

**Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Programas de Pós-Graduação em Neurociências**

***Efeito da exposição sub-crônica de camundongos BALB/c ao herbicida  
Glifosato-Biocarb sobre a resposta imune humoral e o comportamento***

**Carla Stanchack Tessari**

**Florianópolis**

**2006**

**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Programas de Pós-Graduação em Neurociências**

***Efeito da exposição sub-crônica de camundongos BALB/c ao herbicida  
Glifosato-Biocarb sobre a resposta imune humoral e o comportamento***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Mestre, sob orientação do Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva.

**Carla Stanchack Tessari**

**Florianópolis**

**2006**

*“O senhor é meu pastor e nada me faltará”*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Mauro e Maria, às minhas irmãs, Julia e Beatriz, pelo amor incondicionável e por acreditarem que eu sou capaz.

Ao meu companheiro Anderson pelo seu amor, companheirismo e paciência.

À minha família e amigos que sempre me incentivaram nos momentos de desânimo.

Ao Prof. Hercílio e Laboratório de Imunologia, por ser novamente mais que um orientador e me proporcionar a disponibilidade de equipamentos e estrutura física na FURB, e à Gabriela pela companhia aos sábados durante os experimentos.

À FURB e ao Departamento de Ciências Naturais pelo retorno à minha casa de formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, pela oportunidade na realização deste e autonomia confiada.

Ao Laboratório de LNH pelo aprendizado proporcionado.

Aos colegas e amigos do mestrado, pelos momentos compartilhados.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus pelas graças alcançadas.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>05</b>
<b>2.1. Objetivos Gerais .....</b>	<b>06</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos .....</b>	<b>06</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>07</b>
<b>3.1. Agrotóxicos .....</b>	<b>08</b>
<b>3.2. Glifosato .....</b>	<b>12</b>
3.2.1. Caracterização química .....	12
3.2.2. Emprego e mecanismo de ação .....	12
3.2.3. Toxicocinética .....	14
3.2.3.1. Absorção, distribuição e excreção .....	14
3.2.3.2. Metabolização .....	15
3.2.4. Periculosidade ambiental .....	15
3.2.5. Classificação toxicológica .....	15
<b>3.3. Epidemiologia .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Efeitos sobre a saúde .....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Barreira hemato-encefálica .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. O sistema imune e suas interações neuroimune- comportamental .....</b>	<b>27</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Aprovação na Comissão de Ética .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Animais .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Grupos experimentais .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Inoculação de glifosato .....</b>	<b>35</b>

<b>4.5. Inoculação de OVA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6. Testes comportamentais .....</b>	<b>35</b>
4.6.1. Campo Aberto .....	35
4.6.2. Labirinto em cruz elevado .....	36
4.6.3. Nado forçado .....	36
<b>4.7. Coleta de sangue .....</b>	<b>37</b>
<b>4.8. Coleta do encéfalo .....</b>	<b>37</b>
<b>4.9. Avaliação da integridade da barreira hemato-encefálica ...</b>	<b>37</b>
<b>4.10. Dosagem de IgM e IgG totais .....</b>	<b>37</b>
<b>4.11. Dosagem de IgM e IgG anti-OVA .....</b>	<b>38</b>
<b>4.12. Análise estatística .....</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Integridade da barreira hemato-encefálica .....</b>	<b>41</b>
<b>5.2. Parâmetro imune humoral .....</b>	<b>41</b>
5.2.1. Dosagem de IgM total .....	41
5.2.2. Dosagem de IgG total .....	43
5.2.3. Dosagem de IgM anti-OVA .....	44
5.2.4. Dosagem de IgG anti-OVA .....	46
<b>5.3. Testes Comportamentais .....</b>	<b>48</b>
5.3.1. Campo aberto .....	48
5.3.2. Labirinto em cruz elevado .....	50
5.3.3. Nado forçado .....	51
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Molécula do glifosato. ....	12
Figura 3.2.	Ácido aminometilfosfônico (AMPA). ....	15
Figura 3.3.	Vias de comunicação entre o SNC e demais sistemas .....	31
Figura 5.1.	Determinação dos valores de anticorpos IgM presentes no plasma. ....	42
Figura 5.2.	Determinação dos valores de anticorpos IgM presentes no cérebro. ....	42
Figura 5.3.	Determinação dos valores de anticorpos IgG presentes no plasma. ....	43
Figura 5.4.	Determinação dos valores de anticorpos IgG presentes no cérebro. ....	44
Figura 5.5.	Determinação dos valores de anticorpos IgM anti-OVA presentes no plasma. ....	45
Figura 5.6.	Determinação dos valores de anticorpos IgM anti-OVA presentes no cérebro. ....	45
Figura 5.7.	Determinação dos valores de anticorpos IgG anti-OVA presentes no plasma. ....	47
Figura 5.8.	Determinação dos valores de anticorpos IgG anti-OVA presentes no cérebro. ....	47
Figura 5.9.	Número de cruzamentos no centro da arena de campo aberto. ....	49
Figura 5.10.	Número de cruzamentos na periferia da arena de campo aberto. ....	49
Figura 5.11.	Número de cruzamentos totais na arena de campo aberto. ....	50
Figura 5.12.	Tempo de permanência no centro da arena de campo aberto. ....	50
Figura 5.13.	Tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. ....	51
Figura 5.14.	Tempo de imobilidade durante o teste de nado forçado. ....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação toxicológica e respectiva cor de faixa a ser apresentada no rótulo da embalagem do agrotóxico. Fonte: BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, 1992. ....	10
Tabela 3.2. Classificação toxicológica de agrotóxicos segundo a DL <sub>50</sub> em ratos. ....	11
Tabela 3.3. Classificação do risco apresentado pelos agrotóxicos segundo a DL <sub>50</sub> em ratos. ....	11
Tabela 3.4. Emprego do glifosato. ....	13
Tabela 3.5. Recuperação da radioatividade (% da dose administrada) em excretas e tecidos de ratos tratados com glifosato <sup>14</sup> C marcado. ....	14
Tabela 3.6. Algumas citocinas e suas características .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

