



PARECER TÉCNICO DE REAVALIAÇÃO Nº 06, de 2015/GGTOX/ANVISA

Reavalia o ingrediente ativo Lactofem com relação aos aspectos de mutagenicidade, carcinogenicidade e efeitos reprodutivos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APVMA - *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários)

CPRC - *Cancer Peer Review Committee* (Comitê de Revisão por Pares em Câncer)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EDSP - *Endocrine Disruptor Screening Program* (Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos)

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)

FAMIC - *Food and Agricultural Materials Inspection Center* (Centro de Inspeções de Alimentos e Materiais Agrícolas)

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GGTOX - Gerência Geral de Toxicologia

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICAMA - *Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, China* (Instituto para o Controle de Agroquímicos, Ministério da Agricultura, China)

ILSI - *International Life Sciences Institute* (Instituto Internacional de Ciências da Vida)

LMR - Limite Máximo de Resíduo

LOD - *Limit of Detection* (Limite de Detecção)

LOAEL - *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível Mais Baixo de Efeito Adverso Observado)

LOEL - *Lowest Observed Effect Level* (Nível Mais Baixo de Efeito Observado)

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MOA - *Mode of Action* (Modo de Ação)



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Superintendência de Toxicologia
Gerência Geral de Toxicologia

NOAEL - *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso Não Observado)

NOEL - *No Observed Effect Level* (Nível de Efeito Não Observado)

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNCRC - Programa Nacional de Controle de Resíduos de Contaminantes

PPAR - *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* (Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomos)

PPM - Parte por Milhão

PPRE - *Peroxisome Proliferator Response Elements* (Elementos Responsivos a Proliferador de Peroxissomos)

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

RSI - *Risk Science Institute* (Instituto de Ciência do Risco)

RXR - *Retinoid X Receptor* (Receptor Retinoide X)

SENASA - *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* (Serviço Nacional de Sanidade e Qualidade Agroalimentária)

U.S. EPA - *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)



1 – RELATÓRIO

Este parecer visa reavaliar o ingrediente ativo Lactofem, referente ao processo nº 25351.057455/2013-10, particularmente quanto aos aspectos de mutagenicidade, carcinogenicidade e efeitos reprodutivos. Os argumentos presentes neste parecer permitirão concluir quais aspectos são relevantes do ponto de vista regulatório.

A reavaliação toxicológica do lactofem foi determinada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 22 de fevereiro de 2008, devido à existência de estudos realizados com esse ingrediente ativo que o classificam como carcinogênico para humanos.

A RDC nº 48, de 7 de julho de 2008, que dispõe sobre os procedimentos administrativos para a reavaliação toxicológica, determina que a análise de dados aportados pelos registrantes, assim como de estudos científicos publicados, deve ser efetuada pela Gerência Geral de Toxicologia (GGTOX) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), conjuntamente com instituição reconhecida técnica e cientificamente na área de toxicologia que não apresente conflito de interesse com o tema agrotóxico.

Dessa forma, em 31 de dezembro de 2007, foi firmado um contrato entre a Anvisa e a Fiocruz, a fim de que a Fiocruz elaborasse uma nota técnica abordando os aspectos toxicológicos relevantes do ingrediente ativo lactofem.

Em 28 de janeiro de 2013, a Fiocruz encaminhou à Anvisa a nota técnica de reavaliação toxicológica do lactofem, por meio do ofício nº 11/2013 - FIOCRUZ/VPAAPS.

A Anvisa, ainda de acordo com o determinado pela RDC nº 48 de 2008, deveria revisar a nota técnica elaborada pela Fiocruz, a fim de submetê-la a Consulta Pública com os possíveis encaminhamentos para o ingrediente ativo. Essa revisão, no entanto, não foi realizada até junho de 2015, devido à priorização de reavaliação de outros ingredientes ativos (forato, procloraz, parationa metílica, 2,4-D e paraquate).

Em 22 de junho de 2015, a Ação Civil Pública nº 21371-49.2014.4.01.3400 – 7ª Vara Federal/DF determinou que a reavaliação do ingrediente ativo lactofem fosse concluída em 90 dias.

A fim de cumprir essa determinação judicial, a GGTOX criou uma força-tarefa, em que foram alocados mais servidores na atividade de reavaliação. Por meio dos despachos nº 16/2015-CPREQ/GGTOX, de 08/07/2015, e nº 003/2015- CPNBR/GGTOX, de 13/07/2015, foi criado o grupo de trabalho para a avaliação da nota técnica do lactofem. Foi determinado que os servidores elaborassem um parecer dentro do prazo de 90 dias.



Dessa forma, foi elaborado este parecer, em que se avaliam os dados toxicológicos e o embasamento legal apresentados na nota técnica da Fiocruz e a conclusão sobre os efeitos toxicológicos do lactofem.

Neste parecer foi dado enfoque ao potencial carcinogênico do lactofem, visto que, de acordo com a Fiocruz, esse seria o aspecto toxicológico mais relevante desse ingrediente ativo. Na revisão da literatura, foram avaliadas principalmente revisões mais recentes sobre o tema.

1.1. Aspectos legais da reavaliação de agrotóxicos:

O registro de agrotóxicos no Brasil é regulamentado pela Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. No §6º do Art. 3º dessa Lei determina-se a proibição do registro de agrotóxicos, seus componentes e afins:

- a) *para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem risco ao meio ambiente e à saúde pública;*
- b) *para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;*
- c) *que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;*
- d) *que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;*
- e) *que se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;*
- f) *cujas características causem danos ao meio ambiente.*



A reavaliação de agrotóxicos está prevista no Art.13 do Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que determina:

Os agrotóxicos, seus componentes e afins que apresentarem indícios de redução de sua eficiência agronômica, alteração dos riscos à saúde humana ou ao meio ambiente poderão ser reavaliados a qualquer tempo e ter seus registros mantidos, alterados, suspensos ou cancelados.

A Portaria do Ministério da Saúde nº 03, de 16 de janeiro de 1992, regulamenta como devem ser realizadas as avaliações toxicológicas de produtos agrotóxicos no país e, por isso, também é essencial na reavaliação toxicológica. Ela determina que a avaliação toxicológica deve detectar possíveis efeitos graves para a saúde que possam impedir o registro e a utilização de um determinado agrotóxico. Portanto, no processo de reavaliação de um agrotóxico, após a análise de todos os dados e estudos, deve-se avaliar o peso das evidências obtidas, a relevância para os seres humanos e se os efeitos se enquadram nas características legais proibitivas de registro.

Conforme o Art. 31 do Decreto 4.074, de 2002, e item 1.3 da Portaria nº 03, de 1992, são características proibitivas de registro para agrotóxicos, seus componentes e afins:

- Ausência de métodos para a desativação dos componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos à saúde pública (Inciso I, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002).
- Ausência de antídoto ou tratamento eficaz (Inciso II, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002).
- Evidências científicas, baseadas em dados validados, de teratogênese na espécie humana ou em estudos com pelo menos duas espécies de animais de experimentação, que devem incluir uma dose suficientemente alta para produzir toxicidade materna e uma dose baixa, sem efeito para o adulto ou para a ninhada (Inciso III, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002, e item 1.3.4 da Portaria nº 03, de 1992).
- Evidências científicas de carcinogenicidade para o homem, baseadas em estudos epidemiológicos validados, efetuados com o rigor científico da OMS, em órgãos Regionais e seus Centros especializados; ou evidências científicas de carcinogenicidade, baseadas em dados validados, para pelo menos duas espécies de animais de



- experimentação com incidência aumentada de tumores malignos: a) em determinado local do corpo ou órgão, com tumores do mesmo tipo; b) em diversas provas, de preferência com diferentes vias de administração e com diversas doses; ou c) em grau não usual com referência à incidência, sítio, tipo de tumor ou idade de início, sendo que a evidência é reforçada quando há relação direta entre o número de animais positivos para tumores e o aumento das doses (Inciso IV, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002, e item 1.3.2 da Portaria nº 03, de 1992).
- Evidências científicas de mutagenicidade baseadas em dados validados, com indução de mutações em, no mínimo, dois testes, um deles para detectar mutações gênicas (realizado com e sem ativação metabólica e com um controle positivo) e o outro para detectar mutações cromossômicas (Inciso V, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002, e item 1.3.3 da Portaria nº 03, de 1992).
 - Evidências científicas de desregulação endócrina, não existindo dose relevante sem efeito adverso nos experimentos com animais de experimentação ou no homem. As alterações devem ocorrer em todas as doses relevantes testadas e o efeito não deve ser reversível com a interrupção da administração da substância (Inciso VI, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002, e item 1.3.5 da Portaria nº 03, de 1992).
 - Evidências de danos relevantes ao aparelho reprodutor (Inciso VI, do Art. 31, do Decreto nº 4.074, de 2002).
 - Evidências de que o ingrediente ativo é mais perigoso para o homem do que o demonstrado em testes de laboratório com animais (Inciso VII, do Art. 31 do Decreto nº 4.074, de 2002).

Mesmo que o ingrediente ativo não se enquadre nas características proibitivas, após as análises, pode-se concluir pela necessidade de alterações no registro, como exclusão de algum tipo de aplicação, revisão da Ingestão Diária Aceitável (IDA), exclusão de culturas e alteração do intervalo de segurança, dentre outras medidas.

Assim, conforme o estipulado pelo Art. 19 do Decreto nº 4.074, de 2002, e a partir da avaliação de todos os aspectos toxicológicos relevantes na reavaliação, pode-se concluir pela manutenção do registro do ingrediente ativo sem alterações; pela alteração da formulação, da dose ou do método de aplicação; pela restrição da produção, da importação, da comercialização ou do uso; pela proibição ou suspensão da produção, importação ou uso; ou pelo cancelamento do registro.



1.2. Situação nacional dos produtos à base de lactofem:

O lactofem - ethyl O-[5-(2-chloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyloxy)-2-nitrobenzoyl]-DL-lactate, nº CAS 77501-63-4 - é um ingrediente ativo pertencente ao grupo químico éter difenílico, que possui uso autorizado no Brasil há mais de 30 anos, exclusivamente agrícola para a cultura de soja, em pós-emergência, conforme consta em sua monografia técnica (ANVISA, 2003). Outros ingredientes ativos pertencentes a esse mesmo grupo químico, também de usos autorizados no país, são acifluorfem, aclonifem, fomesafem e oxifluorfem. Os membros deste grupo químico são herbicidas de contato (ação não sistêmica) que atuam como inibidores da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox ou PPO), causando estresse oxidativo em presença de luz, provocando necrose e morte dos tecidos foliares atingidos das ervas daninhas (CATANEO et. al., 2005; NICOLAI, 2015).

A relação de empresas registrantes e de seus respectivos produtos técnicos e formulados registrados à base de lactofem no Brasil, incluindo as suas classes toxicológicas, está apresentada no Quadro 01. Todos os produtos formulados registrados são produzidos com a concentração de 240 g/L de lactofem (BRASIL, 2015b).

De acordo com o último Relatório de Comercialização de Agrotóxicos disponibilizado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o total de vendas desse ingrediente ativo no país, considerando os produtos formulados, foi de 149,77 t em 2013 (IBAMA, 2015). As quantidades comercializadas haviam sido de cerca de 170 t em 2012, 261 t em 2011 e 304 t em 2010, sugerindo haver uma tendência de queda gradual na venda/uso de lactofem, o que pode estar relacionado ao aumento relativo das áreas de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato, que prescinde da aplicação de outros herbicidas nas diversas fases do plantio, incluindo o lactofem. Assim, é possível afirmar que o lactofem encontra no Brasil um nicho de mercado (soja não geneticamente modificada), sendo utilizado em lavouras de soja convencionais, que ocupam atualmente cerca de 10% das áreas de plantio de soja no país (NICOLAI, 2015).

Quanto aos resíduos de lactofem em alimentos no Brasil, o mesmo não faz parte do rol de ingredientes ativos analisados pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos da Anvisa (PARA), considerando-se tratar-se de herbicida autorizado somente para a cultura de soja, que ainda não faz parte do Programa. Todavia, o lactofem está listado entre os agrotóxicos analisados no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes de Origem Vegetal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (PNCRC/Vegetal), para a cultura de soja. Os resultados da última análise efetuada (safra 2014-2015) indicaram 100% de conformidades quanto aos resíduos de



agrotóxicos, incluindo lactofem, nas 24 amostras de soja analisadas no âmbito do PNCRC (BRASIL, 2014; BRASIL, 2015a).

Quadro 01 - Empresas registrantes de lactofem e seus respectivos produtos técnicos (PT), produtos formulados (PF) e classes toxicológicas no Brasil. (BRASIL, 2015b)

EMPRESA	PT	CLASSE TOXICOLÓGICA	PF (240 g/L)	CLASSE TOXICOLÓGICA
Adama Brasil S/A	Lactofem			
	Técnico Mil	III		
	Lactofem	III	Naja	II
Bayer S/A	Técnico Milenia			
	Lactofem			
Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S/A	Técnico	III	Cobra	I
	Lactofem		Drible	I
UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A.	Técnico Agripec	II	Lactofem AGP 240 EC	I
	-	-	Coral	I

1.3. Situação internacional do ingrediente ativo lactofem:

Estados Unidos da América (EUA)

O lactofem possui registro nos EUA desde 1987, com uso autorizado para as culturas de algodão, amendoim, berinjela (alguns estados), coníferas (mudas), feijão-vagem (alguns estados), físalis (alguns estados), kenaf, melão-andino (alguns estados), pimenta (alguns estados), pimentão (alguns estados), quiabo (alguns estados), soja, tomate (alguns estados) e tomatillo (alguns estados) (Global MRL Database, 2015; U.S. EPA, 2014a). Esse ingrediente ativo encontra-se também em reavaliação naquele país pela Agência Americana de Proteção Ambiental - *United States Environmental Protection Agency* (U.S. EPA), em fase final de consolidação das contribuições recebidas em sua Consulta Pública (U.S. EPA, 2014a). A U.S. EPA informa, em seu documento final interino de reavaliação, que foi conduzida avaliação de risco ocupacional e não foi identificado nenhum risco ou preocupação à saúde, quanto aos usos autorizados de lactofem. A Agência norte-americana também conduziu avaliação do risco agregado e cumulativo dietético, tanto agudo como crônico, considerando os resíduos de lactofem via consumo de alimentos e água, bem como a presença residual de seu metabólito acifluorfem. Os resultados indicaram larga margem de segurança quanto ao risco dietético a este



agrotóxico, incluindo crianças e bebês com menos de um ano de idade (U.S. EPA, 2014a). As pendências ainda existentes são relativas ao risco ambiental a espécies ameaçadas, incluindo o potencial de desregulação endócrina às mesmas. Não há uso residencial autorizado de lactofem nos EUA (U.S. EPA, 2014a).

União Europeia (UE)

Na UE, o lactofem foi excluído em 2007 do então Anexo I da Diretiva 91/414/EEC (revogada pelo Reg EC 1107/09), que lista as substâncias ativas permitidas para uso em produtos biocidas no continente. Essa exclusão pode ter sido motivada pela falta de interesse e/ou submissão de dossiê incompleto por parte das empresas para a manutenção do ingrediente ativo no referido Anexo. Contudo, deve-se esclarecer que a real motivação não foi declarada no documento (EC, 2007).

Cabe mencionar que a Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos - *European Food Safety Authority* (EFSA) estava em fase final de condução da avaliação de risco dietético do lactofem, quando foi informada pela Comissão Europeia (CE), em novembro de 2006, de que não seria necessário continuar o processo, pois o lactofem seria retirado do Anexo I (EFSA, 2007). A CE informou ainda que todos os limites máximos de resíduos (LMRs) deveriam ser definidos com os valores do limite de detecção (LOD) do método (EC, 2007).

Uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0,0015 mg/kg p.c. já havia sido estabelecida pela EFSA para esse ingrediente ativo. A EFSA não identificou risco ao consumidor pela ingestão dietética de lactofem, ao confrontar a estimativa de exposição, com base nos LMRs já estabelecidos para as culturas autorizadas, com o valor da IDA (EFSA, 2007).

Outros países

Não há menção ao registro/uso de lactofem na Austrália, nem no Canadá, indicando que o mesmo não é utilizado nesses países (APVMA, 2014; Health Canada, 2015). O lactofem também não consta na listagem de ingredientes ativos autorizados no Japão, portanto não tem uso autorizado no país (FAMIC, 2015). Na base de dados de produtos autorizados na China por sua autoridade regulatória de agroquímicos constam diversos produtos contendo lactofem, sozinho ou em combinação com outros ingredientes ativos, em variadas concentrações (ICAMA, 2015). Semelhante busca foi feita na base de dados de produtos fitossanitários autorizados na Argentina, indicando autorização de uso do lactofem para amendoim e soja (SENASA 2015).



2 - ANÁLISE

A Fiocruz, nas conclusões e recomendações de sua nota técnica, considerou que o lactofem induz a formação de tumores malignos no fígado de animais de laboratório por mecanismos epigenéticos. Afirmou que a literatura aponta como modo de ação para carcinogenicidade do lactofem a proliferação de peroxissomos. Informou que há estudos que demonstram que, diferentemente do que ocorre em ratos e camundongos, os proliferadores de peroxissomos podem não exibir efeitos tão significativos em humanos. No entanto, também informou que há estudos que demonstram efeitos tão eficazes em humanos quanto em camundongos. Alegou que existem estudos epidemiológicos com proliferadores de peroxissomos apenas no campo da farmacologia, em que medicamentos seriam testados em baixas doses, diferentemente das situações de exposição a agrotóxicos, que ocorrem em doses muito elevadas. Pelo menos um estudo epidemiológico com pacientes tratados com medicamento de ação proliferadora de peroxissomos teria mostrado aumento de morte por câncer nos indivíduos tratados. Declarou ainda, que a U.S. EPA classificou o lactofem como improvável de ser carcinogênico para humanos em 2007, considerando que esse efeito acontece em altas doses de exposição, e não em baixas doses, e que o documento da U.S. EPA ratificaria que o modo de ação em roedores é plausível para humanos, pois existe o receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR α) em humanos. Norteada, portanto, pelo Princípio da Precaução, a Fiocruz recomendou o banimento do lactofem no Brasil.

Apesar das motivações apresentadas pela Fiocruz, percebe-se que essa tomada de decisão não levou em consideração aspectos e dados relevantes e atualizados sobre o tema.

Na nota técnica elaborada, por exemplo, importantes artigos científicos que discutem o modo de ação dos proliferados de peroxissomos para carcinogenicidade não foram mencionados.

A informação de que, em estudos epidemiológicos com medicamentos, estes seriam testados em baixas doses, diferentemente das situações de exposição a agrotóxicos, que ocorrem em doses muito elevadas, é contestável. A exposição a um medicamento, diretamente por via oral, ainda mais sendo o medicamento de uso contínuo, é consideravelmente maior que a exposição ocupacional a um agrotóxico.

