of an independent, international marine coatings board. *Marine Pollution Bulletin*, **38**: 239-246.

CHERNOFF, N., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND MATTSHECK, C.L., 1988. Developmental effects of maternal stress in the CD-1 mouse by restraint on single days during the period of major organogenesis. *Toxicology*, **51**: 57-65.

CHERNOFF, N., ROGERS, J.M., AND KAVLOCK, R.J., 1989. An overview of maternal and prenatal development: considerations for developmental toxicity hazard assessments. *Toxicology*, **59**: 111-125.

CHERNOFF, N., SETZER, R. W., MILLER, D.B., ROSEN, M.B. AND ROGERS, J.M., 1990. Effects of chemically induced maternal toxicity on prenatal development in the rat. *Teratology*, **42**: 651-658.

CROFTON, K. M., DEAN, K. F., BONCEK, V.M., ROSEN, M.B., SHEETS, L.P., CHERNOFF, N. AND REITER, L.W., 1989. Prenatal or Postnatal Exposure to Bis (tri-*n*-butyl tin) oxide in the Rat: Postnatal Evaluation of Teratology and Behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **97**: 113-123.

DAVIS, A., BARALE, R., BRUN, G., FORSTER, R., GUNTHER, T., HAUTEFEUILLE, H., HEIJDEN, C.A., KNAAP, A.G.A.C., KROWKE, R., KUROKI, T., LOPRIENO, N., MALAVEILLE, C., MERKER, H.J., MONACO, M., MOSESSO, P., NEUBERT, D., NORPPA, H., SORSA, M., VOGEL, E., VOOGD, C.E., UMEDA, M. AND BARTSCH, H., 1987. Evaluation of the genetic and embryotoxic effects of bis(tri-*n*-butyltin) oxide (TBTO), a broad-spectrum pesticide, in multiple in vivo and in vitro short-term tests. *Mutation Research*, **188**: 65-95.

DAWSON, A. B. 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technology*, **1**: 123 – 124.

DELGADO, I.F., BAGGIO C. AND PAUMGARTTEN F. J.R., 1998. Exposição ocupacional de agricultores no município de Paty-de-Alferes - R.J.: In Uso de pesticidas, equipamentos de proteção individual e morbidade referida. Anais do III

Workshop de Agricultura Sustentável em Regiões Tropicais de Relevô Acidentado. Boletim de Pesquisa 9 da EMBRAPA CNPS. Em CD ROM.

DELGADO, I.F., DE-CARVALHO, R.R., NOGUEIRA, A.C.M.A., MATTOS, A.P. FIGUEIREDO, L.H., OLIVEIRA, S.H.P., CHAHOUD, I. AND PAUMGARTTEN, F.J.R., 1993. Study on embryo-foetotoxicity of  $\beta$ -myrceno in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, **31**: 31-35.

DOCTOR, S. V., SULTATOS, L. G. AND MURPHY, S. D., 1983. Distribution of trimethyltin in various tissues of the male mouse. *Toxicology Letters*, **17**: 43-48.

DUNCAN, J.,1980. The toxicology of molluscicidas: The organotins. *Pharmacol. Ther.*, **10**:407.

EMA, M., ITAMI, T. AND KAWASAKI, H., 1991. Teratogenicity of di-n-butyltin dichloride in rats. *Toxicology Letters*, **58**: 347-356.

EMA, M., KUROSAKA, R., AMANO, H. AND OGAWA, Y., 1995. Further evaluation of the development toxicity of tributyltin chloride in rats. *Toxicology*, **96**: 195-201.

EMA, M., MIYAWAKI, E. AND KAWASHIMA, K., 1999a. Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. *Arch. Toxicology*, **73**: 175-179.

EMA, M., MIYAWAKI, E. AND KAWASHIMA, K., 1999b. Development Toxicity of Triphenyltin Chloride after administration on three consecutive days during organogenesis in rats. *Bull. Environmental Contam. Toxicology*, **62**: 363-370.

EMA, M., MIYAWAKI, E., HARAZONO, A. AND OGAWA, Y. 1997. Effects of triphenyltin chloride on implantation and pregnancy in rats. *Reproductive Toxicology*, **11**: 201-206.