AchE	Acetil colinesterase
AcP	Fosfatase ácida
ACTH	Adrenocorticotropina
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Acido amimometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCC	Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações
AST	Aspartato aminotransferase
BBB	Blood-brain barrier, barreira hemato-encefálica
ChE	Colinesterase
CIT	Centro de Informações Toxicológicas
CSF	Fluído cérebro-espinhal
DDT	Diclorodifeniltricloreto
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
HPA	Hipotalâmico-Pituitário-Adrenal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ic50	Concentração inibitória a 50% (inhibitory concentration 50%)
ICD	Isocitrato desidrogenase
IDA	Ingestão diária aceitável
IDTM	Ingestão diária teórica máxima
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IL	Interleucina
LDH	Lactato desidrogenase
LNH	Linfoma não-Hodgkin
M5% / M1%	Molico a 5% / Molico a 1%
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MD	Malato desidrogenase
mM	Micromolar
NADPH	(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)
nm	Nanomolar
OMS	WHO Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana para Saúde
OPD	O-fenilendiamina
OVA	Albumina de ovo, ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
ppb	Partes por bilhão
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas
SNC	Sistema nervoso central
sTNF RII	Receptor solúvel de fator de necrose tumoral
T20	Tween 20
TNF	Fator de necrose tumoral
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
mg	Microgramas

## RESUMO

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo, derivado da glicina, amplamente utilizado no Brasil para o controle de plantas daninhas, sendo comumente comercializado na forma de sal de isopropilamina. Toxicologicamente é classificado como produto da Classe IV – Pouco Tóxico, sendo sua DL50 para camundongos de 1.570 mg/kg de peso corporal, e pertence à Classe III - Produto Perigoso em relação à periculosidade ambiental. Dados da literatura referentes aos efeitos deste produto sobre a saúde humana são contraditórios e em alguns aspectos, como imunológico e comportamental, escassos. Desta maneira o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da exposição sub-crônica ao glifosato sobre a resposta imune humoral, a barreira hemato-encefálica e o comportamento de camundongos. Para isso quatro grupos de animais receberam o agrotóxico por via oral em doses equivalentes a 1/100 e 1/10 da DL50 do produto, em intervalos de 48 horas, por um período de 30 dias. Posteriormente um grupo de cada dosagem foram inoculados com 180µg/0,2ml de OVA por via intraperitoneal nos dias 0, 7, 14, 21 do experimento este mesmo protocolo de inóculo de OVA foi repetido para o grupo que só recebeu OVA. Ao grupo controle foi administrado salina. Ao término do período de trinta dias foram realizados os testes comportamentais e coletadas amostras de sangue e cérebro. Foram realizadas as seguintes análises: os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado, dosagens de IgM e IgG totais e anti-OVA presentes no plasma e no cérebro. Os animais tratados com glifosato apresentaram redução dos valores de IgM e aumento dos de IgG, uma permeabilidade seletiva da barreira hemato-encefálica e uma tendência a menor exposição a lugares abertos, porém sem afetar o comportamento relacionado a ansiedade, e tendo uma atuação “antidepressiva”, que é revertida quando há a inoculação de OVA. Os resultados demonstraram que a exposição ao glifosato compromete os parâmetros imune humoral, afeta a barreira hemato-encefálica de maneira específica e o comportamento. Isto pode levar ao comprometimento da efetividade do sistema imune e de outros sistemas, facilitando o aparecimentos de patologias.