Não foram levadas em consideração as limitações dos estudos epidemiológicos existentes. Os estudos existentes geralmente não reportam a incidência de câncer de fígado como um *endpoint* separado. A incidência de câncer é reportada ou como total de mortes por câncer, ou total de mortes por câncer no fígado, vesícula e intestino



combinados. As evidências epidemiológicas acerca da carcinogenicidade dos proliferadores de peroxissomos são na realidade inconclusivas, sendo necessária a comparação de diversos outros efeitos biológicos entre as espécies para a tomada de decisão acerca da relevância do potencial carcinogênico dessas substâncias químicas para humanos. Conforme será discutido nos próximos tópicos deste parecer, ao comparar diferentes aspectos toxicodinâmicos entre as espécies, percebe-se que o desfecho carcinogênico não é provável de ocorrer em humanos.

A informação de que a U.S. EPA ratifica que o modo de ação em roedores é plausível para humanos não é totalmente adequada, visto que a U.S. EPA na realidade afirma que o modo de ação seria qualitativamente plausível para humanos, mas quantitativamente implausível e improvável de acontecer em humanos com base nas diferenças toxicodinâmicas quantitativas entre espécies na ativação do PPAR α . Acrescenta-se que a quantificação do risco, inclusive, não foi vista como necessária pela U.S. EPA.

Dessa forma, considerando que alguns argumentos apresentados na nota técnica da Fiocruz aparentam fragilidade e podem não ser tecnicamente sustentados, foi necessário um aprofundamento da análise para que a decisão acerca da reavaliação do lactofem fosse adequadamente embasada.

Além disso, julgou-se necessária uma avaliação complementar da toxicidade reprodutiva do lactofem, à luz do conhecimento técnico atual, uma vez que a nota técnica da Fiocruz não aprofundou suas discussões sobre esse tema, não tecendo conclusões ou recomendações acerca desse assunto.

Portanto, descrevem-se a seguir complementações consideradas importantes e que não haviam sido abordadas.

2.1. Estudos de toxicidade genética (genotoxicidade e mutagenicidade):

A toxicologia genética é o estudo de substâncias que podem causar dano ao ácido desoxirribonucleico - *deoxyribonucleic acid* (DNA) e aos cromossomos das células. Esse dano é usualmente medido como mutações, aberrações cromossômicas, rupturas dos filamentos de DNA, adutos de DNA ou interferências com o sistema de reparo. Sistemas de teste *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para estudar os efeitos de produtos químicos e de radiações no DNA celular e nos cromossomos. Os testes *in vitro* mais comumente usados para a triagem de rotina são sistemas de mutação gênica em bactérias e sistemas de danos cromossômicos em células de roedores cultivadas. *In vivo*, o dano cromossômico é tipicamente medido em células da medula óssea de camundongos ou ratos (ZEIGER, 2001).



O potencial genotóxico é um fator de risco primário para efeitos de longo prazo, tais como carcinogênese e toxicologia reprodutiva (BOLOGNESI, 2003). Assim, testes de varredura têm sido rotineiramente executados com diversos produtos químicos para avaliar a indução de mutações gênicas e danos cromossômicos (ZEIGER, 2001).

Conforme pode ser visualizado no Quadro 02, várias técnicas foram empregadas na investigação do potencial mutagênico do ingrediente ativo lactofem, a partir da análise de três produtos técnicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os métodos empregados envolveram desde sistemas de teste *in vitro*, como também sistemas *in vivo*. Os resultados dos estudos apontam que o lactofem técnico não induz mutação gênica ou aberrações cromossômicas, não altera a síntese de DNA não programada, nem inibe o reparo do DNA. Ainda, um estudo mostrou que o ingrediente ativo tem um baixo índice de ligação covalente ao DNA de hepatócitos de ratos, comparável àqueles relatados para substâncias químicas com fraca genotoxicidade ou não genotóxicas.

Nota-se, ainda, que alguns estudos apresentam limitações em seus achados. Essas limitações foram ocasionadas, por exemplo, pela exclusão do *guideline* utilizado da lista dos protocolos vigentes indicados pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento - (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development* - OECD); pela condução inadequada do estudo; ou pela interpretação equivocada dos seus resultados. Um estudo de frequência de micronúcleo, à luz do conhecimento vigente, foi considerado insatisfatório quanto à investigação do *endpoint* de mutagenicidade, uma vez que não apresentou valores aceitáveis na proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) pelo número de eritrócitos totais, ou seja, eritrócitos normocromáticos (NCE) somados aos PCE, o que leva a considerá-lo metodologicamente inadequado.

Comparando os achados encontrados nesta revisão (Quadro 02) com a nota técnica elaborada pela Fiocruz, percebe-se que esta última limitou-se a apresentar os estudos aportados no dossiê do produto Lactofem Técnico da empresa Bayer S/A. Desse modo, reportou apenas o resultado da avaliação de quatro estudos, todos eles negativos, sendo estes: teste de Ames, ensaio de mutação reversa em células de mamífero, ensaio de reparo de DNA e teste de micronúcleo. É importante ressaltar que esse cenário não reflete a situação nacional de registro de produtos técnicos com o ingrediente ativo lactofem. Nesta agência, há três dossiês que tratam do ingrediente ativo, sendo estes: Lactofem Técnico, Lactofem Técnico Milenia e Lactofem Técnico Agripec. Todos os dossiês foram devidamente analisados neste parecer.

No cenário internacional, em consonância com os resultados da análise dos dossiês aportados na Anvisa, o banco de dados de mutagenicidade para o lactofem da U.S. EPA sugere que essa substância tem muito pouca atividade mutagênica ou



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Superintendência de Toxicologia
Gerência Geral de Toxicologia

genotóxica. Ao passo que uma resposta mutagênica positiva foi relatada em um ensaio de mutagenicidade de *Salmonella typhimurium*, essa resposta não foi confirmada em um segundo ensaio realizado. Além disso, a U.S. EPA considera ainda que o lactofem não parece induzir aberrações cromossômicas, síntese não programada de DNA ou inibir o reparo do DNA (U.S. EPA, 2000a).

Por conseguinte, diante dos fatos, todos os achados reforçam que o lactofem não é mutagênico ou genotóxico.



Quadro 02. Análise dos estudos de genotoxicidade e mutagenicidade dos dossiês dos produtos técnicos do ingrediente ativo lactofem

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE								
Produto (Processo)	Ensaio	Pureza	Tempo de observação/exposição dos animais/células.	Delineamento	Efeitos tóxicos	Resultado	Limitações do ensaio	Referência
LACTOFEM TÉCNICO - BAYER (25000.013372/97-79)	Genotoxicity Studies with Lactofem Technical: The Induction of Gene Mutations in the Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> XV 185-14C.	609 g/kg	–	<p>Teste preliminar: 100; 50; 25; 12,5; e 6,25 µg/mL</p> <p>Teste definitivo: - Fase estacionária: 100; 75; 50; 25; e 12,5 µg/mL. - Fase exponencial: 50; 37,5; 25; 12,5; e 6,25 µg/mL.</p> <p>Todos os ensaios foram conduzidos na presença e ausência do sistema de ativação metabólica (S9).</p>	No ensaio preliminar, Lactofem Técnico mostrou uma resposta tóxica nas concentrações acima de 50 µg/mL nas células investigadas na fase exponencial. Na fase estacionária, não foi encontrada resposta tóxica nas concentrações acima de 100 µg/mL.	Não mutagênico. Lactofem Técnico não induziu aumento na mutação gênica reversa (nos locos <i>hom3-10</i> , <i>his1-7</i> e <i>lys1-1</i>) nas fases exponencial ou estacionária das culturas, tanto na presença quanto na ausência da fração S9. Também não promoveu mutação “forward” para resistência a cicloheximida.	Os <i>guidelines</i> referentes aos testes de genotoxicidade realizados com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (TG 480 e 481) foram excluídos pela OECD em 2014.	HENRIQUES, 1992
	Study to Determine the Ability of Lactofem Technical Product, from Hoechst do Brasil to Induce Chromosome Mutations Analyzed by the Micronucleus Test in Bone Marrow of Treated Mice	60% m/v	24 e 48 horas após a administração da substância.	<p>Teste preliminar: 6000; 3000; e 1500 mg/kg.</p> <p>Teste definitivo: 2000 mg/kg e sacrifício após 24 horas (grupo I); 2000 mg/kg e sacrifício após 48 horas (grupo II); e 1000 mg/kg e sacrifício após 24 horas (grupo III).</p>	No teste preliminar, não houve mortalidade no grupo que recebeu 1500 mg/kg e as mortalidades foram de 67% e 83%, respectivamente, para as doses de 3000 e 6000 mg/kg. No ensaio definitivo, a substância teste apresentou uma toxicidade significativa (p<0,001) na medula óssea em todos os grupos com a substância teste. Foram registradas 3 mortes nos grupos das fêmeas, sendo 1 morte no grupo I e 2 mortes no grupo II, ambas doseadas com a DMT (2000 mg/kg). As fêmeas, em todos os grupos teste, apresentaram	Não clastogênico. Com relação à frequência de micronúcleos, os grupos teste apresentaram resultados estatisticamente similares ao controle negativo.	Na avaliação do grupo II, 1 macho e 2 fêmeas tiveram uma redução na proporção de PCE/(PCE+NCE) num valor superior a 80% em relação aos valores obtidos no grupo controle.	ERDTMANN <i>et al.</i> , 1993



	(HOE 2000/911).				alguma redução na frequência de PCE em relação aos machos, mas esta diferença não foi significativa.			
	Determination of DNA Covalent Binding of PPG-in mouse liver (LSC-8692).	60% m/v	89 horas após a exposição a ¹⁴ C-PPG-844 ou DMN	Três camundongos machos foram doseados com 89,2 µCi de solução de ¹⁴ C-PPG-844, via oral. Quatro camundongos machos receberam 7,7 µCi DMN (controle positivo), por via oral.	-	Uma ligação covalente com índice de 1,4 ± 0,6 foi determinada para o lactofem. Isso sugere que uma baixa ligação ao DNA hepático do rato pode ocorrer.	Este achado não pode ser atribuído apenas à ligação ao DNA uma vez que algumas proteínas de ligação do composto original e/ou metabolito pode ter ocorrido.	MITOMA; GREEN, 1985
	Ames Salmonella/ Microsome Plate Test (PH 301-PPG-001-82).	60% m/v	-	Cepas: TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538 10000; 3333; 1000; 333; e 100 µg/placa	Nenhuma das cepas apresentou potencial mutagênico na presença ou ausência de ativação metabólica. Entretanto, houve um aumento na frequência de mutação nas cepas TA1537 e TA1538 com ativação (RM ≤ 2) e na cepas TA98 com ativação metabólica (RM=2,29) na dose de 10000 µg/placa.	Não mutagênico.	A substância teste PPG 884 produziu um precipitado branco quando adicionada a solução aquosa de ágar nas concentrações de 100, 33,3 e 10 mg/mL.	GODEK; NAISMITH; MATTHEWS, 1982
	Chromosome Aberrations Assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells (T2414.337001).	79,6%	-	Teste preliminar: 5000; 500; 50; 5,0; 0,5; e 0,05 µg/mL. Teste definitivo: - Sem S-9: 250; 125; 62,5; 31,25; e 15,63 µg/mL. - Com S-9: 500; 250; 125; 62,5; e 31,25 µg/mL	No teste de solubilidade, houve formação de precipitado nas concentrações de 5000, 500 e 250 µg/mL da substância teste.	Nenhuma das doses testadas mostrou um aumento significativo no número de células com aberração cromossômica em relação ao grupo controle.	-	THILAGAR; KUMAROO; KOTT, 1984
	Mammalian Cell Forward Gene Mutation Assay (PH 314-PPG-001-84).	79,6%	-	Teste preliminar: 5000; 1666; 500; 166; 50; 16,6; 5; 1,66; 0,5; e 0,16 µg/mL. Teste definitivo: - Sem S-9: 150; 100;	O teste preliminar apontou citotoxicidade total nas doses de 166, 500, 1666 e 5000 µg/mL sem S-9 e na dose de 5000 µg/mL com S-9. No ensaio definitivo, houve aumento na frequência de mutações nas doses de 50 e 75 µg/mL sem S-	A substância teste não foi mutagênica no teste de ovário de hamster chinês/hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT)	-	GODEK; NAISMITH; MATTHEW, 1985



				75; 50; e 25 µg/mL. - Com S-9: 2000; 1500; 1000; 500; e 100 µg/mL.	9. O produto foi reavaliado nos níveis de dose de 25; 50; 75; 100; 125 e 150 µg/mL sem S-9, mas o resultado desse ensaio não confirmou o aumento original na frequência de mutações.	de mutação genética de célula de mamíferos.		
	<i>In vivo – In vitro</i> Mouse Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Assay (84-29A).	78,02%	-	500 ou 1000 mg/kg (gavagem).	-	Nas condições do ensaio, a substância em estudo não induziu danos no ADN que sejam detectáveis pelo presente ensaio.	Apenas 2 animais machos por grupo foram testados. Foram contadas 20 células/animal. O guideliness referente ao ensaio de dano e reparo de DNA (TG 482) foi excluído pela OECD em 2014.	WILLIAMS, 1986
LACTOFEM TÉCNICO MILENIA (25351.007405/00-01)	The <i>Salmonella typhimurium</i> reverse mutation by Lactofen Técnico (RF-G11.63/98).	611,6 g/L	-	Cepas: TA98, TA100, TA1535 e TA1537 Com e sem S-9: 5; 1; 0,1; 0,01; e 0,001 mg/placa	Nos experimentos sem S-9, evidenciou-se uma citotoxicidade igual ou superior a 60% para a cepa TA98 na mais alta concentração testada, já para a cepa TA100, a citotoxicidade surgiu a partir de 0,1 mg/placa, enquanto que para a cepa TA1537 isso foi notado nas concentrações de 0,01, 1 e 5 mg/placa. Nos experimentos com S-9 houve citotoxicidade igual ou superior a 60% apenas para a cepa TA1535 na mais alta concentração testada.	Não mutagênico. Não induziu um aumento significativo no número de revertentes, nem houve um efeito dose-resposta, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica.	Ausência dos dados do controle histórico do laboratório executor.	MARQUES, 1999
	A micronucleus study in mice for Lactofen Técnico (RF-G12.39/98).	611,6 g/L	12, 36 e 72 horas após administração da substância.	Teste preliminar: 2000; 1000; 500; e 250 mg/kg. Teste definitivo: 712,5 mg/kg (75% da DL ₅₀ intraperitoneal).	No teste preliminar, não foi observada mortalidade nos grupos testados com as menores doses do produto (250 e 500mg/kg), enquanto que no grupo testado com 1000 mg/kg, 3 dos 5 animais foram a óbito. Todos os animais foram a óbito no grupo testado com	Insatisfatório. No grupo sacrificado após 12 horas os machos tiveram pelo menos o dobramento da frequência de MNCE em relação ao grupo controle,	Na avaliação após 12 horas, 1 macho do grupo tratado teve redução na proporção de PCE/(PCE+NCE) num valor superior a 80% em relação aos valores obtidos no	PERINA, 1999



				Produto administrado por via intraperitoneal em uma única aplicação.	2000mg/kg.	enquanto que as fêmeas tiveram aumento da frequência no número de MNPCE e de MNNCE. As fêmeas sacrificadas após 36 horas também tiveram o dobramento da frequência de MNNCE em relação ao grupo controle.	grupo controle. Na avaliação após 36 horas, foram 06 animais (4 machos e 2 fêmeas) que apresentaram valores não aceitáveis neste parâmetro. Ainda neste grupo, um 1 macho não teve seus dados tabulados. Na avaliação após 72 horas foram excluídos 1 macho do grupo controle positivo e 1 fêmea do grupo tratado. Ainda, para ambos os sexos, o grupo controle positivo não apresentou aumento na frequência de aparecimento de MNPCE.	
LACTOFEM TÉCNICO AGRÍPEC (25351.173742/2002-74)	Teste de mutação gênica reversa em <i>Salmonella typhimurium</i> – Teste de Ames para o produto Lactofem Técnico 75% (RLN25L31).	76,14%	–	Cepas: TA98, TA100, TA1535 e TA1538 5000; 3000; 1800; 1080; e 648 µg/placa	Na cepa TA1538 sem S-9 foi observado um aumento no número de revertentes com o aumento das concentrações testadas. Na cepa TA1535 sem S-9, a ANOVA revelou aumento estatisticamente significativo do número de revertentes (p=0,038). Na cepa TA1538 com S-9, a ANOVA revelou aumento estatisticamente significativo do número de revertentes (p=0,004). Em ambos os casos as razões de mutagenicidade estavam abaixo do limite de significância biológica (aumento menor que 3 vezes) e não houve relação dose-resposta.	Não mutagênico. Não induziu um aumento significativo no número de revertentes, nem houve um efeito dose-resposta, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica.	Ausência dos dados do controle histórico do laboratório executor.	PESTANA; VAL, 2002
		76,14%	48 horas.	Teste preliminar: 500; 250; 200; e 100	No teste preliminar, não foi observada mortalidade nos grupos	Não clastogênico. No ensaio definitivo,	O estudo utilizou animais unicamente do	PESTANA; ALMEIDA,



	Teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo para Lactofen Técnico 75% (RLYBRT56).			mg/kg. Teste definitivo: 208 mg/kg (80% da DL ₅₀ intraperitoneal). Tratamento sequencial às 0 e 24 horas com os agentes em teste, por via intraperitoneal, seguido de uma única amostragem 48 horas após a primeira aplicação.	testados com as menores doses do produto (100 e 200 mg/kg), enquanto que no grupo testado com 250 mg/kg, 2 dos 3 animais foram a óbito. Todos os animais foram a óbito no grupo testado com 500mg/kg.	não houve aumento de micronúcleos nos animais expostos a substância teste.	sexo masculino e de uma única dose de teste correspondente à máxima dose tolerada para uma avaliação inicial da genotoxicidade. Não foi possível analisar 2000 células quanto à frequência de micronúcleos em 4 animais do grupo experimental e 1 animal do grupo controle negativo.	2002
--	--	--	--	--	---	--	--	------



2.2. Carcinogenicidade:

2.2.1. Estudos em animais de experimentação:

Com relação à carcinogenicidade, a nota técnica da Fiocruz faz referência a um estudo conduzido em ratos e outro em camundongos, ambos aportados no Processo Anvisa nº 25000.013372/97-79, referente ao produto Lactofem Técnico, da atual empresa Bayer S/A. Tais estudos foram também considerados na avaliação toxicológica dos outros dois produtos técnicos lactofem com registro no Brasil, das atuais empresas Nufarm Indústria Química e Farmacêutica S/A e Adama Brasil S/A.

Os principais achados encontrados nos estudos acima mencionados encontram-se no Quadro 03.