FAIT, A., FERIOLI, A. AND BARBIERI, F., 1994. Organotin compounds. *Toxicology*, **91**: 77-82.

FAO (1991) Pesticide residues in food, 1991. Evaluations, Part I - Residues. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 337-371 (FAO Plant Production and Protection and Protection Paper 113/1).

FAQI, A. S., SCHWEINFURTH, H., AND CHAHOUD, I., 1997. Determination of the no-effect dose of bis(tri-n-butyl tin) oxide (TBTO) for maternal toxicity and teratogenicity in mice. *Cong. Anom.*, **37**: 251-258.

FENT, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicology*, **26**: 1-117.

FERNANDEZ, M. A., LIMAVERDE, A. M., CASTRO, I. B., ALMEIDA, A. C. M. AND WAGENER, A. L. R., 2002. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, **18(2)**: 463-476.

FORGET, G. 1989. Pesticides: necessary but dangerous poisons. *Internationals Development Research Center Report*, **18**: 4-5.

GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTERS. Edit by Terri Damstra, Sue Barlow, Aake Bergman, Robert Kavlock and Glen Van Der Kraak. WHO/IPCS/EDC/02.2.

GUARD, H. E., COBET, A. B. AND COLEMAN, W. M., 1981. Methylation of trimethyltin compounds by statuaries sediments. *Science*, **213**: 770-771.

HARAZONO, A., EMA, M. AND KAWASHIMA, K., 1998. Evaluation of malnutrition as a cause of tributyltin-induced pregnancy failure in rats. *Bull. Environmental Contam. Toxicology*, **61**: 224-230.

ITAMI, T., EMA, M., AMANO, H., MURAI, T. AND KAWASAKI, H., 1990. Teratogenic evaluation of tributyltin chloride in rats following oral exposure. *Drug Chem. Toxicol.*, **13**: 283-295.

IWAI, H., WADA, O. AND ARAKAWA, Y. 1981. Determination of tri-, di-, and monobutyltin and inorganic tin in biological materials and some aspects of their metabolism in rats. *J. Anal. Toxicol.*, **5**: 300-306.

KHERA, K.S., 1984. Maternal toxicity – a possible factor in fetal malformations in mice. *Teratology*, **29**: 411-416.

KHERA, K.S., 1985. Maternal toxicity: a possible etiologic factor in embryo fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. *Teratology*, **31**: 129-136.

KIMMEL E.C., FISH R.H. AND CASIDA J.E. 1977. Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase system and in mammals. *J. Agric. Food Chem.* **25**:1-9.

KROWKE, R., BLUTH, U. AND NEUBERT, D., 1986. In vitro studies on embryotoxic potential of bis(tri-*n*-butyltin) oxide in a limb bud organ culture. *Arch. Toxicol.* **58**: 125-129.

MANSON, J. M. AND KANG, Y. J., 1994. Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Hayes, A. W. *Principles and Methods of Toxicology*. 3 ed., New York, Raven Press, Ltd., p 989-1037.

MURRAY, F.J., JOHN, J.A., BALMER, M.F. AND SCHWETZ, B.A., 1978. Teratogenic evaluation of styrene gives to rats and rabbits by inhalation or by gavage. *Toxicology* **11**:335-243.

NODA T., MORITA S., YAMANO T. AND SHIMIZU M., 1991a. Effects of triphenyltin acetate on pregnancy in rats by oral administration. *Toxicology Letters* **56**:207-212.

NODA, T., MORITA, S., YAMANO, T., SHIMIZU, M., KAKAMURA, T., SAITOH, M. AND YAMADA, A. 1991b. Teratogenic study of tri-*n*-butyltin acetate in rats by oral administration. *Toxicology Letters*, **55**: 109-115.

O'RAHILLY, R. The history of human embryology and teratology. *In: Human embryology and teratology* . Editado por Ronan O'Rahilly and Fabiola Muller, p 3-4, 1992a.

O'RAHILLY, R. Teratology. *In: Human embryology and teratology* . Editado por Ronan O'Rahilly and Fabiola Muller, p 69-78, 1992b.