**Palavras-chave:** glifosato, camundongos, IgM, IgG, OVA, campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado.

## ABSTRACT

The glyphosate is a systemic, post-emergent and nonselective herbicide, derived from glycine, widely used in Brazil for the control of weeds, being commonly commercialized in the form of isopropylamine salt. Toxicologically it is classified as a Class IV product – Little Toxic – being its LD50 1570 mg/kg of body weight for mice, and belonging to Class III – Dangerous Products regarding to environmental dangerousness. Literature data referent to the effects of this product over human health are contradictory and in some aspects, as the immunological and behavior ones, rare. In this way the objective of this study was the evaluation of the effect of sub-chronic exposure to glyphosate to the humoral immune response, the blood-brain barrier and the behavior of mice. For this, four groups of animals were given the pesticide by gavage in doses equivalent to 1/100 and 1/10 of the glyphosate LD50, in intervals of 48 hours, during a period of 30 days. From this groups, two were inoculated intraperitoneally with 180µg/0,2ml of OVA in the days 0, 7, 14 and 21 of the experiment. The same protocol was applied in the group which received only OVA. To the control group only saline was given. By the end of the period, the behavior tests was applied and blood and brain samples were collected. The following analyses were made: open field, plus maze and forced swimming test, and the determination of total and anti-OVA IgM and IgG in the serum and brain samples. The glyphosate treated animals presented a reduction of IgM and an increase of IgG, a selective permeability of the blood-brain barrier and a tendency to less exposure a open places, although without alterations in the anxiety parameters, and having an “ant depressive” actuation, which are reversed when we have the OVA inoculation. The results demonstrated that the exposure to glyphosate compromises parameters of the humoral immune system, affects the blood-brain barrier and the behavior. This can lead to the immune system effectiveness compromising and of others systems, facilitating the surging of pathologies.

**Key words:** glyphosate, mice, IgM, IgG, OVA, open field, plus maze, forced swimming test.

## 1 INTRODUÇÃO

Com o advento da revolução industrial houve uma intensificação do êxodo rural, uma vez que os grandes centros passaram a oferecer um número maior de possibilidades empregatícias para a população. Apesar da saída de trabalhadores no campo, a população mundial não reduziu o seu crescimento, gerando uma demanda crescente de alimento. Para suprir este mercado de consumo tem se investido cada vez mais no desenvolvimento de técnicas e equipamentos agrícolas.

Como exemplo disto, de forma geral, basta observarmos o crescimento da população mundial e a produção agrícola. Em 1960, a população mundial era de 3,04 bilhões de habitantes, passando para 6,079 bilhões no ano de 2000, representando um crescimento de 99,97% (U.S. CENSUS BUREAU, 2002). Enquanto isso, a produção mundial de cereais, produto agrícola base na alimentação, passou de 1,076 para 1,913 bilhões de toneladas entre 1966 e 1990, um aumento de 77,79% (AGCAOILI & ROSEGRANT, 1994).

No Brasil, país que tem como principais produtos de importação os de origem agrícola, enquanto a população entre 1960 e 2000 apresentou um crescimento de 142,3%, passando de 70,07 para 169,78 milhões de habitantes (IBGE, 2006), a produção de cereais apresentou um crescimento de 494% entre 1960 e 2000, passando de 16,237 milhões de toneladas em 1960 (IBGE, 1963) para 96,495 milhões de toneladas em 2000 (IBGE, 2001).

Apesar do crescimento populacional e o grande aumento da produção de cereais no Brasil, a população rural diminuiu no mesmo período, passando de 38,7 milhões em 1960 para 31,8 milhões em 2000. Com isto vislumbra-se a importância do desenvolvimento tecnológico na área agrícola, onde cada vez mais há a dependência da mecanização e o uso de insumos agrícolas, como os agrotóxicos.

Os agrotóxicos são utilizados para minimizar a ação danosa de insetos, doenças e ervas daninhas de modo a reduzir as perdas na produção agrícolas, mas os agrotóxicos também são utilizados no ambiente urbano para fins domésticos, industriais e de saúde pública, entre outros (ECOBICHOM, 2000).