De modo geral, foi verificado que, nas condições testadas, o ingrediente ativo em pauta apresentou como órgãos-alvo de toxicidade o fígado e os rins, sendo que maior número de alterações foi visto no fígado, tanto de ratos como de camundongos. Alterações neoplásicas foram evidenciadas, em ratos, na forma de nódulos proliferativos (nódulos neoplásicos) no fígado, somente na maior concentração (2000 ppm) e apenas 24 meses após a exposição (sacrifício terminal) e, em camundongos, nas duas maiores concentrações (50 e 250 ppm), na forma de adenoma, adenoma e carcinoma combinados (machos e fêmeas) e carcinoma hepáticos (machos).

Em ratos foram observadas, nas duas maiores concentrações (1000 e 2000 ppm), alterações bioquímicas, com aumento dos níveis de enzimas hepáticas (aspartato transaminase - AST, alanina aminotransferase - ALT e/ou fosfatase alcalina) em ambos os sexos; alterações microscópicas, com incidência aumentada de pigmentação de hepatócitos e de células de Kupffer em fêmeas e pigmentação de células de Kupffer em machos, além de incidência aumentada de pigmentação de células do túbulo do córtex renal, em ambos os sexos. Animais expostos a tais concentrações e, também à concentração de 500 ppm, tiveram peso relativo do fígado aumentado aos 12 meses de exposição. Alterações macroscópicas observadas em animais expostos a essas três concentrações, consistiram de incidência aumentada de fígado e rins escurecidos, em fêmeas, aos 18 e 24 meses de exposição e em fêmeas encontradas mortas e, em machos, aos 18 meses de exposição (grupos expostos a 500 ppm) e, aos 12, 18 e 24 meses (machos e fêmeas dos grupos de 1000 e 2000 ppm). Tais alterações ocorreram de maneira dose-dependente, com aumento da incidência de acordo com o aumento da dose. Por outro lado, somente no grupo da maior concentração (2000 ppm), foram verificados diminuição de 19% (machos) e 18% (fêmeas) do peso corpóreo e aumento do peso



absoluto e relativo do fígado aos 24 meses (ambos os sexos). Alterações histopatológicas incluíram, também apenas em animais expostos à maior concentração (2000 ppm), focos aumentados de alteração celular basofílica e eosinofílica no fígado de machos e, focos aumentados de alteração celular basofílica no fígado de fêmeas, além de nódulos proliferativos (neoplásicos) no fígado de machos e fêmeas, significativamente aumentados em animais sacrificados no final do período de exposição (24 meses), analisados em conjunto com animais encontrados mortos ou moribundos durante o estudo (TISDEL *et al.*, 1985). O termo “nódulo proliferativo” foi usado nesse estudo como sinônimo de “nódulo neoplásico”, que, por sua vez, foi o termo recomendado por especialistas em patologia e carcinogênese em ratos, em substituição ao termo “nódulo hiperplásico” (normalmente descrito na literatura). Esses nódulos hepáticos de roedores são lesões proliferativas conhecidas por serem induzidas por carcinógenos e indicam probabilidade aumentada para desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (SQUIRE; LEVITT, 1975).

Nesse estudo, desenvolvido em ratos, o NOAEL sistêmico definido foi de 50 ppm. A U.S. EPA definiu, em 1996, NOAEL de 500 ppm para toxicidade crônica em ratos, baseado na pigmentação aumentada do fígado e rins em ambos os sexos, encontrados nas concentrações de 1000 e 2000 ppm (U.S. EPA, 1996a). No ano de 2000 a agência considerou NOAEL de 2 mg/kg/dia, baseado nos efeitos observados na dose subsequente de 19 mg/kg/dia, que consistiram de alterações macroscópicas do fígado e rins, além de alterações bioquímicas relacionadas à toxicidade ao fígado (U.S. EPA, 2000a), sendo esse NOAEL mantido em documento emitido posteriormente (U.S. EPA, 2004).

Em camundongos, a exposição a todas as concentrações testadas induziu pesos absoluto e relativo do fígado aumentados em relação aos controles (somente em machos na concentração de 10 ppm e em ambos os sexos nas maiores concentrações), além de escurecimento do órgão, aumento da severidade de hepatocitomegalia (machos) e aumento da severidade de pigmentação da célula sinusoidal do fígado, em ambos os sexos. Nas duas maiores concentrações (50 e 250 ppm) foi observado, adicionalmente, aumento da severidade de alteração celular e de foco de inflamação crônica hepáticos (machos) e, somente na maior concentração (250 ppm), foi verificado aumento do peso absoluto e relativo dos rins, tendência positiva de incidência de pigmentação dos rins e incidência aumentada de catarata (ambos os sexos). Com relação às alterações neoplásicas, houve, na concentração intermediária (50 ppm), aumento na incidência de adenomas hepáticos em animais de ambos os sexos e, tendência positiva (comprovada por dois métodos estatísticos) de incidência de hemangiossarcoma, em fêmeas; na concentração mais alta (250 ppm) foi observada tendência positiva de incidência (comprovada por três métodos estatísticos) e aumento significativo na incidência de



adenoma e adenoma e carcinoma hepáticos combinados, em ambos os sexos, além de tendência positiva de incidência (comprovada por dois métodos estatísticos) e aumento significativo na incidência de carcinoma hepático em machos. Não foi possível estabelecer o NOAEL sistêmico, pois, foram observados efeitos na menor concentração testada (COX *et al.*, 1985).

Segundo a U.S. EPA, o NOAEL para toxicidade sistêmica em camundongos encontra-se abaixo de 1,4 mg/kg/dia, baseado nos efeitos observados nesta dose (aumento de peso do fígado, aumento na incidência de hepatocitomegalia, aumento na pigmentação de célula sinusoidal) (U.S. EPA, 2000a).

Portanto, relacionado à carcinogenicidade, esses estudos mostraram que lactofem induziu neoplasias no fígado de roedores, em camundongos, na forma de adenoma, adenoma e carcinoma combinados e carcinoma e, em ratos, na forma de nódulos proliferativos (neoplásicos), sendo que nesta espécie, somente na maior dose e ao final do período de exposição.

Estudo adicional para investigar carcinogênese em ratos foi aportado à Anvisa pela empresa Milenia Agro Ciências S.A. (atual Adama Brasil S.A.) e compõe o dossiê do processo de registro de lactofem técnico da empresa. Nesse estudo (Quadro 04), não mencionado na nota técnica da Fiocruz, ratos Wistar previamente tratados com agentes químicos reconhecidamente genotóxicos para diferentes órgãos-alvo, foram expostos a lactofem, na dieta, durante 25 semanas, nas concentrações de 100, 500 e 1000 ppm (correspondentes às doses médias de 8, 42 e 87 mg/kg/dia). O teste foi baseado no conceito de carcinogênese de múltiplo estágio, em que o desenvolvimento do câncer é um processo que envolve estágios sequenciais denominados iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica. Assim, o primeiro estágio, iniciação, foi obtido usando doses subcarcinogênicas de produtos químicos genotóxicos (DEN - *N-diethylnitrosamine*; BBN - *N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine*; MNU - *N-methyl-N-nitrosurea*; DHPN - *dihydroxy-di-N-propylnitrosamine*; DMH - *N-N'-dimethylhidrazine*). O segundo estágio, promoção, foi examinado em animais subsequentemente expostos à substância teste, nas diferentes concentrações acima mencionadas. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade da substância teste em promover células iniciadas para o estado pré-neoplásico ou neoplásico. Os dados mostraram que lactofem induziu aumento dos pesos absoluto e relativo do fígado de machos e fêmeas iniciados, nas concentrações intermediária (500 ppm) e alta (1000 ppm), com hiperplasia do ducto biliar hepático somente em fêmeas, na concentração de 1000 ppm. Com relação a outros órgãos, foi observado, somente em machos, diminuição do peso absoluto e relativo da adrenal em animais iniciados expostos à menor concentração (100 ppm), além de aumento do peso absoluto do testículo esquerdo; diminuição do peso absoluto e relativo da adrenal em animais iniciados



expostos a 500 ppm, também apenas em machos; aumento dos pesos relativos do coração e rim esquerdo em machos expostos a 1000 ppm. Não foi observado efeito de lactofem sobre a incidência de neoplasias nos grupos de animais iniciados expostos à substância teste nas diferentes concentrações. Aumento de neoplasias (do fígado e da tireoide) foi visto somente no grupo de animais expostos a fenobarbital (controle positivo da fase de promoção) (GAVA, 2000).

Desta forma, esse estudo não confirmou carcinogenicidade por lactofem em ratos. Deve-se ressaltar que tal estudo apresenta limitação para sua aceitação, pois, foi conduzido com base em protocolo adaptado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) do ensaio originalmente descrito por Ito *et al.* (1988), sendo que tal protocolo havia sido oficializado em 1996 para uso em projeto específico de análise de alguns ingredientes ativos, porém, o mesmo não tem validade de acordo com o preconizado no item 17 do Anexo I da Portaria nº 03, norma vigente no Brasil referente às exigências do Ministério da Saúde para registro de agrotóxicos e afins.

Além disso, a mesma norma prevê que um produto é considerado carcinogênico se, dentre outros, houver “evidências científicas de carcinogenicidade, baseadas em dados validados, para pelo menos duas espécies de animais de experimentação com incidência aumentada de tumores **malignos** [...]” (BRASIL, 1992, grifo nosso). No caso do estudo de Tisdell *et al.* (1985), apresentado pela empresa Bayer e, anteriormente discutido, achados neoplásicos consistiram de “nódulos proliferativos”, usado pelo diretor do estudo como sinônimo de “nódulo neoplásico” ou “hiperplásico” (não maligno), conforme exposto anteriormente. Portanto, do ponto de vista legal, tais achados, em conjunto com aqueles encontrados em camundongos, não classificariam o produto como carcinogênico, embora tecnicamente, as lesões encontradas tenham elevada probabilidade de se desenvolver em tumor maligno. Já a U.S. EPA classificou lactofem, inicialmente (em 1987), como provável carcinógeno para humanos, considerando que, apesar de não ter sido encontrada neoplasia maligna em ratos, o órgão-alvo das neoplasias (fígado) foi o mesmo em ratos e camundongos (U.S. EPA, 1996a).

Por outro lado, na literatura científica não foram encontrados estudos conduzidos em animais de experimentação relacionados à carcinogênese por lactofem. Foi encontrado um estudo, desenvolvido em camundongos, relacionado ao provável mecanismo de ação em roedores, que mostrou que lactofem induziu proliferação de peroxissomos em camundongos alimentados continuamente, por sete semanas, com ração contendo lactofem. Tal efeito foi comprovado pela alteração de parâmetros normalmente modificados por hepatocarcinógenos proliferadores de peroxissomos (peso relativo do fígado e atividade das enzimas catalase e acil-CoA oxidase) e, através da similaridade aos efeitos promovidos por nafenopina (composto proliferador de peroxissomos) em



camundongos expostos a 250 ppm de lactofem técnico e a 250 ppm de lactofem puro. Os efeitos de igual magnitude induzidos por lactofem técnico (aproximadamente 78% de pureza) e lactofem puro, mostraram que lactofem, por si só, é capaz de induzir a proliferação de peroxissomos. Além dos efeitos descritos, foi verificado aumento da coloração de peroxissomos em secções do fígado analisadas por microscópio óptico e eletrônico. Os autores relataram ainda, que as alterações descritas não foram evidenciadas nas concentrações mais baixas testadas, de 2, 10 e 50 ppm (BUTLER *et al.*, 1988).

O mecanismo de ação de lactofem na indução de neoplasias hepáticas em roedores parece não envolver genotoxicidade (U.S. EPA, 2004), o que está de acordo com os resultados dos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade que constam dos dossiês dos produtos técnicos das diferentes empresas com registro de lactofem no Brasil (descritos no item anterior do presente parecer).

De fato, as evidências existentes apontam para um mecanismo epigenético (proliferação de peroxissomos), como demonstrado também em estudos que constam dos processos aportados à Anvisa, também relatados na nota técnica da Fiocruz. No estudo exposto no Quadro 05, por exemplo, foi avaliada a indução de proliferação de peroxissomos em cultura de hepatócitos de ratos exposta à lactofem e seus metabólitos, em quatro diferentes concentrações. Verificou-se que lactofem induziu a proliferação de peroxissomos nos hepatócitos expostos, aumentando a atividade de oxidação do substrato palmitoil CoA, de forma concentração-dependente. Já os metabólitos testados (PPG-947, PPG-1576, PPG-2053 e PPG-2838) promoveram aumento da atividade enzimática em uma ou outra concentração testada e, em menor magnitude em relação ao lactofem. A ordem de potência, com base na magnitude da atividade enzimática, foi a seguinte: PPG-844 (lactofem) > -947 > -847 > -1576 > -2053. Além disso, foi observado, em análise por microscopia eletrônica, aumento do número de peroxissomos anucleados nos hepatócitos expostos à lactofem, mas não nos hepatócitos expostos aos seus metabólitos, em que poucos peroxissomos foram visualizados. A quantidade de peroxissomos vista nos hepatócitos expostos a lactofem foi comparável ao observado na cultura de células tratadas com clofibrato, medicamento hipolipidêmico, proliferador de peroxissomos (TYSON; LEBER, 1986).

Outro estudo em que foi avaliada a hepatotoxicidade por lactofem, envolvendo proliferação de peroxissomos, foi conduzido em camundongos expostos à lactofem e a quatro agentes químicos com diferentes mecanismos de hepatotoxicidade, analisados comparativamente (Quadro 06). Neste estudo, grupos de animais expostos a lactofem técnico em quatro diferentes concentrações (10, 50, 250 e 600 ppm) e a lactofem puro, durante oito semanas, foram avaliados quanto aos níveis de enzimas hepáticas e



alterações microscópicas no fígado. Paralelamente, quatro outros grupos foram expostos, da mesma forma, a agentes químicos hepatotóxicos (benzidina, fenobarbital, nafenopina e acetaminofeno) e avaliados quanto aos mesmos parâmetros. Observou-se que lactofem, tanto técnico como puro, induziram aumento do peso relativo do fígado e dos níveis séricos de glutamato-piruvato transaminase e fosfatase alcalina na 4ª semana de exposição, além de alterações nos hepatócitos (tamanho nuclear e eosinofilia citoplasmática, de modo concentração-dependente e hipertrofia celular). Após oito semanas de exposição, lactofem técnico apresentou efeitos similares à nafenopina, substância reconhecidamente proliferadora de peroxissomos, induzindo aumento concentração-dependente do peso relativo do fígado, de catalase, da coloração de peroxissomos e de fosfatase alcalina (análise histoquímica), além de alterações nos hepatócitos (aumento nuclear, eosinofilia citoplasmática e hipertrofia celular), mas não, alteração de outras enzimas hepáticas analisadas (glutathione, P450, glutamato-piruvato transaminase e glutamato-oxalacetato transaminase). Estas alterações também foram induzidas por lactofem puro (exceto catalase, que não apresentou diferença em relação ao controle). Os autores declararam ainda, que lactofem e nafenopina induziram tumores no fígado, porém, tais dados não foram apresentados no relatório analisado. Concluíram que os efeitos similares observados em animais expostos ao lactofem e nafenopina são sugestivos de que ambas as substâncias possuem mecanismo comum de carcinogenicidade (WILLIAMS *et al.*, 1985).

Por outro lado, lactofem não induziu proliferação de peroxissomos em chimpanzés expostos a duas diferentes doses, selecionadas do intervalo de doses utilizadas no estudo conduzido em roedores (Quadro 07). Hepatócitos dos animais tratados, analisados quanto à atividade de enzimas envolvidas no ciclo de β -oxidação de peroxissomos, não apresentaram aumento de atividade enzimática, um e três meses após o início da exposição, quando comparados aos hepatócitos coletados antes da exposição. Além disso, a ausência de diferença entre as condições de pré-exposição e pós-exposição à lactofem técnico, em lâminas examinadas ao microscópio óptico (coradas com hematoxilina/eosina e por reação diaminobenzidina) reforçam a conclusão de que não houve proliferação de peroxissomos nos grupos de animais tratados com as doses selecionadas. Em análise por microscopia eletrônica, algumas alterações nucleares foram visualizadas (agregação da cromatina, presença de corpos nucleares e alargamento do envelope nuclear), porém, o autor afirmou que tais alterações não foram condizentes com modificações observáveis em células pré-neoplásicas ou neoplásicas. Outras alterações observadas, que são características de resposta a substâncias tóxicas, foram redução do estoque de glicogênio e presença de gotas de lipídios, aos três meses de tratamento, condições revertidas cinco meses após o término da exposição, além de alteração do



canalículo biliar, na dose baixa, com mudanças sugerindo moderada colestase intra-hepática e, na dose alta, com mudança hipertrófica do aparelho de Golgi, sugerindo leve colestase intra-hepática. Adicionalmente, foi observada vesiculação do retículo endoplasmático rugoso, tanto na dose alta como baixa (em menor extensão), que diminuiu, mas não desapareceu cinco meses após o término da exposição. Vesiculação com desgranulação são comumente observadas em resposta a agentes tóxicos, porém, neste caso, houve vesiculação em grau mais elevado do que desgranulação, o que pode ter sido devido à infecção por vírus da hepatite, segundo o autor, uma vez que dois dos animais tratados apresentaram túbulos não ondulados e estruturas citoplasmáticas semelhantes a partículas de hepatite não-A e não-B (WILLIAMS *et al.*, 1986).

Portanto, os estudos que constam dos processos submetidos à Anvisa, relativos ao provável mecanismo de ação da carcinogênese em roedores, mostraram que lactofem teve efeito tóxico sobre o fígado de duas espécies de roedores, induzindo proliferação de peroxissomos, mas, não apresentou o mesmo efeito, proliferador, no fígado de espécie de primata não humano, o que sugere que tal mecanismo seria relevante em roedores, mas, não, em primatas. No entanto, é necessário enfatizar que tais estudos possuem limitações que comprometem a aceitação dos mesmos para subsidiar qualquer decisão a respeito do efeito carcinogênico de lactofem e sua relevância para humanos. Tais limitações esbarram na falta de informações imprescindíveis nos estudos apresentados (lote e/ou pureza da substância teste no estudo desenvolvido em ratos e chimpanzés e dados de indução de tumores no estudo conduzido em camundongos). Além disso, deve-se considerar o reduzido número de estudos existentes, tanto de empresas com registro do produto no país como na literatura científica, conforme já mencionado.

No cenário internacional tem-se que o *Cancer Peer Review Committee* (CPRC) da U.S. EPA classificou lactofem, em 1987, na categoria B2 (provável carcinógeno humano), estabelecendo um *Cancer Potency Factor* (Q1) de $1,7 \times 10^{-1}$ mg/kg/dia, baseado no fator de escalonamento interespecies de 0,67. Esse Q1 foi reduzido para $1,19 \times 10^{-1}$ após alteração do fator interespecies para 0,75. A classificação B2 foi baseada no aumento da incidência combinada de adenomas e carcinomas no fígado de camundongos e aumento de nódulos neoplásicos e focos de alteração celular (possível precursor de tumores) no fígado de ratos (U.S. EPA, 2003). Além disso, a agência considerou que o mecanismo de ação de lactofem na indução de neoplasias hepáticas em roedores seria por proliferação de peroxissomos (U.S. EPA, 1996b; 2003).