OMURA, M., OGATA, R., KUBO, K., SHIMASAKI, Y., AOU, S., OSHIMA, Y., TANAKA, A., HIRATA, M., MAKITA, Y. AND INOUE, N., 2001. Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in male rats. *Toxicol Sci*, **64(2)**: 224-232.

RIECKE, K AND STAHLMANN, R., 2000. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia*, **32**: 209-218.

RODWELL, D. E., 1985. A teratology study in rats with triphenyltin hydroxide (Code 029664 OF ZD97 0001 technical substance). Unpublished report WIL- 39011 (A31079) of WIL Research Laboratories Inc., Ashland. Submitten to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

RODWELL, D. E., 1987. An embryotoxicity study in rabbits with triphenyltin hidroxide (Code: HOE 209664 OF ZD97 0004). Unpublished report WIL- 39012 (A35220) of WIL Research Laboratories Inc., Ashland. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].

ROGERS, J.M. AND KAVLOCK, R.J. Developmental Toxicology. *In: CASARETT and DOULL'S. Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York, St. Louis, San Francisco, McGraw-Hill, Inc., 6° ed, Editado por Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J., p.351-381, 2001

ROGERS, J.M. AND KAVLOCK, R.J. Developmental Toxicology. *In: CASARETT and DOULL'S. Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York, St. Louis, San Francisco, McGraw-Hill, Inc., 5° ed, Editado por Klaassen, C.D., Amdur, M.O. & Doull, J., p.301-331, 1996

SALEWSKI, E., 1964. Faerbemethoden zum Makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* p. 247, 367.

SASAKI, Y. F., YAMADA, H., SUGIYAMA, C. AND KINAE, N., 1993. Increasing effect of tri-*n*-butyl tins and triphenyltins on the frequency of chemically induced chromosome aberrations in the cultured Chinese hamster cells. *Mutation research*, **300**: 5-14.

SAXENA A., KOACHER J.K. AND TANDON J.P.,1985. Testicular changes in rats after administration of organotin complex. *J Toxicol Environ Health* **15**(3-4):503-7

SNOW, R. L. AND HAYS, R. L., 1983. Phasic distribution of seminiferous tubules in rats treated with triphenyltin compounds. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 658-665.

STERZ, H. 1977. Routine examination of rat and rabbit fetuses for malformations of internal organs: combination of Barrow's and Wilson's methods. In *Methods in Prenatal Toxicology*. Edited by D. Neubert, H.J. Mercker and T. E. Kwasigroch. pp. 113 – 122. Georg Thieme Publishers, Stuttgart.

TAUSSIG, H.B., 1962. A study of the German outbreak of phocomelia: The thalidomide syndrome. *J.A.M.A.* **180** (13): 1106-1114.

U.S. Department of Health and Human Services – Food and Drug (FDA), 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) - Guidance for Industry. April. <http://www.fda.com/>.

VIANA V., 2002. Investigação de possíveis danos funcionais causados pela exposição pré-natal ao Trifenil Hidróxido de Estanho (TPTH). *Dissertação de Mestrado*.

WARKANY, J., 1983. Teratology. *Issues Ver. Teratol.*, **1**: 19-31.

WHO (1980) Tin and organotin compounds: A preliminary review. *Environmental Health Criteria* **15**, Geneva pp. 79-83.

WHO (1992). Pesticide Residues in food, 1991. Evaluations 1991 Part II - Toxicology. Geneva, World Health Organization, pp. 173-208.

WHO (1999). Concise International Chemical Assessment Document 13, 1999. Triphenyltin Compounds. World Health Organization. Geneva.

YAMADA, H. AND SASAKI, Y. F., (1993). Organotins are co-clastogens in a whole mammalian system. *Mutation Research*, **301**: 195-200.

YONEMOTO, J., SHIRAISHI, H. AND SOMA, Y., 1993. In vitro assessment of teratogenic potential of organotin compounds using rat embryo limb bud cell culture. *Toxicol. Lett.* **66**: 183-191.

YOUNG, D. L., 1986. A dietary two-generation reproduction study in rats with triphenyltin hydroxide (Code: HOE 0.29664 OF ZD97 0004 technical substance). Final report project WII-39022 (A35378) of WIL Research Laboratories, Inc., Ashland. Submitted to WHO by Hoechst AG, Frankfurt-am-Main [WHO, 1992].