Na sua diversidade de aplicações, estes produtos são bastante consumidos no mundo, movimentaram US\$ 30,3 bilhões de dólares em 1995 (AGROCHEMICAL, 1996). Entre as classes mais utilizadas encontram-se os

herbicidas, inseticidas e fungicidas, correspondendo respectivamente a 40%, 30% e 20% do consumo de agrotóxicos (WHO, 1992). Já no Brasil estes produtos movimentaram US\$ 2,5 bilhões durante o ano de 2000, sendo US\$ 1,3 bilhões destes apenas em herbicidas (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2003).

Não são encontrados dados relativos ao consumo individual de agrotóxicos, seja do princípio ativo ou da formulação comercial, no Brasil. O único levantamento encontrado, realizado no estado do Paraná, sobre o emprego de agrotóxicos por princípio ativo demonstrou que o glifosato foi o herbicida mais utilizado e empregado principalmente no cultivo de soja na safra 98/99 (IBGE, 2001). Uma vez que a soja é amplamente cultivada no país, supõe-se que este seja utilizado em larga escala. Esta suposição é reforçada com a diversidade de aplicação deste herbicida, como em áreas residenciais, industriais e vias de transporte (ANDREI, 1999).

Atualmente a agricultura é extremamente dependente do uso de agrotóxicos, o abandono ou redução do uso destes causaria queda na produção agrícola, aumento nos custos de produção, elevação dos preços e, em alguns locais, fome e desnutrição (KNUTSON, 1999). Entretanto tem se demonstrado uma preocupação cada vez maior quanto a segurança na utilização dos mesmos e os efeitos destes no ambiente e na saúde humana (MARONI *et al.*, 1999; MAGE *et al.*, 2000; EDLESTON *et al.*, 2002).

A utilização em larga escala destes produtos combinados as diversas formas de exposição humana a estes resulta em freqüentes contaminações humanas e ambientais (ECOBICHOM, 2001), levando a associação da exposição crônica aos agrotóxicos com conseqüências para a saúde humana, como alterações hematológicas e hormonais, aborto malformações e desenvolvimento de neoplasias.

O glifosato é um produto com grandes possibilidades de ser um contaminante humano e ambiental. Todavia, resultados de pesquisas realizadas sobre os riscos oferecidos por agrotóxicos amplamente utilizados como o glifosato tem gerado polêmica na população em geral e no meio científico (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Apesar da divergência existente na literatura sobre os efeitos do glifosato sobre a saúde humana, como os trabalhos de BOLOGNESI e

colaboradores (1997) e KIER e colaboradores (1997), envolvendo aspectos de genotoxicidade, tem-se associado o mesmo a efeitos ainda não descritos como aborto (ABUCKLE *et al.*, 2001) e parkinsonismo (BARBOSA *et al.*, 2001) sobre a saúde humana. Em experimentos com animais tem se associado ao glifosato efeitos como malformações em ratos (DALLEGRAVE *et al.*, 2003), e em modelos *in vitro* com a inibição da esteroidogênese (WALSH *et al.*, 2000) e a interferência no ciclo celular (MARC *et al.*, 2002), questionando a segurança na utilização do glifosato.

Diante deste quadro é imprescindível a verificação dos riscos à saúde humana com a exposição ao glifosato, devendo os mesmos serem explorados e até reavaliados perante a novos conhecimentos e metodologias.

Este trabalho vem para acrescentar informações sobre o mesmo, relacionadas aos aspectos imunológicos, neurais e comportamentais.

**2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos gerais**

- ✧ Avaliar a influência do agrotóxico glifosato sobre a resposta imune humoral, a barreira hemato-encefálica e parâmetros comportamentais em camundongos tratados com glifosato.

### **2.2. Objetivos específicos**

Verificar e avaliar:

- ✧ A resposta do sistema imune humoral a um desafio antigênico com ovalbumina através de dosagem de anticorpos IgM e IgG.
- ✧ A existência de diferenças entre as dosagens de IgG e IgM totais do soro do sangue periférico e do cérebro.
- ✧ A integridade da barreira hemato-encefálica, através da permeabilidade da mesma ao azul de Evans.
- ✧ Possíveis alterações comportamentais de ansiedade e depressão que possam ser causadas pelo agrotóxico glifosato.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1. Agrotóxicos**

O desenvolvimento da agricultura foi um dos pilares essenciais ao desenvolvimento das civilizações humanas. Desde então o homem vem se empenhando para obter uma produção adequada de alimentos, enfrentando devastações causadas por insetos e doenças e a interferência negativa de ervas daninhas. Encontramos documentos antigos que registram estas preocupações, como Theophrastus (300a.C.), que descreveu doenças de plantas conhecidas atualmente como ferrugem e gorgulho, e o Antigo Testamento que faz referência às pragas do Egito como os gafanhotos que ainda hoje causam perdas importantes na produção agrícola (CREMLYN, 1991).