A classificação de lactofem foi alterada, posteriormente, sendo considerado como possível carcinógeno para humanos em doses que causam efeitos bioquímicos e histopatológicos (proliferação de peroxissomos) no fígado de roedores, porém, improvável de ser carcinogênico em doses abaixo daquelas que causam essas alterações,



estabelecendo NOAEL de 0,3 mg/kg/dia, baseado na atividade aumentada de enzimas hepáticas e aumento da incidência de achados histopatológicos (U.S. EPA, 2004).

No documento de revisão de avaliação à saúde humana, de 2006, a U.S. EPA manteve a classificação de lactofem como improvável carcinógeno para humanos em doses que não causam mudanças bioquímicas e histopatológicas no fígado de roedores (U.S. EPA, 2006). Concluiu que os dados disponíveis de lactofem mostram que o modo de ação, na indução de tumores hepáticos em roedores, envolve a ativação do receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR α) e que, tal modo de ação, seria qualitativamente possível em humanos, mas, quantitativamente impossível, devido às diferenças toxicodinâmicas na ativação do PPAR α , de forma que a quantificação do risco não seria necessária (U.S. EPA, 2007).

Dessa forma, o conjunto dos estudos relacionados à carcinogenicidade de lactofem, acima discutido, mostrou que lactofem induz, em doses elevadas, neoplasia maligna no fígado de camundongos e apresenta potencial carcinogênico hepático em ratos e, sugere que a carcinogênese ocorre por mecanismo não-genotóxico (proliferação de peroxissomos). Por outro lado, o possível modo de ação (ativação do PPAR α) necessita ser discutido, assim como a relevância do modo de ação da carcinogênese para humanos, o que segue adiante, neste parecer.



Quadro 03. Análise de Carcinogenicidade do Produto Técnico Lactofem Bayer (Processo nº 25000.013372/97-79)

	Espécie, linhagem e número animais	Via e período de exposição	Pureza do IA	Concentração (ppm)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
TOXICIDADE CRÔNICA E CARCINOGENICIDADE EM RATOS ESTUDO Nº 6100	Ratos (CD Crl:CD (SD BR) 84/sexo/dose	- Oral (dieta) - Período de exposição: contínuo, durante 104 semanas	Lote 237 2848 (início: 73,5%/final: 72,18%); Lote 821-123 (início: 78,26%/final: 77,39%)	50, 500, 1000 e 2000 (não foi informado o consumo médio da substância/grupo)	<p><u>2000 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↓ peso corpóreo no primeiro ano de tratamento (19% ♂ e 18% ♀) - ↑ AST, ALT e fosfatase alcalina ♂ / ♀ - ↑ peso relativo do fígado aos 12 meses e ↑ peso absoluto e relativo do fígado 24 meses (♂ / ♀) - ↑ incidência de fígado e rins escurecidos (♂ / ♀ 12, 18 e 24 meses; ♀ que morreram durante o estudo) - ↑ incidência de pigmentação de hepatócitos e células de Kupffer (♀) e ↑ incidência de pigmentação de células de Kupffer (♂) - ↑ incidência de pigmentação de células do túbulo do córtex renal (♂ e ♀) - ↑ focos de alteração celular basofílica e eosinofílica no fígado de ♂ e ↑ focos de alteração celular basofílica no fígado de ♀ - ↑ nódulos proliferativos (nódulos neoplásicos) no fígado de ♂ e ♀ aos 24 meses e em encontrados mortos/moribundos ao longo do estudo. <p><u>1000 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ AST, ALT e fosfatase alcalina ♂ e ↑ AST, ALT ♀ - ↑ peso relativo do fígado aos 12 meses (♂ / ♀) - ↑ incidência de fígado e rins escurecidos (♂ / ♀ 12, 18 e 24 m) - ↑ incidência de pigmentação de hepatócitos e células de Kupffer (♀) e ↑ incidência de pigmentação de células de Kupffer (♂) - ↑ incidência de pigmentação de células do túbulo do córtex renal (♂ e ♀) <p><u>500 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso relativo do fígado aos 12 meses (♀) - ↑ incidência de fígado e rins escurecidos (♀ 18 e 24 m e que morreram durante o estudo; ♂ 18 m); <p><u>50 ppm:</u> não foram encontradas alterações</p>	50	TISDEL <i>et al.</i> , 1985



	Espécie, linhagem e número animais	Via e período de exposição	Pureza do IA	Concentração (ppm)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg/dia)	Referência
<p style="text-align: center;">CARCINOGENICIDADE EM CAMUNDONGOS ESTUDO 250-152</p>	<p>Camundongos CrL:CD – 1(ICR)BR 60/sexo/dose</p>	<p>- Oral (dieta) - Período de exposição: contínuo, durante 74 semanas</p>	<p>78,26% (lote 821-123)</p>	<p>10, 50, 250 ♂ 1,49; 6,87; 35,44 mg/Kg/dia; ♀ 1,89; 9,44; 42,80 mg/Kg/dia</p>	<p><u>250 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso absoluto e relativo dos rins (♂ e ♀) - ↑ peso absoluto e relativo do fígado (♂ e ♀) - fígado aumentado (♂ e ♀ sacrifício terminal e encontrados mortos) - fígado escurecido (♂ e ♀ encontrados mortos) - ↑ severidade de hepatocitomegalia (♂) - ↑ severidade de pigmentação de célula sinusoidal do fígado (♂ e ♀) - ↑ severidade de alteração celular e foco de inflamação crônica do fígado (♂) - tendência positiva de incidência (comprovada por três métodos estatísticos) e ↑ significativo na incidência de adenoma (♂ e ♀); adenoma e carcinoma combinados (♂ e ♀) e incidência de carcinoma no fígado (♂) - tendência positiva (comprovada por dois métodos estatísticos) de carcinoma no fígado (♀) - tendência positiva de incidência de pigmentação dos rins (♂ e ♀) - ↑ catarata (♂ e ♀) <p><u>50 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso absoluto e relativo do fígado (♂ e ♀) - fígado aumentado (♀ sacrifício terminal) - fígado escurecido (♂ e ♀ encontrados mortos) - ↑ severidade de hepatocitomegalia (♂) - ↑ severidade de pigmentação de célula sinusoidal do fígado (♂ e ♀) - ↑ severidade de alteração celular e foco de inflamação crônica do fígado (♂) - ↑ incidência de adenoma no fígado (♂ e ♀) - tendência positiva (comprovada por dois métodos estatísticos) de incidência de hemangiosarcoma no fígado (♀) <p><u>10 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso absoluto e relativo do fígado (♂) - fígado escurecido (♂ e ♀ sacrifício terminal) - ↑ severidade de hepatocitomegalia (♂) - ↑ severidade de pigmentação de célula sinusoidal do fígado (♂ e ♀) 	<p>NOAEL <10 ppm</p>	<p>COX <i>et al.</i>, 1985</p>



Quadro 04. Análise de Carcinogenicidade do Produto Técnico Lactofem Milenia (Processo nº 25351.007405/00-01).

Carcinogênese em Médio Prazo em Ratos – Estudo nº G3.1-007-99							
Espécie e linhagem	Via e período de exposição	Pureza do IA	Concentrações (ppm)	Objetivos/Método	Resultados relevantes	Limitações do ensaio	Referência
Ratos Wistar 15 ♂/15 ♀ (grupo controle negativo: 10 ♂/10 ♀)	Dieta, 25 semanas	Lactofem técnico Milenia - Lote 001/98, teor 611,6 g/l	100, 500 e 1000 ppm ♂ 7, 39, 79 mg/Kg/dia; ♀ 9, 46, 95 mg/Kg/dia	<p>Objetivo: estudar o efeito de lactofem no processo de carcinogênese em múltiplos órgãos, avaliando a capacidade da substância teste em promover células iniciadas para o estado pré-neoplásico ou neoplásico.</p> <p>Grupos:</p> <ol style="list-style-type: none"> Somente ração (controle negativo) Todas as substâncias da fase de iniciação (DEN, MNU, DMH, BBN, DHPN) até 4ª sem e somente ração a partir da 5ª semana. Todas as substâncias da fase de iniciação (DEN, MNU, DMH, BBN, DHPN) até 4ª sem e fenobarbital a partir da 5ª semana (controle positivo da promoção). Todas as substâncias da fase de iniciação (DEN, MNU, DMH, BBN, DHPN) até 4ª sem e lactofem a partir da 5ª semana: 100 ppm (4a), 500 ppm (4b) e 1000 ppm (4c). Somente ração até a 4ª sem e lactofem a partir da 5ª semana: 100 ppm (5a), 500 ppm (5b) e 1000 ppm (5c). 	<p>1000 ppm:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso absoluto e relativo fígado (♂ e ♀) - ↑ peso relativo do coração e rim esquerdo (♂) - indução de hiperplasia do ducto biliar do fígado (incidência de 87%) (♀) <p>500 ppm:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso absoluto e relativo fígado (♂ e ♀) - ↓ peso absoluto e relativo da adrenal (♂) <p>100 ppm:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↓ peso absoluto e relativo da adrenal (♂) - ↑ peso absoluto do testículo esquerdo - Não houve aumento de alterações neoplásicas por lactofem. - Alterações neoplásicas aumentadas somente no grupo que recebeu fenobarbital (controle positivo): adenoma hepatocelular (33% ♀), adenocarcinoma hepatocelular (33% ♀), adenoma da tireóide (33% ♂). 	Protocolo utilizado (Ito <i>et al.</i> , 1988, adaptado pelo IBAMA e oficializado pelo órgão em 1996) não aceito de acordo com o previsto no item 17, Anexo I da Portaria nº 03/92.	GAVA, 2000



Quadro 05. Análise da Proliferação de Peroxissomos em Hepatócitos de Ratos - Produto Técnico Lactofem Bayer (Processo nº 25000.013372/97-79)

Proliferação de Peroxissomos em Hepatócitos de Ratos – Estudo nº LSC 8663							
Espécie e linhagem	Material	Pureza do IA	Concentrações (mM)	Objetivos/Método	Resultados relevantes	Limitação do ensaio	Referência
Ratos Sprague Dawley	Hepatócitos	Lote 374-2760 – pureza não informada	0,003; 0,01; 0,03 e 0,10	<p><u>Objetivo:</u> avaliar a proliferação de peroxissomos em cultura de hepatócitos de ratos exposta à lactofem e quatro de seus metabólitos (PPG-847, PPG-947, PPG-1576 e PPG-2838), através de análise enzimática e microscopia eletrônica.</p> <p><u>Método:</u> culturas de hepatócitos de ratos foram incubadas com as substâncias testes durante três períodos de 20 h, com intervalos de 24h cada e, em seguida, o sobrenadante dos meios de cultura expostos foi testado quanto à oxidação do substrato palmitoil Co-A, através da medida da atividade enzimática por espectrofotometria. Análise por microscopia eletrônica foi conduzida em hepatócitos tratados com as substâncias testes. Controle negativo consistiu de cultura de células contendo somente solvente e o controle positivo foi exposto a clofibrato nas concentrações 0.16 mM e 0.50 mM.</p>	<p>- ↑ oxidação de palmitoil CoA por lactofem (todas as concentrações testadas, de maneira concentração-dependente).</p> <p>- ↑ nº peroxissomos nos hepatócitos tratados com lactofem (na concentração 0.01 mM), comparável à cultura exposta a clofibrato (controle positivo).</p> <p>- ↑ oxidação de palmitoil CoA pelos metabólitos de lactofem (em menor magnitude em relação ao lactofem), mas não, aumento do número de peroxissomos, que foram ocasionalmente encontrados nos hepatócitos de culturas incubadas com tais substâncias.</p>	Não informou a pureza da substância teste.	TYSON; LEBER, 1986



Quadro 06. Análise de Parâmetros Bioquímicos e Histológicos em Hepatócitos de Camundongos - Produto Técnico Lactofem Bayer (Processo nº 25000.013372/97-79)

Parâmetros Bioquímicos e Histológicos em Hepatócitos de Camundongos – Estudo nº M435							
Espécie e linhagem	Via e período de exposição	Pureza do IA	Concentrações (ppm)	Objetivos/Método	Resultados relevantes	Limitação do ensaio	Referência
Camundongo CD1	Dieta, Oito semanas	Lactofem Técnico - lote 821-123, pureza 99.8%; lactofem puro, lote 374-Z760	10, 50, 250 e 600	<p>Objetivo: avaliar os efeitos bioquímicos e histológicos no fígado de camundongos expostos a lactofem, comparativamente a animais expostos a quatro diferentes agentes químicos com reconhecidos efeitos carcinogênicos e bioquímicos no fígado, que agem por diferentes mecanismos.</p> <p>Método: grupos de 10 camundongos foram expostos a lactofem técnico em quatro diferentes concentrações e a lactofem puro durante oito semanas. Na 4ª semana quatro animais/grupo foram sacrificados e foram coletados soro, para dosagem sérica de enzimas hepáticas e, fígado, para análise histológica, semi-quantitativa. Animais remanescentes foram mantidos em estudo por mais quatro semanas, quando também foram sacrificados e foi retirado material para análises bioquímicas, histológicas e histoquímicas. Além disso, outros grupos de animais foram expostos a outros agentes químicos hepatotóxicos (benzidina, fenobarbital, nafenopina e acetaminofeno) para análise comparativa.</p>	<p>4ª semana de exposição:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso relativo do fígado com exposição a concentrações crescentes de lactofem técnico e exposição à lactofem puro. - ↑ glutamato-piruvato transaminase e fosfatase alcalina. - ↑ tamanho nuclear e eosinofilia citoplasmática, concentração-dependente. - hipertrofia celular (concentrações mais elevadas). <p>8ª semana de exposição:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ↑ peso relativo do fígado (lactofem técnico, concentração-dependente e lactofem puro). - ↑ atividade de catalase (lactofem técnico, concentração-dependente). - ↑ atividade de fosfatase alcalina (lactofem técnico, concentração-dependente e lactofem puro). - sem efeito nos níveis de glutathione, P450, glutamato-piruvato transaminase e glutamato-oxalacetato transaminase. - ↑ concentração-dependente da coloração de peroxissomos e fosfatase alcalina em análise histoquímica. - ↑ tamanho nuclear, eosinofilia citoplasmática e hipertrofia celular, concentração-dependente (lactofem técnico e lactofem puro). - as alterações induzidas por lactofem foram similares qualitativamente e quantitativamente (maior concentração de lactofem técnico e lactofem puro) às induzidas por nafenopina (proliferador de peroxissomo). 	O autor afirma que lactofem induziu tumores no fígado de animais expostos, porém, tais dados não foram apresentados no estudo;	WILLIAMS <i>et al.</i> , 1985



Quadro 07. Análise de Parâmetros Bioquímicos e Microscópicos do Fígado de Chimpanzés - Produto Técnico Lactofem Bayer (Processo nº 25000.013372/97-79)

Parâmetros Bioquímicos e Microscópicos do Fígado de Chimpanzés - Estudo nº 573-2							
Espécie, linhagem e número animais	Via e período de exposição	Pureza do IA	Doses (mg/Kg/dia)	Objetivo	Resultados relevantes	Limitação do ensaio	Referência
Chimpanzés 3 ♂/dose	- Oral - Período de exposição: 3 meses	Não informada	0, 50, 75	<p><u>Objetivo:</u> avaliar a proliferação de peroxissomos após tratamento com lactofem através da medida de atividade enzimática e análises microscópicas.</p> <p><u>Método:</u> grupo de três chimpanzés, machos, receberam lactofem técnico (via oral) e amostras do fígado foram tomadas para análises bioquímicas e histológicas um e três meses a partir do início da exposição e, cinco meses após término do tratamento. Os dados foram comparados com análises do fígado pré-exposto à substância teste. Análises bioquímicas consistiram da medida da atividade de acil CoA oxidase, catalase e carnitina acetiltransferase. As secções do fígado foram analisadas ao microscópio óptico e eletrônico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - não houve diferenças entre as atividades das enzimas acil CoA, carnitina e catalase na condição pré e pós-exposição, um, três meses de tratamento e cinco meses após término da exposição e entre as diferentes doses. - não houve diferenças à análise por microscopia óptica entre as condições de pré e pós-exposição. - foram observadas alterações ultraestruturais no núcleo dos hepatócitos (agregação da cromatina, presença de corpos nucleares e alargamento do envelope nuclear), revertidas após término da exposição. Porém, tais alterações não foram consideradas características de células pré-neoplásicas ou neoplásicas. - redução do estoque de glicogênio aos três meses de exposição e presença de gotas de lipídios. - alteração nos canalículos biliares em ambas as doses. - vesiculação e desgranulação (em menor extensão) no RER. 	Não foram informados lote e pureza da substância teste.	WILLIAMS <i>et al.</i> , 1986



2.2.2. Modo de ação (MOA) dos proliferadores de peroxissomos para carcinogenicidade e relevância para humanos:

Proliferadores de peroxissomos constituem uma grande classe de substâncias químicas de estruturas diferentes que causam aumento no tamanho e no número de peroxissomos (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000; CORTON *et al.*, 2014). A exposição de animais aos proliferadores de peroxissomos leva à indução de um conjunto previsível de respostas no fígado, incluindo aumento do peso do fígado devido à hipertrofia e à hiperplasia dos hepatócitos e aumento na transcrição de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000; KLAUNIG *et al.*, 2003). A exposição prolongada a essas substâncias causa aumento na incidência de tumores nos fígados de camundongos e de ratos machos e fêmeas. Esses compostos não são considerados genotóxicos já que ensaios de mutagenicidade realizados com eles são quase uniformemente negativos (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000). Portanto, os proliferadores de peroxissomos seriam uma larga classe de hepatocarcinógenos não genotóxicos em roedores.

A maioria, se não todos, os efeitos dos proliferadores de peroxissomos são mediados por três membros da família de receptores nucleares chamada de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000). Esses três membros da família PPAR seriam o PPAR α , o PPAR β (ou PPAR δ) e o PPAR γ . Esses receptores possuem distintas funções fisiológicas devido a padrões divergentes de distribuição entre os tecidos, padrões de expressão específicos durante o desenvolvimento e especificidade variada a ligantes (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000; CORTON *et al.*, 2014).