O controle de pragas através do uso de produtos químicos remonta à Grécia e Roma antiga. Antes de 1000a.C. já se tinha o conhecimento de que o enxofre evitava doenças e combatia insetos, o próprio uso do mesmo como fumegante foi mencionado por Homero. A utilização de arsênio do inseticida foi recomendada por Plínio (23-79d.C.) e no séc. XVI pelos chineses. A nicotina na forma de extrato de tabaco, no séc. XVII, foi o primeiro inseticida natural a ser utilizado. Porém, as recomendações destes produtos careciam de embasamento científico iniciando somente no séc. XIX os primeiros estudos sobre o emprego de produtos químicos no controle de pragas na agricultura. Isto levou a introdução dos pesticidas naturais rotenóides (rotenona) e piretróides (piretrum) por volta de 1850 e do verde de Paris (arsenito de cobre) em 1867. As primeiras observações sobre o emprego de produtos químicos ao combate de ervas daninhas ocorreram em 1896, e em 1900 criou-se uma legislação para regulamentar o uso de pesticidas, possivelmente a primeira do mundo (CREMLYN, 1991; OMS/PNUMA, 1992).

A partir da década de 30 foram patenteados vários pesticidas como dinitro-orto-cresol, difenil tricloroetano (DDT) e fenoxiacéticos, assim como compostos triazínicos, aminas quaternárias e derivados de uréia nas décadas de 50 e 60 (HENA O & COREY, 1991). Mas foi a partir de 1970 que surgiram agrotóxicos mais eficazes como as sulfoniluréias, os piretróides sintéticos e o glifosato, com novas formulações e métodos de aplicação baseados nos novos conhecimentos de mecanismos biológicos e bioquímicos e da interação

hospedeiro-parasita (OMS/PNUMA, 1992). O primeiro uso de agrotóxicos registrado no Brasil aconteceu em Caçador, no estado de Santa Catarina, em 1946, onde houve o emprego do hexaclorocicloexano no extermínio de gafanhotos (ZANIN *et al.*, 1992).

Existem cerca de 15.000 formulações para 400 substâncias com ação pesticida utilizadas como ingredientes ativos em todo mundo. Cerca de 8.000 destas formulações encontram-se licenciadas no Brasil, que é um dos cinco maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (WIKIPÉDIA, 2006).

Baseado no Decreto n° 4.074 de 04 de janeiro de 2002, em seu artigo primeiro, inciso IV, entende-se agrotóxicos e afins como: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS, 2002)

Para a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2003), pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias destinada à prevenção, destruição ou controle de qualquer peste, incluindo vetores de doenças humanas ou animais, espécies indesejadas de plantas ou animais que possam causar prejuízo ou interferir de qualquer outra forma na produção, processamento, armazenagem, transporte ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira ou produtos de madeira, alimentos para animais, ou que podem ser administrados aos animais para combater insetos ou outras pragas em ou sobre seus corpos. O termo inclui substâncias usadas como reguladores do crescimento de plantas, desfolhantes, dessecantes, ou agentes para reduzir a densidade de frutas, ou prevenir a queda prematura de frutas e as substâncias aplicadas nos cultivos, antes ou depois da colheita, para proteger o produto contra a deterioração durante o armazenamento e transporte. Desta forma, os termos agrotóxico e pesticida são utilizados como sinônimos.

Quanto à classificação, os agrotóxicos podem ser categorizados quanto ao seu uso, grupo químico pertencente, periculosidade ambiental e classe toxicológica. Em relação ao uso podem ser distribuídos em diversos grupos como herbicidas, inseticidas e fungicidas, que são os mais utilizados, havendo também os acaricidas, rodenticidas, nematicidas, molusquicidas, reguladores de crescimento de plantas, desfoliantes e dessecantes, empregados em menor escala (FARQUHARSON, 1976).

Podem ser citados como representantes classificados segundo grupo químico pertencente os organoclorados, piretróides, carbamatos, etileno-bis-ditiocarbamatos, bupiridilos, ftalimidas, ftalonitrilas, triazóis e glicinas, que são amplamente utilizados (AZEVEDO, 1995).

A classificação quanto à periculosidade ambiental é normatizada pela Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), em seu artigo terceiro, que estabelece a distribuição dos agrotóxicos em quatro classes, sendo estas: Classe I – Produto altamente perigoso, Classe II – Produto muito perigoso, Classe III – Produto perigoso, Classe IV – Produto pouco perigoso. O mesmo artigo discrimina os parâmetros nos quais se baseia a classificação, sendo este a bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade para diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico.

No Brasil é o Ministério da Saúde que regula a classificação toxicológica para os agrotóxicos. Estes são enquadrados dentro de quatro classes e os mesmos devem apresentar uma faixa colorida no rótulo indicando a classe a qual pertence, conforme o quadro 3.1 e a tabela 3.1 (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE - ANVISA, 1992).

Classe I	Extremamente tóxico	Faixa vermelha
Classe II	Altamente tóxico	Faixa amarela
Classe III	Medianamente tóxico	Faixa azul
Classe IV	Pouco tóxico	Faixa verde

Quadro 3.1. Classificação toxicológica e respectiva cor de faixa a ser apresentada no rótulo da embalagem do agrotóxico. Fonte: BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, 1992.

Tabela 3.1. Classificação toxicológica de agrotóxicos segundo a DL<sub>50</sub> em ratos.

<b>Grupos</b>	<b>DL50 Líquidos mg/kg peso corporal</b>	<b>DL50 Sólidos mg/kg peso corporal</b>
Extremamente tóxico	< 20 mg/kg	< 5 mg/kg
Altamente tóxico	20 – 200 mg/kg	5 – 50 mg/kg
Medianamente tóxico	200 – 2000 mg/kg	50 – 500 mg/kg
Pouco tóxico	> 2000 mg/kg	500 – 5000 mg/kg

Fonte: adaptado BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, 1992.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o risco de um pesticida à saúde humana quanto a toxicidade aguda oral e dérmica (DL<sub>50</sub>) do ingrediente ativo deste para o rato, seguindo determinações que são consideradas procedimentos padronizados em toxicologia. O pesticida recebe sua classificação segundo o maior risco apresentado por uma das vias, oral ou dérmica, podendo ser considerados outros aspectos quanto ao risco para a saúde humana diferir do indicado pela avaliação isolada da DL<sub>50</sub> (WHO, 2000).

Tabela 3.2. Classificação do risco apresentado pelos agrotóxicos segundo a DL<sub>50</sub> em ratos.

<b>Classe</b>		<b>DL50 (mg/kg de peso corporal)</b>			
		<b>Oral</b>		<b>Dérmica</b>	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremamente perigoso	< 5	< 20	< 10	< 40
Ib	Altamente perigoso	5 – 50	20 – 200	10 – 100	40 – 400
II	Medianamente perigoso	50 – 500	200 – 2000	100 – 1000	400 – 4000
III	Pouco perigoso	> 500	> 2000	> 1000	> 4000

Fonte: WHO, 2000.

## 3.2. Glifosato

### 3.2.1. Caracterização química

O glifosato é um ácido orgânico fraco constituído de uma molécula de glicina e uma de fosfometila (*N*-(phosphonomethyl)glycine) (Fig. 3.1). Em sua forma pura, constituído por um pó branco e inodoro, com densidade específica de 1,704 g/cm<sup>3</sup>, sua solubilidade em água é de 11,6 g/l a 25° e apresenta pH 2,5 em solução a 1%. É praticamente insolúvel em solventes orgânicos, como etanol, acetona e benzeno, devido à sua alta polaridade (WHO, 1994).

Como produto comercial este é encontrado em diferentes formulações e concentrações, sendo a formulação usualmente utilizada com o sal do ácido glifosato desprotonado e um cátion, a isopropilamina (Fig. 3.1), em solução aquosana concentração de 356 g/l do ácido livre ou 480 g/l do sal e tendo como surfactante a polioxietilenoamina (WILLIAMS *et al.*, 2000).

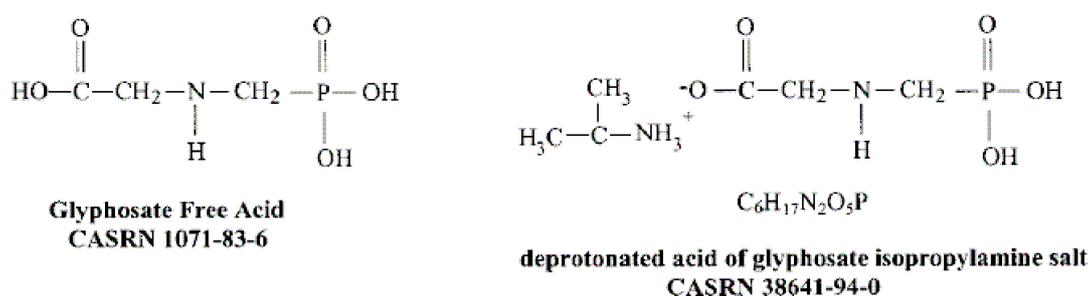


Figura 3.1. Molécula do glifosato. Fonte: WILLIAMS *et al.*, 2000.