O PPAR α seria o predominante no fígado, sendo expresso também em outros órgãos e tecidos como rins, coração, mucosa intestinal e tecido adiposo marrom. O PPAR α é importante na regulação do metabolismo de ácidos graxos e também regula respostas inflamatórias com papel importante na aterosclerose. Esse receptor está intimamente envolvido nos efeitos de promoção de crescimento celular e hepatocarcinogenicidade dos proliferadores de peroxissomos (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000). Muitos dos efeitos agudos e crônicos dos proliferadores de peroxissomos são dependentes de PPAR α , incluindo regulação de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, proliferação de peroxissomos, hepatomegalia, alterações nos hepatócitos e indução de tumores hepáticos (CORTON *et al.*, 2014).

As proteínas PPAR exibem uma organização comum que consiste de quatro domínios: A/B, C, D e E. A região A/B é um domínio independente de ligante que é



responsável pela ativação da transcrição gênica. O domínio C codifica a região altamente conservada de ligação ao DNA - *DNA-binding domain* (DBD). O receptor se liga a regiões específicas do DNA chamadas de elementos responsivos a proliferadores de peroxissomos - *peroxissome proliferator response elements* (PPRE). A região E é o domínio de interação com o ligante - *ligand-binding domain* (LBD), sendo um domínio também importante para a dimerização, movimentação e associação do receptor a moduladores da transcrição, como coativadores e correpressores. A região D codifica uma alça flexível que permite o movimento do LBD independente do DBD (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000).

O PPAR α modula a expressão gênica de maneira similar a de outros receptores nucleares. Um mecanismo estático comumente descrito para a ação do PPAR α é de que, na ausência de ligante, o receptor se encontra na forma de heterodímero com o receptor retinoide X (RXR). O dímero se liga a PPREs, geralmente encontrados em promotores de genes regulados por PPAR α . A interação de um agonista com o PPAR α levaria à dissociação de correpressores e recrutamento da maquinaria transcrricional, levando ao aumento da transcrição de genes alvo que contenham PPRE. É claro o entendimento, no entanto, de que a regulação da expressão gênica é um processo muito mais dinâmico do que estático, sendo influenciado por diversos fatores, como níveis de expressão de PPAR α na célula, presença ou ausência de ligantes endógenos e exógenos e disponibilidade de cromatina para ligação do receptor (CORTON *et al.*, 2014).

Há correlação entre a habilidade do proliferador de peroxissomo de se ligar e ativar PPAR α com a sua potência como indutor de hepatocarcinogênese (CORTON; LAPINSKAS; GONZALEZ, 2000). Assume-se que a maioria dos ligantes age como agonista clássico de PPAR α , mas também há evidência de que alguns compostos podem requerer ativação metabólica para posteriormente ativar PPAR α , ou podem levar a aumento na disponibilidade de ligantes naturais de PPAR α , ativando-o secundariamente por perturbação da homeostase lipídica (CORTON *et al.*, 2014).

Dado o peso da evidência de que os proliferadores de peroxissomos induzem tumores em fígado de camundongos e ratos por um mecanismo dependente de PPAR α e que há esse receptor em humanos, é necessário considerar se humanos respondem ou não de maneira similar a esses roedores.

Dessa forma, é fundamental para a identificação do potencial carcinogênico dos proliferadores de peroxissomos o estabelecimento dos eventos-chave que levam à formação de tumores em roedores e a avaliação da possibilidade de ocorrência desses eventos em humanos. Ou seja, torna-se necessário o estabelecimento de um modo de ação (MOA) em animais para a carcinogenicidade dessas substâncias químicas e a análise da relevância desse MOA para humanos.

O MOA é uma explicação biológica plausível para um determinado efeito, baseada em dados experimentais e evidências robustas. É uma sequência biológica plausível de eventos-chave que levam ao efeito observado. É uma ferramenta analítica que auxilia, de forma transparente, na avaliação de dados disponíveis acerca de uma resposta biológica a uma substância. É uma etapa importante na caracterização do perigo de uma substância. O MOA é estabelecido para animais, com base em dados experimentais. Posteriormente evidencia-se a necessidade de expansão e de avaliação da relevância dos eventos-chave do MOA para humanos (BOOBIS *et al.*, 2006).

Um MOA para hepatocarcinogenicidade de proliferadores de peroxissomos foi proposto por Klaunig *et al.* (2003), sendo revisado por Corton *et al.* (2014). O MOA foi estruturado de modo a responder às três perguntas fundamentais articuladas no *International Life Sciences Institute/Risk Science Institute (ILSI/RSI) Human Relevance Framework (HRF)* para estabelecimento de MOAs (Figura 1) (KLAUNIG *et al.*, 2003; BOOBIS *et al.*, 2006; CORTON *et al.*, 2014). As discussões acerca dessas três perguntas serão detalhadas a seguir.

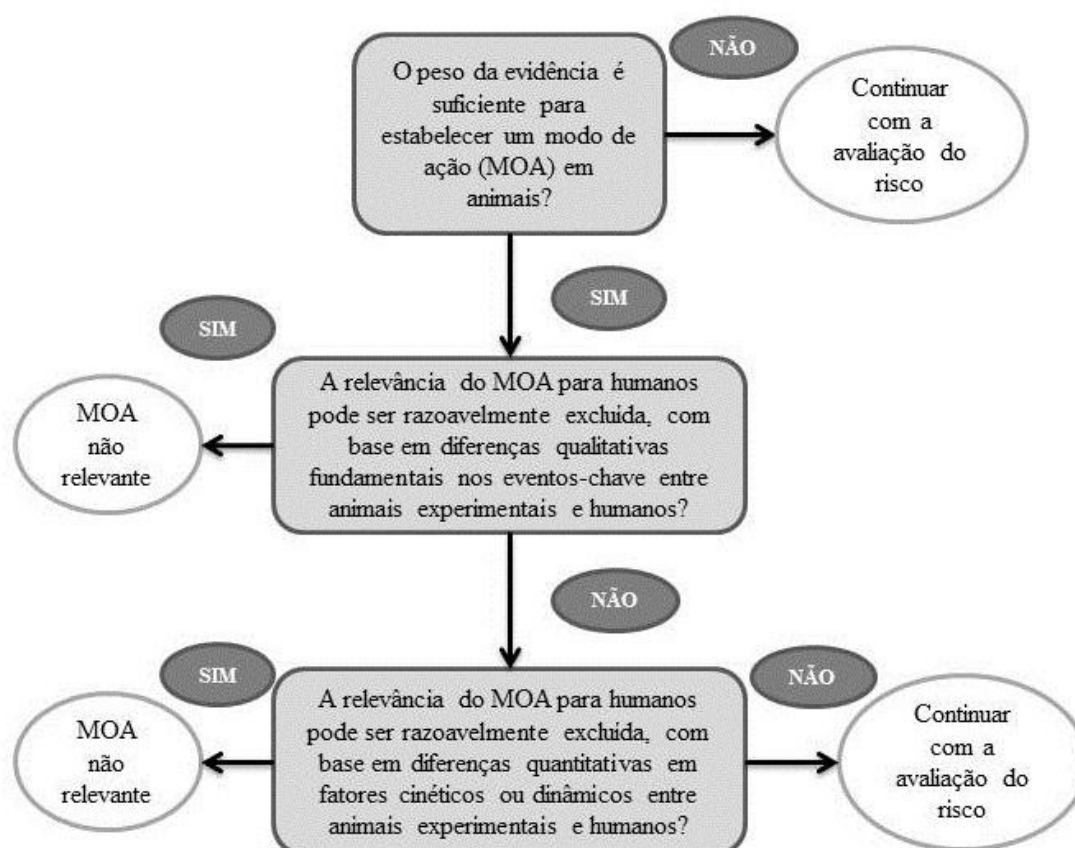


Figura 1. Três perguntas fundamentais articuladas no *International Life Sciences Institute Risk Science Institute (ILSI/RSI) Human Relevance Framework (HRF)* para o estabelecimento de um modo de ação (MOA). Ao se estabelecer um MOA e a sua relevância para humanos, deve-se responder a essas perguntas com respostas do tipo sim ou não, seguindo o fluxo do diagrama. As respostas que levam ao lado esquerdo do diagrama indicam que o peso da evidência sugere que o MOA não é relevante para



humanos. As respostas que levam para o lado direito indicam ou que o peso da evidência sugere que o MOA é relevante para humanos, ou que não é possível chegar a uma conclusão sobre a relevância do MOA para humanos, devido a incertezas nos dados disponíveis. (BOOBIS *et al.*, 2006; CORTON *et al.*, 2014).

A primeira pergunta do ILSI/RSI HFR é se o peso da evidência é suficiente para estabelecer um modo de ação em animais (BOOBIS *et al.*, 2006). O mecanismo preciso pelo qual se dá a formação de tumores no fígado pelos proliferadores de peroxissomos ainda não é bem estabelecido. No entanto, é possível identificar eventos-chave para o estabelecimento do MOA que leva à hepatocarcinogenicidade. O peso da evidência é substancial, consistente e coeso. Apesar da existência de lacunas, as incertezas identificadas não diminuem a base de dados significativa que suporta o MOA (KLAUNIG *et al.*, 2003; CORTON *et al.*, 2014).

Um consenso para o MOA, segundo Klaunig *et al.* (2003), seria:

1. Evento 1: Ativação de PPAR α .
2. Eventos 2a, 2b e 2c: Regulação da transcrição de genes envolvidos na proliferação de peroxissomos; no ciclo celular e apoptose; e no metabolismo de lipídeos, respectivamente.
3. Eventos 3a e 3b: Alteração na proliferação de peroxissomos; alteração na proliferação celular e apoptose.
4. Evento 4: Inibição das junções intercelulares de comunicação do tipo *gap*.
5. Evento 5: Aumento do dano macromolecular induzido por estresse oxidativo.
6. Evento 6: Ativação de células de Kupffer.
7. Evento 7: A supressão da apoptose, junto com a estimulação da proliferação celular, permite que células com DNA danificado persistam e proliferem, dando origem a focos pré-neoplásicos e, em última instância, a tumores, via posterior expansão clonal.

Os eventos 1 (ativação de PPAR α), 2b (transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose), 3b (alteração na proliferação celular e apoptose) e 7 (expansão clonal) seriam eventos causais, ou seja, eventos requeridos para a formação dos tumores. Os demais eventos seriam eventos associados, ou seja, eventos que ocorrem, mas que não necessariamente estão ligados de forma causal ao MOA.

Desde a publicação original do MOA proposto por Klaunig *et al.* em 2003, a literatura vem contribuindo com informações que dão suporte ao MOA (CORTON *et al.*, 2014). Em particular, estudos que examinam ativação de PPAR α , proliferação celular dependente de PPAR α e modelos de camundongos com PPAR α humano (PPAR α -



humanized mice) contribuíram bastante com o arcabouço científico para suporte ao MOA. No entanto, o MOA também já foi questionado com base em estudos empregando camundongos sem PPAR α (PPAR α -*null mice*) e PPAR α -*humanized mice* (GUYTON *et al.*, 2009).

Tanto as informações que suportam o MOA, como as publicações que o questionam, foram avaliadas e revisadas recentemente por Corton *et al.* (2014). Estudos mais recentes com camundongos geneticamente modificados, assim como um conhecimento mais detalhado do processo molecular envolvido na indução de câncer hepático e na ativação de PPAR α , justificaram essa reavaliação do MOA proposto por Klaunig *et al.* (2003). Membros da academia, governo, indústria e grupos de consultoria compartilharam suas opiniões científicas em um estudo de caso a fim de prover uma perspectiva multidisciplinar acerca do MOA para carcinogenicidade dos proliferadores de peroxissomos. De acordo com a revisão de Corton *et al.* (2014), o MOA seria composto pelos seguintes eventos:

1. Evento 1: Ativação de PPAR α .
2. Evento 2: Alteração na expressão de genes que regulam o crescimento celular.
3. Evento 3: A alteração desses genes que controlam o crescimento celular leva a aumento da proliferação celular e decréscimo da apoptose, sob condição de exposição aguda. Posteriormente, com a exposição crônica, há baixa na proliferação celular.
4. Evento 4: Expansão clonal de células iniciadoras para formar focos pré-neoplásicos.
5. Evento 5: Ocorrência de mutações e alterações epigenéticas nos focos, levando à formação de adenomas e carcinomas.

Para Corton *et al.* (2014), o aumento de estresse oxidativo, a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a inibição das junções intercelulares de comunicação do tipo *gap* seriam fatores moduladores do MOA. Fatores modulares são processos celulares ou teciduais que modulam os eventos-chave e que podem alterar a relação dose-resposta e a relação tempo-dependente entre eventos-chave e eventos associados. O efeito desses fatores moduladores pode ser tanto estimular como inibir o MOA. O aumento de estresse oxidativo, a ativação de NF- κ B e a inibição das junções *gap*, por sua vez, são influenciados pela ativação de células de Kupffer.

O grupo também identificou pelo menos dois eventos associados: regulação de genes que codificam enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios, responsáveis pelos efeitos hipolipidêmicos dos proliferadores de peroxissomos; regulação de peroxinas, genes envolvidos na biogênese e proliferação de peroxissomos.



A proliferação de peroxissomos seria, portanto, um evento associado ao MOA. Corton *et al.* (2014) inclusive substituem o tradicional termo “proliferadores de peroxissomos” por “ativadores de PPAR α ”, para denotar o papel central que o PPAR α tem na mediação dos efeitos pleiotrópicos da exposição a essas substâncias. A ativação do PPAR α é, inclusive, o primeiro evento-chave do MOA, sendo que a proliferação de peroxissomos é apenas um desses efeitos pleiotrópicos.

Visto que é, portanto, possível estabelecer um modo de ação para carcinogênese dos ativadores de PPAR α em animais, deve-se seguir à segunda pergunta do ILSI/RSI HFR, que indaga se os eventos-chave em animais são plausíveis em humanos.

De acordo com Klaunig *et al.* (2003) e Corton *et al.*, (2014), o peso da evidência sugere que os eventos-chave do MOA são plausíveis em humanos. Isso porque humanos possuem PPAR α em níveis suficientes para mediar respostas hipolipidêmicas a medicamentos da classe terapêutica dos fibratos (fenofibrato, gemfibrosil, ciprofibrato, etc.), que são ativadores de PPAR α . O PPAR α humano é comparável ao de camundongo e ao de rato na sua estrutura geral e na afinidade pelos ligantes. O fígado humano também é capaz de responder a substâncias que levam a alterações nas vias de crescimento celular e à perturbação do crescimento e sobrevivência celulares (KLAUNIG *et al.*, 2003; CORTON *et al.*, 2014).

Estudos anteriores não foram capazes de demonstrar relação entre ativação de PPAR α e aumento de tumor de fígado em humanos. No entanto, um ponto específico na cascata de eventos-chave de roedores em que a via seja biologicamente excluída em humanos também não pôde ser identificada (KLAUNIG *et al.*, 2003; CORTON *et al.*, 2014).

Já que os eventos-chave são passíveis de ocorrer em humanos, é necessário avaliar se, levando em consideração fatores cinéticos e dinâmicos, humanos responderiam da mesma forma que animais. Assim, é necessário seguir para a terceira pergunta do ILSI/RSI HFR, a saber: levando-se em consideração fatores cinéticos e dinâmicos, o MOA é plausível em humanos?

O peso da evidência sugere que, levando em consideração fatores cinéticos e dinâmicos, o MOA não é plausível em humanos, devido à existência de diferenças toxicodinâmicas significativas entre camundongos/ratos e humanos (KLAUNIG *et al.*, 2003; CORTON *et al.*, 2014).

Há extensa variabilidade nas respostas à ativação de PPAR α quando camundongos e ratos são comparados não só a humanos, mas também a outras espécies. Camundongos e ratos são sempre as espécies mais sensíveis, enquanto que cobaias, primatas não humanos e humanos são menos. Hamsters respondem, mas a resposta é menos robusta que a de camundongos e ratos (KLAUNIG *et al.*, 2003). Enquanto que camundongos e ratos respondem à ativação de PPAR α com o



desenvolvimento de câncer hepático, hamsters, cobaias, primatas do novo e do velho mundo e humanos geralmente não respondem com esse desfecho toxicológico (CORTON *et al.*, 2014).

A variabilidade na resposta aos proliferadores de peroxissomos se deve em parte à diferença no nível de expressão de PPAR α entre as espécies. Camundongos possuem três vezes mais RNA mensageiro de PPAR α do que hamsters, e dez vezes mais do que cobaias. Humanos exibem menos de 10% da expressão proteica de PPAR α em relação a camundongos e ratos (CORTON *et al.*, 2014).

Além disso, a ativação genética mediada por PPAR α em humanos e primatas não humanos produz apenas algumas das respostas observadas em camundongos e ratos. Os marcadores típicos da hepatocarcinogênese de roedores associada à exposição aos ativadores de PPAR α estão ausentes em humanos e outras espécies (incluindo hamsters, cobaias e macacos-cinomolgos), em doses comparáveis. Há mínimo ou ausente efeito na proliferação de peroxissomos, na alteração da atividade de enzimas peroxissomais, no aumento do estresse oxidativo e na ativação de NF- κ B em hepatócitos de humanos ou espécies substitutas de humanos. Não há, sobretudo, evidência de que o PPAR α humano regula genes envolvidos em crescimento celular. É evidente que o PPAR α humano regula genes envolvidos na homeostase lipídica em hepatócitos primários humanos e em *PPAR α humanized mice*. No entanto, PPAR α humano não regulou genes associados ao aumento da proliferação de hepatócitos em *PPAR α humanized mice*. Em estudos comparativos, hepatócitos humanos não responderam com aumento na proliferação celular, enquanto que estudos paralelos mostraram aumento na proliferação de hepatócitos de ratos (KLAUNIG *et al.*, 2003; CORTON *et al.*, 2014).

A evidência experimental sugere que as diferenças na ativação genética entre as espécies se devem a diferenças na estrutura do promotor e/ou na função dos genes alvo de PPAR α ; na sensibilidade do PPAR α em ser ativado; no nível de expressão do PPAR α inteiro ou de formas dominantes negativas de PPAR α , que são proteínas terminadas prematuramente como resultado de *splicing* alternativo; e na habilidade do PPAR α em alterar a expressão dos genes relacionados ao crescimento celular e apoptose (CORTON *et al.*, 2014).

Portanto, de maneira geral o peso da evidência sugere que, enquanto que o MOA para roedores pode ser plausível para humanos, existem diferenças toxicodinâmicas significativas entre camundongos/ratos e humanos, incluindo, principalmente, a falta de respostas observáveis de crescimento celular em doses similares, ou até mesmo em doses muito mais altas, de ativadores de PPAR α entre modelos de camundongos humanizados, hamsters, cobaias e hepatócitos primários de humanos (CORTON *et al.*, 2014).



2.2.3. Efeitos sobre a reprodução:

Estudos que avaliam efeitos reprodutivos em animais experimentais e sua possível relevância a humanos são de extrema complexidade, tendo em vista os inúmeros possíveis fatores internos e externos que podem exercer influência em todas as etapas da organogênese até a concepção, podendo afetar adversamente, e por vezes irreversivelmente, a saúde do recém-nascido, com impactos até a idade adulta.