### 3.2.2. Emprego e mecanismo de ação

Herbicida sistêmico, de aplicação principal pós-emergente, não seletivo, utilizado no controle de plantas daninhas. No Brasil é empregado no controle de cerca 70 espécies perenes e 80 anuais destas (ANDREI, 1999).

Modalidade de emprego agrícola: aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, feijão, maçã, milho, nectarina, pastagens, pêra, pêsego, seringueira, soja, trigo e uva (Tabela 3.3). Aplicação como maturador de cana-de-açúcar. Aplicação para eliminação de soqueira no cultivo de arroz e

cana-de-açúcar. Aplicação em pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus. Aplicação para o controle da rebrota do eucalipto (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, sd).

Modalidade de emprego não agrícola: aplicação em margens de rodovias e ferrovias, áreas sob a rede de transmissão elétrica, pátios industriais, oleodutos e aceiros (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, sd).

Tabela 3.3. Emprego do glifosato.

Uso Agrícola			
Cultura	Aplicação	LMR (mg/kg pc)	Intervalo (dias)
Algodão	Pós-emergência	3	(1)
Ameixa	Pós-emergência	0,2	17
Arroz	Pós-emergência	0,2	(1)
Banana	Pós-emergência	0,02	30
Cacau	Pós-emergência	0,1	30
Café	Pós-emergência	1	15
Cana-de-açúcar	Maturador	1	30
Cana-de-açúcar	Pós-emergência	1	(1)
Citros	Pós-emergência	0,2	30
Eucalipto	Pós-emergência		UNA
Feijão	Pós-emergência	0,05	(1)
Maçã	Pós-emergência	0,2	15
Milho	Pós-emergência	0,1	(1)
Nectarina	Pós-emergência	0,2	30
Pastagens	Pós-emergência	0,2	(1)
Pinus	Pós-emergência		UNA
Pêra	Pós-emergência	0,2	15
Pêssego	Pós-emergência	0,2	30
Seringueira	Pós-emergência		UNA
Soja	Pós-emergência	10	(2)
Trigo	Pós-emergência	0,05	(1)
Uva	Pós-emergência	0,2	17
Uso Agrícola			
Categoria	Forma Física	Concentração	Unidade
Jardinagem amadora	Líquido	48	%p/v
(1) Intervalo de segurança não determinado devido a modalidade de emprego. (2) O intervalo de segurança para a cultura da soja é não determinado quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e pré-emergência da cultura. O intervalo de segurança para a cultura da soja geneticamente modificada, que expressa resistência ao glifosato, é de 56 dias, quando o agrotóxico for aplicado em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura. (UNA) - Uso Não Alimentar. OBS: o LMR para a cultura da soja foi estabelecido para a modalidade de aplicação em pós-emergência das plantas infestantes e da cultura da soja geneticamente modificada, que expressa resistência ao glifosato.			

Fonte: adaptado BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, sd.

O mecanismo de ação do glifosato consiste na interferência na biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano, através da inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase, responsável pela biossíntese do corismate, que é um intermediário da síntese destes aminoácidos. Esta via não está presente no reino animal,

não representando este tipo de risco à saúde humana (CREMLYN, 1991; WILLIAMS *et al.*, 2000).

### 3.2.3. Toxicocinética

#### 3.2.3.1. Absorção, distribuição e excreção

BREWSTER e colaboradores (1991) demonstraram em um trabalho com ratos que após um dose única de 10 mg/kg de peso corporal de glifosato, marcada com  $^{14}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ , a taxa de absorção do mesmo ficou entre 35 a 40%. Estudos realizados em macacos *Rhesus* demonstraram que a absorção cutânea do glifosato, na forma de isopropilamina foi de 3,7% na dose de 25  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  e de 5,5% na dose de 270  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (WESTER *et al.*, 1991). Em um experimento realizado *in vitro* com pele humana, 1,42% da dose de solução aquosa de glifosato aplicada foi absorvida (WESTER *et al.*, 1996).

RIDLEY & MIRLY (1988) determinaram a distribuição do glifosato marcado com  $^{14}\text{C}$  no organismo de ratos sete dias após uma única dose oral. A distribuição foi ampla apesar da pequena absorção e da rápida eliminação (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Recuperação da radioatividade (% da dose administrada) em excretas e tecidos de ratos tratados com glifosato  $^{14}\text{C}$  marcado.