Conforme já mencionado, a exposição a herbicidas do grupo difeniléter, no qual se insere o lactofem, induz a proliferação dos peroxissomos (CATTLEY, 2004). Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são membros da superfamília de 49 membros de receptores de hormônios nucleares ativados por ligantes que participam de muitas funções fisiológicas. Esta família de receptores atualmente compreende três isoformas designadas como PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , que têm sido identificadas em muitas espécies, incluindo sapos, roedores e humanos (YANG et al., 2008).

Diversos autores têm demonstrado o envolvimento dos PPARs na regulação do metabolismo lipídico e de carboidratos, na absorção de colesterol e seu transporte e no desenvolvimento embrionário e fetal, representando uma potencial ligação molecular entre a função reprodutiva e do metabolismo de carboidrato e lipídeos (NEPELSKA, 2014; NAKAJIMA et al., 2002).

O fato de que PPARs são também funcionalmente expressos no tecido fetal e em órgãos reprodutivos, incluindo útero, ovários e várias partes da placenta durante a gestação, sugere que esses receptores podem exercer papel crítico sobre a reprodução e desenvolvimento, além de sua ação na homeostase energética (KOMAR et al., 2001; FROMENT *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008; ABBOTT *et al.*, 2010; MATSUDA; KOBAYASHI; KITAGISHI, 2013; NISHIMURA *et al.*, 2011; BOGACKA & BOGACKI, 2011). Estudos efetuados com camundongos geneticamente modificados (*knockout*) têm revelado grande especificidade no que tange à estrutura química, na indução de efeitos reprodutivos dependente da expressão de PPAR (BRANNEN *et al.*, 2011). Contudo, estudos enfocando os possíveis efeitos reprodutivos do lactofem não têm demonstrado claro efeito adverso sobre os animais ensaiados, em doses onde não se observa toxicidade materna ou sistêmica.

No que tange os efeitos sobre a reprodução dos estudos aportados às autoridades regulatórias, a nota técnica da Fiocruz faz menção a um estudo de duas gerações conduzido em ratos, aportado ao Processo nº 25000.013372/97-79, referente ao produto Lactofem Técnico, da atual empresa Bayer S/A. A nota trata ainda de um estudo de multigeração que faz parte do dossiê de registro da U.S. EPA (U.S. EPA, 2000b). Além



desse, há também um terceiro estudo aportado à Anvisa e não mencionado na nota técnica da Fiocruz. Trata-se de um estudo de duas gerações que consta no dossiê do produto Lactofem Técnico Milenia, da atual empresa Adama Brasil S/A, processo nº 25351.007405/00-01.

No estudo da empresa Bayer (Quadro 08) foi observada toxicidade sistêmica no grupo da dose intermediária (500 ppm), evidenciada por aumento de peso do fígado em fêmeas da geração F1 e, no grupo da maior dose (2000 ppm), em ambas as gerações de animais adultos, sendo mais pronunciada na segunda geração (F1). A toxicidade parental, na maior dose, manifestou-se através de peso corpóreo reduzido, em relação ao grupo controle, nas fases de pré-acasalamento, gestação e lactação de ambas as gerações. Por outro lado, quanto ao ganho de peso corpóreo, diferença significativa (ganho de peso reduzido) foi observada somente na fase de pré-acasalamento, sendo que na fase de gestação da primeira geração (F0) e nas fases de gestação e lactação da segunda geração (F1) não foram encontradas diferenças em relação ao controle e, na fase de lactação da geração F0 houve aumento no ganho de peso em relação ao grupo controle. Além disso, efeitos atribuídos ao lactofem, na maior dose da geração F1, consistiram de elevada mortalidade, que acometeu 26,7% das fêmeas e 60% dos machos expostos (animais que morreram durante o estudo ou que foram sacrificados devido à condição moribunda), alterações histopatológicas do fígado, cujo peso médio foi significativamente maior em relação aos animais do grupo controle, além de alterações do peso de outros órgãos, como coração, cérebro, baço, rins e testículos. Com relação a esse aspecto, o reduzido peso dos rins observado não foi atribuído ao tratamento com lactofem pelo autor do estudo, sendo considerado consequência da diminuição do peso corpóreo.

As alterações histopatológicas hepáticas mencionadas consistiram de degeneração centrolobular e necrose, acompanhada por leucocitose observada nos sinusoides hepáticos e acúmulo de pigmento marrom (hemosiderina) em oito machos e seis fêmeas que morreram durante o estudo, aumento na incidência e severidade da proliferação do ducto biliar e infiltração periportal de células linfóides, além de hepatite multifocal com necrose (machos e fêmeas sacrificados ao final do estudo). Foram observados ainda em animais da maior dose da geração F1 aumento da incidência de hematopoiese extramedular no baço de 60% dos machos e 39% das fêmeas.

Efeitos sobre os órgãos reprodutivos consistiram de aumento do peso relativo dos testículos somente na maior dose da geração F1 e alterações histopatológicas em machos parentais, significativo somente na geração F1. Na geração F0 a incidência e distribuição das lesões observadas nos testículos (degeneração unilateral ou bilateral do epitélio germinativo) e epidídimo (oligospermia e aspermia unilateral ou bilateral) de animais dos diferentes grupos estudados indicaram não terem sido tais efeitos provenientes da ação



tóxica de lactofem. Na geração F1 foi encontrada maior incidência de degeneração/atrofia bilateral do epitélio germinativo e interrupção da maturação do epitélio germinativo dos testículos no grupo da maior dose, em relação aos demais grupos, porém, foi observado que os dois tipos de lesão não acometeram os mesmos animais e que tais alterações foram vistas somente em animais que morreram durante o estudo ou foram sacrificados devido à condição moribunda. Além disso, os efeitos encontrados nos testículos não afetaram a capacidade reprodutiva dos machos, visto que não foram encontradas diferenças significativas quanto aos índices de acasalamento e fertilidade entre os grupos estudados.

O índice de acasalamento em machos foi menor nos grupos da dose intermediária e maior dose da geração F1, em relação ao grupo controle, porém, sem significância estatística. Os valores encontrados para os índices de acasalamento foram os seguintes: dose de 2000 ppm: 75%; dose de 500 ppm: 66,7%; dose de 50 ppm: 95% e controle: 86,7%. A fim de avaliar a aparente inatividade sexual dos machos nesta geração (2 animais do grupo de 2000 ppm; 5 da dose de 500 ppm; 1 da dose de 50 ppm e 2 do grupo controle) foi conduzido estudo especial em que esses animais foram coabitados com fêmeas virgens, não expostas, até a copulação ou por 15 dias consecutivos. Foi observado que somente na dose intermediária (500 ppm) houve fertilização das fêmeas por quatro dos cinco machos, sendo que nenhum dos animais dos demais grupos fertilizaram as fêmeas. Assim, o desempenho reprodutivo dos machos “sexualmente inativos” do grupo de dose intermediária da geração F1 durante o estudo especial e o desempenho dos demais machos do mesmo grupo durante o estudo de reprodução demonstraram que 14 dos 15 machos foram férteis, resultando em índice de acasalamento comparável ao do grupo controle. A razão para o baixo desempenho sexual no grupo da dose intermediária, durante o estudo de reprodução, não ficou esclarecida.

Dentre os grupos de fêmeas não foram encontradas alterações dos órgãos reprodutivos nem diferenças quanto aos índices de acasalamento, fertilidade e gravidez ou quanto ao número total de filhotes nascidos e filhotes vivos, mostrando ausência de efeitos tóxicos também sobre a capacidade reprodutiva das fêmeas.

Quanto à descendência das gerações parentais F0 e F1 foi observado, na dose intermediária (500 ppm) da geração F1, peso corpóreo diminuído ao final da lactação (dia 21) em ambos os sexos e em machos selecionados para análise de peso dos órgãos. Esse efeito não foi visto na descendência F2 exposta à mesma dose. Já na dose mais elevada (2000 ppm), peso corpóreo diminuído foi encontrado em filhotes machos e fêmeas durante a fase de lactação em ambas as gerações (exceto no dia 4 da lactação na geração F1), assim como nos filhotes selecionados para análise de peso dos órgãos (machos e fêmeas da descendência F1 e em machos da descendência F2). Esse efeito foi



acompanhado de índice de sobrevivência reduzido dos filhotes F1 (21,1% menor nos dias 0-4 e 32,9% menor nos dias 4-21 da lactação) e F2 (10,4% menor nos dias 4-21 da lactação) e efeitos sobre o peso do cérebro, coração, rins, testículos e baço, com diminuição do peso do baço em ambas as gerações/sexos e diminuição do peso dos testículos em ambas as gerações, sendo que esse efeito não estava associado às alterações histopatológicas do órgão, de modo que tal efeito fosse atribuído à toxicidade do lactofem. Além disso, não houve diferença na proporção de filhotes machos e fêmeas, nascidos nas gerações F1 e F2.

Portanto, neste estudo, foi observado efeito tóxico parental sistêmico na dose intermediária (500 ppm), caracterizado por aumento do peso do fígado em fêmeas da geração F1 e, na maior dose (2000 ppm), afetando com maior severidade animais da geração F1, que além de peso corpóreo reduzido (efeito encontrado em ambas as gerações), apresentaram elevada mortalidade e alterações histopatológicas no fígado, testículos e baço, além de alteração do peso de alguns órgãos, incluindo aumento do peso do fígado, visto na dose intermediária. Por outro lado, a ação tóxica de lactofem não interferiu nos aspectos reprodutivos avaliados, uma vez que a incidência e distribuição das alterações encontradas sobre os órgãos reprodutivos masculinos, dentre os grupos em estudo, não sustentam ação tóxica da substância em reavaliação nem foram afetados significativamente os índices de acasalamento, reprodução e gravidez. Deve-se ressaltar que o protocolo experimental disponível na ocasião do estudo (“Two-Generation Reproduction Toxicity Study” - OECD 416, de 26/05/1983) não previa a análise de alguns parâmetros reprodutivos preconizados nos protocolos experimentais atuais, tais como espermátides resistentes a homogeneização, reserva de esperma da cauda do epidídimo, motilidade e morfologia do esperma, de forma que tais análises não foram contempladas no estudo em discussão, o que contribuiria para subsidiar conclusões a respeito dos aspectos reprodutivos.

Adicionalmente, cabe destacar que a toxicidade materna, em ambas as gerações dos grupos de maior dose, no que diz respeito ao peso corpóreo, não foi confirmada através dos dados de ganho de peso corpóreo, que foi comparável ao controle nas fases de gestação e lactação e até mesmo superior ao controle, durante o período de lactação da geração parental, sugerindo ausência de efeito tóxico da substância sobre tal parâmetro, neste sexo.

Com relação à toxicidade sobre o desenvolvimento, observou-se efeito sobre a descendência exposta à dose intermediária (500 ppm), com peso corpóreo diminuído dos filhotes da geração F1 e, na descendência exposta à maior dose, afetando peso corpóreo, diminuindo o índice de sobrevivência dos filhotes das gerações F1 e F2 e alterando peso dos órgãos. Por outro lado, considera-se que o efeito encontrado na dose mais baixa (50



ppm) pode não estar relacionado à ação tóxica de lactofem: o índice de sobrevivência diminuído não foi observado na dose subsequente (dose intermediária, 500 ppm) nem na descendência F2 de animais expostos a esta concentração. Parâmetros adicionais como tempo de abertura vaginal e separação prepucial dos filhotes, de importância para avaliação do desenvolvimento reprodutivo e, previstos em protocolos experimentais publicados posteriormente à condução do estudo analisado, não foram avaliados, assim como não foram apresentados resultados dos índices de nascimento, viabilidade e lactação, também previstos em protocolos experimentais mais recentes. Não foram apresentados dados de NOAEL no estudo analisado.

Com base nos dados disponibilizados conclui-se que, no presente estudo, lactofem apresentou toxicidade sistêmica aos animais parentais na dose intermediária e maior dose, assim como na descendência de ambas as gerações. Por outro lado, lactofem não interferiu nos aspectos reprodutivos das gerações estudadas.

Com relação ao estudo de multigeração em ratos mencionado na nota técnica da Fiocruz, foi identificado que esse estudo faz parte do dossiê de registro da U.S. EPA, conforme já mencionado. Esse estudo não foi aportado à Anvisa e, portanto, não é possível realizar uma análise minuciosa dos dados. A Anvisa, como todo o público, possui acesso somente ao próprio relatório da U.S. EPA, que apresenta uma descrição resumida do referido estudo (U.S. EPA, 2000b). Verifica-se que o estudo foi conduzido com as doses de 0, 50, 500 e 2000 ppm. Foram observados na geração parental, com a maior dose, efeitos como: morte; redução de peso corporal e de ganho de peso corporal; aumento no peso do baço e fígado; aumento de lesões microscópicas no baço e fígado; aumento do número de ninhadas com fetos mortos ao nascimento; aumento do peso dos testículos; aumento da incidência de degeneração bilateral ou parada na maturação do epitélio germinativo dos testículos; degeneração centrolobular hepatocítica; necrose no fígado e hematopoiese extramedular no baço. No grupo dos filhotes expostos à maior dose foi observado: redução de peso; diminuição da sobrevivência; diminuição do peso dos testículos; diminuição dos pesos do cérebro, baço e fígado. A U.S. EPA comenta que é digno de nota que esses efeitos são observados no mesmo nível de dose em que se observa mortalidade e decréscimo de fertilidade nos grupos parentais. Foi estabelecido um NOAEL de 2,6 mg/kg/dia e um LOAEL de 26,2 mg/kg/dia.

Os resultados do estudo de duas gerações conduzido com o produto Lactofem Técnico Milenia estão detalhados no Quadro 08. O produto foi administrado por via oral (incorporado à dieta) nas doses de 0, 50, 200 e 800 ppm a ratos machos e fêmeas.

Não foram observados efeitos tóxicos com a dose de 50 ppm. Já com as doses de 200 e 800 ppm, foram observados efeitos que evidenciam toxicidade sistêmica, como reduções de peso absoluto e de ganho de peso corporal em praticamente todas as



gerações, em várias etapas do desenvolvimento; e redução no consumo de ração pelas fêmeas das gerações P e F1, durante os períodos de amamentação. Essas alterações foram mais pronunciadas na maior dose.

Na dose de 800 ppm observou-se ainda aumento do peso relativo do fígado de fêmeas P e redução do peso relativo do fígado de machos F1, além de efeitos tóxicos no desenvolvimento reflexológico dos filhotes, como atraso no reflexo postural dos filhotes machos e fêmeas F1, atraso no reflexo de geotaxia negativa dos filhotes fêmeas F1 e atraso no andar dos filhotes machos F1 e F2. Também foi observado aumento no número de filhotes F1 mortos durante a amamentação, sendo que esse efeito não foi reproduzido na geração F2. Por se tratar da maior dose utilizada no ensaio, esses efeitos são consistentes, indicando evidente toxicidade materna e sistêmica.

Com relação aos efeitos nos órgãos reprodutivos, foi observada redução significativa no peso absoluto do testículo/epidídimo esquerdo e direito na maior dose para a geração F1, quando comparada ao controle (aproximadamente 12% de redução no testículo esquerdo e 11% no testículo direito). O peso relativo do testículo/epidídimo esquerdo aumentou aproximadamente 8% na geração F1 com a dose de 800 ppm, sendo que o peso relativo do testículo direito não variou significativamente. Esses efeitos não foram replicados na geração F2.

Nota-se, no entanto, que o peso dos testículos foi apresentado juntamente com o peso dos epidídimos, o que prejudica a análise do efeito observado. O peso dos testículos varia apenas modestamente dentro de uma dada espécie. Essa variação relativamente baixa entre os animais sugere que o peso absoluto dos testículos é um preciso indicador de injúria das gônadas. Aumento ou redução significativa dessa variável pode indicar efeito adverso (U.S. EPA, 1996c). Já o peso da próstata, próstata ventral, vesículas seminais e epidídimos, ao contrário do peso dos testículos, são medidas não tão conservadas (MARTY; JOHNSON; CARNEY, 2003).

No estudo apresentado, observa-se ainda redução no peso absoluto e no ganho de peso das ninhadas e dos machos F1 com a dose de 800 ppm. Essas reduções foram bastante significativas, sendo que o ganho de peso das ninhadas F1, durante a amamentação, foi aproximadamente 27% menor no grupo da dose de 800 ppm, quando comparado ao controle. Já nos machos F1, durante o crescimento, houve redução de 15% no ganho de peso do grupo da maior dose, quando comparado ao controle.

A interpretação dos dados sobre o peso dos órgãos sexuais masculinos pode ser problemática quando há também alteração do peso corporal ou do ganho de peso corporal dos animais (MARTY; JOHNSON; CARNEY, 2003). O impacto dessas alterações no crescimento e no peso dos órgãos sexuais ainda não é claramente estabelecido. Em baterias de estudos para detecção de compostos químicos desreguladores endócrinos,



alterações nos pesos de órgãos reprodutivos ou glândulas sexuais acessórias podem ser desfechos toxicológicos importantes. No entanto, se mudanças no peso corporal confundem a interpretação dos *endpoints* dos ensaios, os agentes químicos podem ser falsamente designados como desreguladores endócrinos ou os efeitos endócrinos mediados por esses agentes podem ser mascarados pela coincidência com os efeitos no peso corporal. Entender esse relacionamento é crítico, pois um decréscimo de 10% no peso corporal pode ser utilizado como critério para selecionar a dose mais alta a ser usada no ensaio (MARTY; JOHNSON; CARNEY, 2003). Estudos em que houve alteração de 15% no peso corporal de ratos mostraram alterações no peso da próstata ventral, epidídimo e vesícula seminal. O peso dos testículos, no entanto, permaneceu inalterado (STOKER *et al.*, 2000). Outro estudo mostra redução do peso absoluto e aumento do peso relativo dos epidídimos em ratos que passaram por restrição alimentar, apresentando redução de 10% no peso corporal (MARTY; JOHNSON; CARNEY, 2003). Portanto, se há depressão severa do peso corporal ou debilitação sistêmica severa, deve ser notado que o efeito adverso no *endpoint* reprodutivo específico ocorreu, mas o efeito pode ter resultado de um efeito tóxico mais generalizado (U.S. EPA, 1996c).

Dessa forma, os dados obtidos no estudo não permitem afirmar que houve um padrão consistente de ação androgênica nos ratos tratados com o lactofem técnico. O efeito verificado no testículo/epidídimo, por ter ocorrido somente na maior dose, apenas na geração F1 e com a concomitante alteração no peso corporal e no ganho de peso, não gera grandes preocupações quanto ao perigo do lactofem para humanos.

Ressalta-se que o estudo aportado apresenta algumas limitações que prejudicam sua análise. Não foram apresentados os dados brutos dos pesos individuais de cada animal em cada dia de observação, o que prejudica uma avaliação mais criteriosa entre as alterações no peso dos testículos e peso corporal.

Em relação à avaliação do início da puberdade, foi verificado pequeno atraso, porém significativo, no dia de ocorrência de abertura vaginal com as doses de 200 e 800 ppm para a geração F1, quando comparada ao controle (atraso de 1,55 dia para a dose de 200 ppm e de 2,53 dias para a dose de 800 ppm). Na geração F2 não foi observado atraso nesse parâmetro com a dose de 200 ppm, mas foi observado atraso com a dose de 800 ppm (2,44 dias). Também foi observado pequeno atraso, porém significativo, no dia de descida dos testículos com a dose de 800 ppm para a geração F1 (atraso de 0,57 dia). Tal ocorrência não foi repetida para a geração F2.

Em estudos experimentais com camundongos e ratos fêmeas, a idade de ocorrência da abertura vaginal é o marcador mais comum de início da puberdade, sendo que o atraso nessa ocorrência pode ser um efeito reprodutivo importante (U.S. EPA, 1996c). No entanto, esse parâmetro pode variar em função de diversos fatores que não



somente a exposição a uma determinada substância. O desenvolvimento e crescimento pós-natal são críticos para o início da puberdade (ROMANO *et al.*, 2015). Estudos em animais demonstram que a nutrição pré-puberdade, juntamente com o ganho de peso e com a porcentagem de gordura corporal, afetam a maturação reprodutiva, podendo promover puberdade precoce ou retardada. Ratas forçadas a consumir dieta rica em gordura, que aumenta o consumo calórico e o peso corporal, mostraram início da puberdade entre os dias 32 a 33, sendo que ratas em dieta com baixo consumo de gordura mostraram início da puberdade entre os dias 37 a 39 (LEIBOWITZ *et al.*, 2009). É importante observar o peso corporal na puberdade, pois o peso corporal pode prover uma forma de separar atrasos específicos na puberdade daqueles relacionados a atrasos gerais no desenvolvimento (U.S. EPA, 1996c).

No estudo conduzido com o Lactofem Técnico Milenia, foram observadas reduções no peso absoluto e no ganho de peso das ninhadas, durante a amamentação, e das fêmeas, durante o crescimento. Dessa forma, o atraso na ocorrência da abertura vaginal pode estar relacionado ao próprio atraso no desenvolvimento do animal e não à exposição ao lactofem. Cabe ressaltar, no entanto, que o estudo apresenta limitações. Não foram apresentados no relatório do estudo os dados brutos dos pesos individuais de cada animal em cada dia de observação, o que poderia auxiliar no estabelecimento de uma relação mais clara entre a diminuição do peso corporal e o atraso observado no dia de ocorrência de abertura vaginal.

Em machos, os marcadores mais comuns de início de puberdade são deslocamento do prepúcio e aparência dos espermatozoides (U.S. EPA, 1996c). No entanto, esses parâmetros não foram avaliados no estudo conduzido com o Lactofem Técnico Milenia. Foi apenas avaliado o dia de descida dos testículos, sendo que houve atraso de menos de um dia (0,57 dias) nesse parâmetro na dose de 800 ppm para a geração F1, não sendo esse efeito um efeito robusto que indique efeito adverso reprodutivo do ingrediente ativo.

Os dados apresentados, portanto, não são suficientemente robustos para que seja determinado um padrão de efeitos sobre a reprodução para o ingrediente ativo lactofem.

Foi possível estabelecer um NOEL de 50 ppm, equivalente a aproximadamente 2,5 mg/kg/dia, sendo o LOEL de 200 ppm, ou aproximadamente 25 mg/kg/dia.



Quadro 08. Análise dos estudos reprodutivos dos dossiês dos produtos técnicos do ingrediente ativo Lactofem

REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO								
Produto (Processo)	Ensaio	Espécie, linhagem e número de animais	Via e período de exposição	Pureza	Doses	Resultados relevantes	NOAEL	Referência
Lactofem Técnico - Bayer (25000.013 372/97-79)	A Two-Generation Reproduction Study in Rats with PPG-844 (82-2638).	- Ratos Charles River CD® - 15 machos/grupo - 30 fêmeas/grupo	- Oral (dieta) - Geração F0: administração contínua durante 14 semanas antes do acasalamento e durante todo o período de acasalamento, gestação e lactação. Todos os animais F0 foram sacrificados após o desmame da geração F1. - Geração F1: após o desmame, continuaram com o tratamento durante o crescimento, acasalamento, gestação e lactação.	Pureza não determinada (assumiu-se ser de 100%)	Parentera 1, F1 e F2: 0, 50, 500 e 2000 ppm	<p>Efeitos parentais</p> <p>Geração F0:</p> <p><u>Concentração 50 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - não houve mortes; - 2 ♀ perderam toda a ninhada; <p><u>Concentração 500 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Mortalidade: 1/15 ♂ <p><u>Concentração 2000 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Mortalidade: 1/30 ♀ (juntamente com toda a ninhada - 11 filhotes, durante o período pós-parto); - 10 ♀ perderam toda a ninhada; - ↓ peso corpóreo (semanas 2-14) e ↓ ganho de peso corpóreo (semanas 0-14) – fase de pré-acasalamento (♂); - ↓ peso corpóreo nas semanas 9-14 (fase de pré-acasalamento); na gestação e; dos dias 1-4 da lactação; ↓ ganho de peso corpóreo nas semanas 0-14 (fase de pré-acasalamento); sem diferenças durante a gestação e; ↑ ganho de peso na fase de lactação (♀) - Não houve efeito sobre consumo de alimentos; - Não houve alterações histopatológicas macroscópicas ou microscópicas relacionadas à exposição. <p>Geração F1:</p> <p><u>Concentração 50 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - não houve mortes relacionada à substância teste; - 1 ♀ perdeu toda a ninhada; - ↑ peso relativo do baço (♀) <p><u>Concentração 500 ppm:</u></p>	Não apresentado	SCHROEDER; DALY, 1983



					<p>- Mortalidade: 2/30 ♀ (01 durante a fase de pós-lactação da ninhada F1 e 01 durante o intervalo pós-acasalamento); não houve mortalidade entre os machos; - 1 ♀ perdeu toda a ninhada; - ↑ peso relativo do fígado (♀);</p> <p><u>Concentração 2000 ppm:</u></p> <p>- Mortalidade: 8/30 (26,7%) ♀ e 9/15 (60%) ♂ - ↓ peso corpóreo (semanas 25-41) - fase de pré-acasalamento; gestação e lactação (exceto no dia 4); ↓ ganho de peso corpóreo na fase de crescimento (semanas 25-41); sem diferença durante a gestação e lactação; - Não houve efeito sobre consumo de alimentos; - ↓ peso corpóreo final (♂ e ♀); - ↓ peso absoluto do coração (♀) e rins (♂ e ♀) - ↑ peso absoluto do fígado e baço (♀); - ↑ peso relativo do fígado, baço e cérebro (♂ e ♀) e testículos (♂)</p> <p>- Alterações histopatológicas:</p> <p>- <u>fígado</u>: degeneração centrolobular hepática e necrose, leucocitose nos sinusoides hepáticos, acúmulo de pigmento marrom (hemosiderina) (8 ♂ e 6 ♀ que morreram durante o curso do estudo); ↑ incidência e severidade da proliferação do ducto biliar e infiltração periportal de células linfóides; hepatite multifocal com necrose (♂ e ♀ que sacrificados ao final do estudo); - <u>baço</u>: ↑ incidência de hematopoiese extramedular (9/15 ♂ e 7/18 ♀); - <u>testículos</u>: degeneração bilateral ou interrupção da maturação do epitélio germinativo (07 ♂ que morreram ou foram sacrificados in extremis durante o estudo);</p> <p>Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto aos índices de acasalamento, fertilidade e gravidez.</p> <p>O número de filhotes vivos e o número total de filhotes nascidos foram comparáveis entre os grupos.</p> <p><u>Efeitos sobre a prole</u></p> <p><u>Filhotes F1:</u></p> <p><u>Concentração 50 ppm:</u></p> <p>- 2 ninhadas inteiras morreram; - ↓ Índice de sobrevivência dos filhotes (5,8% menor nos dias 0-4 e 13,2% menor nos dias 4-21 da lactação);</p>		
--	--	--	--	--	---	--	--



						<p><u>Concentração 500 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - não houve perda de ninhadas; - ↓ peso corpóreo no final da lactação (dia 21, sacrifício) (♂ e ♀); - ↓ peso corpóreo final (♂ selecionados para análise de peso dos órgãos); - ↓ peso absoluto do coração, fígado, rins e baço (♂); - ↑ peso relativo do coração (♀) <p><u>Concentração 2000 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 ninhadas inteiras morreram; - ↓ peso corpóreo durante toda a lactação (dias 0, 4, 14 e 21) (♂ e ♀); - ↓ Índice de sobrevivência dos filhotes (21,1% menor nos dias 0-4 e 32,9% menor nos dias 4-21 da lactação); - ↓ Índice de sobrevivência das ninhadas (60%) - ↓ peso corpóreo final (♂ e ♀ selecionados para análise de peso dos órgãos); - ↓ peso absoluto do coração, fígado, rins, baço e testículos (♂); ↓ peso absoluto do cérebro e baço (♀); - ↑ peso relativo do cérebro, coração (♂ e ♀); ↑ peso relativo do fígado (♀); ↓ peso relativo do baço (♀). <p>Filhotes F2:</p> <p><u>Concentração 50 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 ninhada inteira morreu; <p><u>Concentração 500 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 ninhada inteira morreu; - ↓ peso absoluto e relativo do baço (♀); <p><u>Concentração 2000 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - não houve perda de ninhadas; - ↓ peso corpóreo durante a lactação (dias 0, 14 e 21) (♂ e ♀); - ↓ Índice de sobrevivência dos filhotes (10,4% menor nos dias 4-21); - ↓ peso corpóreo final (♂ selecionados para análise de peso dos órgãos); - ↓ peso absoluto rins, testículos e baço (♂); ↓ peso absoluto baço (♀) - ↓ peso relativo do baço (♂ e ♀); - ↑ peso relativo do cérebro (♂); ↑ peso relativo do coração; (♀) <p>A proporção de filhotes fêmeas e machos nas ninhadas F1 e F2 foi semelhante entre os grupos estudados.</p>		
Lactofem Técnico	Toxicidade Reprodutiv	- Ratos Wistar - 40/sexo/dose	- Oral (dieta)	611,6 g/L	0, 50, 200 e 800	Geração P:	Materno: 50 ppm	OLIVEIRA, 2000



<p>Milena (25351.007 405/00-01)</p>	<p>a do Lactofen Técnico de Ratos Wistar (Rattus norvegicus) em Duas-Gerações (G22.05/99).</p>		<p>- Geração P: os machos receberam a ração com a substância teste por 10 semanas (1 ciclo espermatogênico completo - aproximadamente 70 dias), e as fêmeas, por 3 semanas (vários ciclos estrais completos - 21 dias). Após esse período, ocorreram os cruzamentos para produção da geração F1. A ração continuou a ser fornecida durante os cruzamentos, períodos de gestação e amamentação.</p> <p>- Geração F1: recebeu a ração com a substância teste durante o seu crescimento e desenvolvimento, por 10 semanas. Houve o cruzamento da geração F1 para a produção da geração F2. A substância teste continuou a ser</p>	<p>ppm</p>	<p>50 ppm: - Não foram observados efeitos.</p> <p>200 ppm: - ↓ no peso absoluto (♂: dia 0 a 14, e 28; ♀: dia 13, durante a gestação); - ↓ do peso absoluto materno (dias 12, 18 e 21); - ↓ no consumo de ração (♀: dia 9 a 15, durante a amamentação)</p> <p>800 ppm: - ↓ no peso absoluto (♂: dia 0 a 70; ♀: dia 9 a 20, durante a gestação); - ↓ do ganho de peso durante a pré-exposição (♀); - ↓ do peso absoluto materno durante a amamentação (dia 0 a 21); - ↓ do peso na necropsia (♀); - ↓ do ganho de peso durante a gestação; - ↓ do ganho de peso materno durante a amamentação; - ↓ no consumo de ração (♀: dia 3, durante a pré-exposição); - ↑ no peso relativo do fígado (♀).</p> <p>Geração F1:</p> <p>50 ppm: - Não foram observados efeitos.</p> <p>200 ppm: - ↓ no peso absoluto das ninhadas (dia 6 a 21, durante a amamentação); - ↓ no ganho de peso das ninhadas, durante a amamentação; - ↓ no peso absoluto (♀: dia 28 a 56; ♂: dia 21 a 40, durante o crescimento); - ↓ no consumo de ração materno (dia 12 e 15, durante a amamentação); - ↑ no dia de ocorrência para a abertura vaginal; - ↑ no dia de ocorrência para o aparecimento de penugem.</p> <p>800 ppm: - ↓ no peso de filhotes por ninhada; - ↓ no peso da ninhada no dia de concepção; - ↓ no peso absoluto das ninhadas (dia 6 a 21, durante a amamentação); - ↓ no ganho de peso das ninhadas durante a amamentação; - ↓ no peso absoluto (♀ e ♂: dia 21 a 91, durante o crescimento); - ↓ no ganho de peso (♀ e ♂, durante o crescimento); - ↓ no peso absoluto durante a gestação (dia 0 a 20); - ↓ no ganho de peso durante a gestação; - ↓ no peso absoluto materno no dia da concepção; - ↓ no peso corrigido materno no dia da concepção. - ↓ no peso absoluto na necropsia (♂); - ↓ no peso absoluto materno durante a amamentação (dia 0 ao 21);</p>	<p>(aproximadamente 2,5 mg/kg p.v/dia)</p> <p>Reprodutivo: 50 ppm (aproximadamente 2,5 mg/kg p.v/dia)</p> <p>Desenvolvimento: 50 ppm (aproximadamente 2,5 mg/kg p.v/dia)</p>	
--	--	--	--	------------	---	--	--



			administrada durante os cruzamentos e produção da geração F2 até o desmame.			<ul style="list-style-type: none">- ↓ no ganho de peso materno durante a amamentação;- ↓ no consumo de ração (♀: dia 28 e 35; ♂: dia 35 e 42);- ↓ no consumo de ração materno (dia 12 e 25);- ↓ no peso absoluto do testículo/epidídimo esquerdo e direito;- ↑ no peso relativo do testículo/epidídimo esquerdo;- ↓ no peso relativo do fígado (♂);- ↑ no dia de ocorrência para abertura vaginal;- ↑ no dia de ocorrência para descida dos testículos;- ↑ no dia de ocorrência parareflexo postural (♀ e ♂);- ↑ no dia de ocorrência para geotaxia negativa (♀);- ↑ no dia de ocorrência para o andar (♂). <p><u>Geração F2:</u></p> <p><u>50 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Não foram observados efeitos. <p><u>200ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- ↓ no peso absoluto das ninhadas (dia 0 a 21, durante a amamentação). <p><u>800 ppm:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- ↓ no peso da ninhada total no dia da concepção;- ↓ no peso absoluto das ninhadas (dia 3 e 9 a 21, durante a amamentação)- ↓ no ganho de peso das ninhadas durante a amamentação;- ↑ no dia de ocorrência para aparecimento de penugem;- ↑ no dia de ocorrência para abertura vaginal;- ↑ no dia de ocorrência para o andar (♂).		
--	--	--	---	--	--	--	--	--



3 - CONCLUSÕES:

Com base na análise efetuada dos dossiês dos pleitos de registro de produtos à base de lactofem aportados à Anvisa, da literatura e da Nota Técnica da Fiocruz, foi possível chegar às conclusões a seguir.

3.1. Quanto à mutagenicidade/carcinogenicidade:

- i. O lactofem não possui potencial mutagênico ou genotóxico, tanto *in vitro* como *in vivo*, em diversos sistemas testados;
- ii. O lactofem possui potencial carcinogênico (epigenético) em roedores, em doses elevadas, sendo o órgão-alvo o fígado;
- iii. Os hepatocarcinomas formados são consistentes com o MOA via ativação de PPAR α ;
- iv. A expressão de PPAR α no fígado de espécies primatas, incluindo humanos, é consideravelmente menor que no fígado de roedores. Além disso, há diferenças interespecies quanto aos efeitos resultantes da ativação de PPAR α ;
- v. Há mínimo ou nenhum efeito na proliferação de peroxissomos, na alteração da atividade de enzimas peroxissomais, no aumento do estresse oxidativo e na ativação de NF- κ B em hepatócitos de humanos ou espécies substitutas de humanos;
- vi. Não há evidência de que o PPAR α humano regule genes envolvidos em crescimento celular; e
- vii. O avanço no conhecimento a respeito dos diversos MOAs toxicológicos operantes nos organismos vivos, com ênfase nas análises de correlação interespecies, permitiu à comunidade científica internacional estabelecer, com elevado nível de confiança, a insignificante relevância do MOA via PPAR α a primatas em geral, incluindo humanos.

3.2. Quanto aos efeitos sobre a reprodução:

- i. Observou-se escassez de estudos visando este *endpoint* (desfecho toxicológico) envolvendo lactofem, tanto na literatura como nos dossiês apresentados pelas empresas requerentes;
- ii. Em roedores, a ativação de PPAR induz a redução do transporte de colesterol, que leva à redução na síntese hormonal, gerando redução dos



- níveis dos hormônios que conduz a uma toxicidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmeas;
- iii. O modo de ação pode ser, em tese, relevante para espécies primatas, incluindo humanos, uma vez que ocorre expressão do PPAR em órgãos reprodutivos, como ovários e testículos;
- iv. A significância biológica e a relevância do MOA via PPAR para primatas em geral, incluindo humanos, ainda não foi estabelecida;
- v. A existência e/ou significância de diferenças qualitativas fundamentais nos eventos-chaves e/ou diferenças quantitativas em fatores cinéticos ou dinâmicos entre animais e humanos para os efeitos reprodutivos permanecem desconhecidas;
- vi. Dos estudos aportados à Anvisa, pode-se afirmar que:
- Efeitos sobre os aspectos reprodutivos foram vistos somente na maior dose e com maior frequência na geração f1;
 - Os efeitos ocorreram simultaneamente a alterações sistêmicas na geração paterna, atribuídas à ação tóxica de lactofem;
 - Portanto, não há como afirmar, assertivamente, a respeito da toxicidade reprodutiva de lactofem.
- vii. Ainda sobre os estudos aportados à Anvisa, ambos foram conduzidos com base em protocolos experimentais que não previam análise de alguns parâmetros reprodutivos preconizados nos protocolos atuais. Além disso, no primeiro estudo relatado não foi estabelecido NOEL/NOAEL e/ou LOEL/LOAEL para os efeitos observados;
- viii. Os revisores da U.S. EPA estabeleceram os valores de NOEL/NOAEL e/ou LOEL/LOAEL para os efeitos reprodutivos observados com o ingrediente ativo lactofem;
- ix. Não é possível inferir-se, com base nos estudos avaliados, e considerando-se o escasso conhecimento sobre o MOA reprodutivo, que o lactofem poderia afetar adversamente parâmetros reprodutivos em humanos.

Cabe ressaltar que produtos técnicos e formulados à base deste ingrediente ativo possuem situação regular de registro, ou seja, tiveram sua análise efetuada pela Anvisa e demais órgãos de registro, cumprindo com todos os requisitos técnicos e legais na ocasião. Ademais, um dos produtos técnicos do lactofem foi reanalisado pela Anvisa em 2007, por conta de pendências quanto aos estudos de cinco bateladas a serem realizados para gerar a composição quali-quantitativa do produto. A Anvisa aproveitou a oportunidade



para analisar o dossiê completo de estudos agudos e crônicos do produto, inclusive solicitando estudos que não haviam sido apresentados no pleito original de registro, tendo em vista que, à época do registro, havia a possibilidade de a empresa requerente apresentar dados de literatura a respeito dos efeitos crônicos, para embasar o pleito (ANVISA, 2000). O produto em questão foi deferido, tendo sido elaborada nota técnica elencando e sumarizando as conclusões de análise de cada estudo agudo e crônico, conforme acima referido. Neste sentido, importante destacar que, a partir daquela época até o presente, não surgiram fatos novos envolvendo a toxicologia do ingrediente ativo lactofem, que pudessem ensejar uma revisão do deferimento efetuado em 2007.

Portanto, a Anvisa considera que este processo de reavaliação não possui subsídios suficientes, neste momento, para uma decisão regulatória de suspensão de registro dos produtos à base de lactofem no país. A Anvisa entende que, à luz do conhecimento científico atual envolvendo carcinogenicidade e efeitos reprodutivos do lactofem, não há embasamento técnico suficiente que possa fundamentar a evocação ao Princípio da Precaução, no sentido de propor-se maiores restrições de uso deste ingrediente ativo. Potenciais perigos ou riscos à saúde humana não puderam ser caracterizados na presente reavaliação toxicológica efetuada.

Finalmente, a Anvisa julga oportuno acompanhar o desenvolvimento dos estudos da Fase I do Programa de Triagem de Desreguladores Endócrinos da U.S. EPA (*Endocrine Disruptor Screening Program - Tier 1*) a serem realizados com o lactofem (U.S. EPA, 2014b), cujos resultados poderão trazer indicativos quanto ao potencial reprotóxico da substância por um mecanismo de desregulação endócrina.



REFERÊNCIAS

ABBOTT, B. D.; WOOD, C. R.; WATKINS, A. M.; DAS, K. P.; LAU, C. S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Alpha, Beta, and Gamma mRNA and Protein Expression in Human Fetal Tissues. *PPAR Research*, p. 1-19, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 165, de 29 de agosto de 2003. Monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, n. 169, p. 48, de 02 de setembro de 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos>>. Acesso em 04 ago 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE nº 104, de 17 de agosto de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, n. 161, p. 43, de 21 de agosto de 2000. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=43&data=21/08/2000>>. Acesso em 05 ago 2015.

APVMA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Active constituents (at 19 Feb. 2014). Disponível em: <http://apvma.gov.au/sites/default/files/docs/approved_actives_a-z_19-02-2014.pdf>. Acesso em 01 out 2015.

BOGACKA, I.; BOGACKI, M. The quantitative expression of peroxisome proliferator activated receptor (ppar) genes in porcine endometrium through the estrous cycle and early pregnancy. *J. Physiol. Pharmacol.*, 62(5): 559-565, 2011.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 543, 3, 251-272, 2003.

BOOBIS, A. R.; COHEN, S. M.; DELLARCO, V.; MCGREGOR, D.; MEEK, M.E.; VICKERS, C. WILLCOCKS, D.; FARLAND W. IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 781-792, 2006.

BRANNEN, K. C.; FENTON, S. E.; HANSEN, D. K.; HARROUK, W.; KIM, J. H.; SHUEY, D. Developmental Toxicology - New Directions Workshop: Refining Testing Strategies and Study Designs. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 92(5): 404-412, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 17 de 31 de julho de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, n. 147, p. 4, de 04 de agosto de 2014. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=04/08/2014&jornal=1&pagina=4&totalArquivos=200>>. Acesso em 14 ago 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Agrofit. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em 31 jul 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 44 de 08 de maio de 2015. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, n. 88, p. 4, de 12 de maio de 2015. Disponível em:



<<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=4&data=12/05/2015>>. Acesso em 29 jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n. 3, de 16/01/1992. Ratificar os termos das “Diretrizes e exigências referentes à autorização de registro, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins – n. 1, de 9/12/1991”. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Legislacao/Legislacao+de+Agrotoxicos+Componentes+e+Afins/Portarias>> Acesso em 03 ago. 2015.

BUTLER, E. G.; TANAKA, T.; ICHIDA, T.; MARUYAMA, H.; LEBER, P.; WILLIAMS, G. M. Induction of hepatic peroxisome proliferation in mice by lactofen, a diphenyl ether herbicide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 93, 72-80, 1988.

CATANEO, A. C.; CHAMMA, K. L.; FERREIRA, L. C.; DÉSTRO, G. F. G.; SOUZA, D. C. F. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max L.*) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. *Revista Brasileira de Herbicidas*, 4(2), 23-31, 2005. Disponível em: <<http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/viewFile/22/14>>. Acesso em 23 set 2015.

CATTLEY, R. C. Peroxisome Proliferators and Receptor-Mediated Hepatic Carcinogenesis. *Toxicol. Pathology*, 32 (Suppl. 2): 6-11, 2004.

CORTON, J. C.; CUNNINGHAM, M. L.; HUMMER, B. T.; LAU, C.; MEEK, B.; PETERS, J. M.; POPP, J. A.; RHOMBERG, L.; SEED, J.; KLAUNIG, J. E. Mode of action framework analysis for receptor-mediated toxicity: The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) as a case study. *Critical Reviews in Toxicology*, 44, 1, 1-49, 2014.

CORTON, J. C.; LAPINSKAS, P. J.; GONZALEZ, F. J. Central role of PPAR α in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutation Research*, 448(2), 139-151, 2000.

COX, R. H.; MARSHALL, P. M.; KOKA, M.; ALSAKER, R. D.; DUDEK, L. E.; THAKUR, A. K. Oncogenicity study in mice. Hazleton Laboratories America. Project number 250-152, Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 1985, 1695 p.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances, 21 June 2007. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32007D0442>>. Acesso em 29 set 2015.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Reasoned opinion on the potential chronic and acute risk to consumers' health arising from proposed temporary EU MRLs. 15 March 2007. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/32r.pdf>. Acesso em 29 set 2015.

ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.; VIEIRA, E.; TARASCONI, H. R.; CÂNDIDO, R. O. de; PASTORINO, M. Study to Determine the Ability of Lactofen Technical Product, from Hoechst do Brasil to Induce Chromosome Mutations Analyzed by the Micronucleus Test in Bone Marrow of Treated Mice. Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Número do estudo HOE 2000/911. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 1993, 24 p.



FAMIC. FOOD AND AGRICULTURAL MATERIALS INSPECTION CENTER. List of Active Ingredients, 2015. Disponível em <<http://www.acis.famic.go.jp/eng/aillist/index.htm>>. Acesso em 29 set 2015.

FROMENT, P.; GIZARD, F.; DEFEVER, D.; STAELS, B.; DUPONT, J.; MONGET, P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinology*, 189(2): 199-209, 2006.

GAVA, M. A. Medium-term study in rats (*Rattus norvegicus*) for detection of carcinogenesis in multiple organs after treatment with - lactofem técnico. Bioagri Laboratórios Ltda. Número do Estudo G3.1.-007/99. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 2000, 50 p.

GLOBAL MRL DATABASE. Bryant Christie Inc., 2015. Disponível em <<https://www.globalmrl.com/db#query>>. Acesso em 29 set 2015.

GODEK, E. G.; NAISMITH, R. W.; MATTHEWS, R. J. Ames Salmonella/ Microsome Plate Test. Pharmakon Research International, INC. Número do estudo PH 301-PPG-001-82. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 1982, 16 p.

GODEK, E. G.; NAISMITH, R. W.; MATTHEWS, R. J. Mammalian Cell Forward Gene Mutation Assay. Pharmakon Research International, Inc. Número do estudo PH 314-PPG-001-84. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 1985, 67 p.

GUYTON, K. Z.; CHIU, W. A.; BATESON, T. F.; JINOT, J.; SCOTT, C. S.; BROWN, R. C.; CALDWELL, J.C. A reexamination of the PPAR- α activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants. *Environmental Health Perspectives*, 117, 11, 1664-1672, 2009.

HEALTH CANADA PMRA. Pest Management Regulatory Agency. Pesticide Product Information Database, last modified 08 Dec. 2014. Disponível em <<http://pr-rp.hc-sc.gc.ca/pi-ip/index-eng.php>>. Acesso em 01 out 2015.

HENRIQUES, J. A. P. Genotoxicity Studies with Lactofen Technical: The Induction of Gene Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* XV 185-14C. Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1992, 39 p.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em 05 ago. 2015.

ICAMA. INSTITUTE FOR THE CONTROL OF AGROCHEMICALS - MINISTRY OF AGRICULTURE, P.R. CHINA. China Pesticide Information Network, 2015. Disponível em <<http://www.chinapesticide.gov.cn/service/asp/e2.aspx>>. Acesso em 29 set 2015.

ITO, N.; IMAIDA, H. T.; SHIBATA, M.; AOKI, T.; CAMARGO, J. L.V.; FUKUSHIMA, S. Wide-Spectrum Initiation Models: Possible Applications to Medium-Term Multiple Organ Bioassays for Carcinogenesis Modifiers. *Jap. J. Cancer Research*, 79, 413-417, 1988.

KLAUNIG J. E.; BABICH M. A.; BAETCKE K. P.; COOK J. C.; CORTON J. C.; DAVID R. M.; DELUCA J. G.; LAI D. Y.; MCKEE R. H.; PETERS J. M.; ROBERTS R. A.; FENNER-



CRISP P. A. PPAR α agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Critical Reviews in Toxicology*, 33, 6, 655-780, 2003.

KOMAR, C. M.; BRAISSANT, O.; WAHLI, W.; CURRY Jr., T. E. Expression and Localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology*, 142(11): 4831-4838, 2001.

LEIBOWITZ, S. F.; AKABAYASHI, A.; ALEXANDER, J.; KARATAYEV, O.; CHANG, G. Q. Puberty Onset in Female Rats: Relation to Fat Intake, Ovarian Steroids and the Peptides, Galanin and Enkephalin, in the Paraventricular and Medial Preoptic Nuclei. *J Neuroendocrinol*, 21, 6, 538-549, 2009.

MARQUES, M. F. C. The *Salmonella typhimurium* reverse mutation by Lactofen Técnico. BIOAGRI Laboratórios Ltda. Número do estudo RF-G11.63/98. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1999, 34 p.

MARTY, M. S.; JOHNSON, K. A.; CARNEY, E. W. Effect of feed restriction on Hershberger and pubertal male assay endpoints. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 68(4): 363-74, 2003.

MATSUDA, S.; KOBAYASHI, M.; KITAGISHI, Y. Expression and Function of PPARs in Placenta. *PPAR Research*, p. 1-7, 2013.

MITOMA, C.; GREEN, C. E. Determination of DNA covalent binding of PPG-884 in mouse liver. SRI International. Número do estudo LSC-8692. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1985, 17 p.

NEPELSKA, M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) activation leading to reproductive toxicity in rodents. Disponível em:
<<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/meetings/aop-wksp-2014/presentations/nepelska-508.pdf>> Acesso em 14 set 2015.

NICOLAI, M. GTR - Lactofem Herbicida Pós-Emergente. Sindiveg - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. Apresentação oral em 12/08/2015. Ata da Reunião Conjunta Mapa-Anvisa-Ibama, Seminário sobre Avaliação Técnica de Agrotóxicos.

NISHIMURA, K.; YAMAUCHI, N.; CHOWDHURY, V. S.; TORII, M.; HATTORI, M.; KANETO, M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms in the rat uterus during early pregnancy. *Cell Tissue. Res*, 345(2), 275-284, 2011.

OLIVEIRA, M. S. de. Toxicidade reprodutiva do Lactofen Técnico de Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) em Duas-Gerações. BIOAGRI Laboratórios Ltda. Número do estudo G22.05/99. Estudo aportado no dossiê toxicológico do lactofem. 2000, 82 p.

PERINA, V. C. F. A micronucleus study in mice for Lactofen Técnico. BIOAGRI Laboratórios Ltda. Número do estudo RF-G12.39/98. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1999, 53 p.

PESTANA, C. B.; ALMEIDA, Ilzo de. Teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo para Lactofen Técnico 75%. TECAM – Tecnologia Ambiental Ltda. Número do estudo RLYBRT56. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 2002, 27 p.



PESTANA, C. B.; VAL, R. R. do. Teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames para o produto Lactofen Técnico 75%. TECAM - Tecnologia Ambiental Ltda. Número do estudo RLN25L31. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 2002, 35 p.

ROMANO, T.; HRYCIW D. H.; WESTCOTT, K. T.; WLODEK, M. E. Puberty onset is delayed following uteroplacental insufficiency and occurs earlier with improved lactation and growth for pups born small. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015, disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26259538>>. Acesso em 08 out 2015.

SCHROEDER, R. E.; DALY, I. W. A Two-Generation Reproduction Study in Rats with PPG-844. Bio/dynamics Inc. Número do estudo 82-2638. Estudo aportado no dossiê toxicológico do lactofem, 1983.

SENASA. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. Listado actualizado de LMR por activo y por cultivo (Res. 934/2010), maio/2015. Disponível em <<http://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File4292-anexo-1.pdf>>. Acesso em 29 set 2015.

SQUIRE, R. A.; LEVITT, M. H. Report of a Workshop on Classification of Specific Hepatocellular Lesions in Rats. *Cancer Research*, 35, 3214-3223, 1975.

STOKER, T. E.; LAWS, S.C.; GUIDICI, D. L.; COOPER, R. L. The effect of atrazine on puberty in male Wistar rats: an evaluation in the protocol for assessment of pubertal development and thyroid function. *Toxicological Sciences*, 58, 50-59, 2000.

THILAGAR, A.; KUMAROO, P. V.; KOTT, S. Chromosome Aberrations Assay in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. Microbiological Associates. Número do estudo T2414.337001. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1984, 69 p.

TISDEL, M.; CARTER, J.; JACKSON, T. A.; PALMER, T. E.; BASEL, D. L.; CAMPBELL, S. L.; HEIL, M. R.S.; KOEING, J.; LORAM, C.. Two-Year Feeding Study of the Oncogenicity and Chronic Toxicity of PPG-84 in Rats. Hazleton Laboratories America. Número do Estudo 6100-100. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1985, 265 p.

TYSON, C.A.; LEBER, A.P. Measurement of peroxisome proliferation in primary rat hepatocytes induced by PPG-844 and five of its metabolites. SRI International. SRI Project LSC-8663. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1986, 31 p.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Lactofen - Interim Registration Review Decision: Case Number 7210, 2014a. Disponível em: <<http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2005-0287-0030>>. Sumário em <<http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2005-0287-0029>>. Acesso em 28 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Final Second List of Chemicals for Tier 1 under the Endocrine Disruptor Screening Program, 2014b. Disponível em <<http://www2.epa.gov/endocrine-disruption/final-second-list-chemicals-tier-1-under-endocrine-disruptor-screening-program>>. Acesso em 28 ago 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Lactofen; Pesticide Tolerance. *Federal Register*, v. 72, n. 118, p. 33901-33906, 2007. Disponível em:



<<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2007-06-20/pdf/E7-11797.pdf>>. Acesso em 03 ago 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Memorandum. Lactofen: Registration Review Scoping Document for Human Health Assessments. Washington, D.C., 2006. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/lactofen/lactofen_summary.pdf>. Acesso em 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Lactofen; Pesticide Tolerance. *Federal Register*, v. 69, n. 185, p. 57207-57216, 2004. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2004-09-24/pdf/04-21500.pdf>>. Acesso em: 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Lactofen: Notice of Filing Pesticide Petitions to Establish Tolerances for Certain Pesticide Chemicals in or on Food. *Federal Register*, v. 68, n. 19, p. 4475-4481, 2003. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2003-01-29/pdf/03-2020.pdf>>. Acesso em 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Memorandum. Lactofen - Toxicology Evaluation. Washington D.C., 2000a. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Disponível em: <<https://www.fluoridealert.org/wp-content/pesticides/Lactofen.EPA.ToxEval.2000.pdf>>. Acesso em 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Memorandum. Lactofen: Preliminary Human Health Risk Assessment for Tolerance Reassessment Incorporating Revised Cancer Unit Risks. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C., 2000b. Disponível em <<http://fluoridealert.org/wp-content/pesticides/EPA-HQ-OPP-2005-0287-0011.pdf>>. Acesso em 28 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Lactofen; Pesticide Tolerance. *Federal Register*, v. 61, n. 47, p. 9399-9401, 1996a. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1996-03-08/pdf/96-5538.pdf>>. Acesso em: 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Valent USA Corporating; Pesticide Tolerance Petition Filing. *Federal Register*, v. 61, n. 240, p. 65395-65400, 1996b. Disponível em: <<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1996-12-12/pdf/96-31556.pdf>>. Acesso em: 21 jul 2015.

U.S. EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. *Federal Register*, v. 61, n. 212, p. 56274-56322, 1996c.

WILLIAMS, G.M.; BUTLER E.G.; TANAKA T.; ENGLAND, P. Results of the analysis of biochemical parameters in mouse liver following exposure to PPG-844. Naylor Dana Institute for Disease Prevention. Study number M435. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem, 1985, 15 p.

WILLIAMS, G.M.; BUTLER, E.G.; MARUYAMA, H.; ENGLAND, P. The analysis of biochemical and microscopic parameters in chimpanzee liver from study PP-246c at Primate Research Institute. Naylor Dana Institute for Disease Prevention. Números dos estudos 573-2 and 573-3. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1986, 67p.

WILLIAMS, G. M. In vivo - In vitro Mouse Hepatocyte Primary Culture/DNA Repair Assay on Compound PPG-844 Technical Grade. Naylor Dana Institute for Disease Prevention



Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Superintendência de Toxicologia
Gerência Geral de Toxicologia

American Health Foundation. Número do estudo 84-29A. Estudo aportado no dossiê toxicológico do ingrediente ativo lactofem. 1986, 23 p.

YANG, J.; CHEN, L.; ZHANG, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, D.; HUO, M.; GUAN, Y. PPARs and Female Reproduction: Evidence from Genetically Manipulated Mice. *PPAR Research*, p. 1-8, 2008.

ZEIGER, Errol. Genetic Toxicity Tests for Predicting Carcinogenicity. In: CHOY, Wai Nang. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*. Nova York: Marcel Dekker, 2001. p. 29-45.