Tecido	Dose de 10 mg/kg p.o.	Dose de 1000 mg/kg p.o.
	% da dose administrada	% da dose administrada
Urina	28.6	17.8
Fezes	62.4	68.9
Órgãos e tecidos	0.046	0.3555
Carcaça restante	0.395	0.248
Conteúdo gastrointestinal	0.226	0.0258
Lavado da gaiola	1.3	3.86
Total recuperado	92.8	90.9

Fonte: Adaptado de WHO, 2004.

### 3.2.3.2. Metabolização

O principal metabólito produzido a partir do glifosato encontrado em estudos com ratos foi o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (Fig. 3.2), em concentrações de 0,2 a 0,3% para a dose administrada (WHO, 1994).

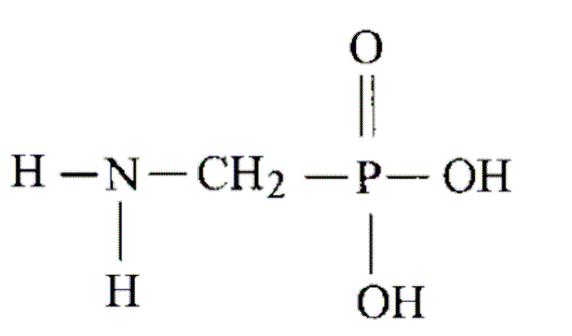


Figura 3.2. Ácido aminometilfosfônico (AMPA). Fonte: WILLIAMS *et al.*, 2000.

### 3.2.4. Periculosidade ambiental

O IBAMA classifica produtos a base de glifosato como Classe III – “Produto perigoso”, apesar de haverem formulações classificadas como Classe II – “Produto muito perigoso” (BRASIL-MAPA-ANVISA-IBAMA, sd).

O glifosato liga-se fortemente ao solo não sendo absorvido pelas raízes de plantas, mas é prontamente absorvido pelas folhas e outras partes dos vegetais. No solo, a sua meia-vida oscila de poucos dias a vários meses e na água, de 12 horas a 7 semanas, sendo degradado, principalmente, a AMPA. A bioacumulação em alimentos não é esperada devido a sua característica iônica e a sua solubilidade em água (WHO, 2003).

### 3.2.5. Classificação toxicológica

Segundo a classificação da OMS, o glifosato, por apresentar sua DL<sub>50</sub> em ratos, na forma do ácido de N-(fosfometil)glicina, de 4.230 mg/kg de peso corporal para o estado sólido e de mais de 5.000 mg/ kg de peso corporal para o estado líquido, é enquadrado como um produto improvavelmente causador de risco agudo em uso normal continuado (WHO, 1994; WHO, 2000). Segundo

LARINI (1999) a DL<sub>50</sub> do glifosato é de 4.870 e 1.570 mg/kg de peso corporal para ratos e camundongos, respectivamente.

No Brasil, as formulações contendo glifosato, na sua maioria encontram-se na forma de sal de isopropilamina e são classificadas pelo Ministério da Saúde, quanto à toxicidade, como produto da Classe IV - pouco tóxico. No entanto, existem produtos que foram enquadrados como Classe III - medianamente tóxico, como alguns na forma de sal de potássio (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, sd).

### **3.3. Epidemiologia**

Os agrotóxicos, sobre o ponto de vista de possível contaminante para seres humanos, merecem uma especial atenção. A exposição ocupacional primária afeta os trabalhadores da agricultura diretamente envolvidos nos afazeres rurais, os das indústrias de pesticidas, os implicados no transporte e armazenamento e os que fazem a aplicação destes produtos em saúde pública e em vias de transporte. Secundariamente, podem contaminar a população em geral através do consumo de água e alimentos contaminados e a população residente das áreas agrícolas, ainda podendo ocorrer no uso doméstico em áreas urbanas ou agrícolas (MARONI *et al.*, 2000).

A Fundação Oswaldo Cruz recomenda aos centros de assistência toxicológica a seguinte classificação das exposições: aguda-única, há uma única exposição; aguda-repetida, há mais de uma exposição em um período inferior a quinze dias; crônica, ocorrendo por mais de quinze dias; e aguda sobre crônica, onde há uma exposição aguda em indivíduos cronicamente expostos à mesma substância (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/FIOCRUZ, 2006).

As pesquisas de agrotóxicos como contaminantes das águas são de grande importância, deste modo se faz necessário em estudo não apenas os ingredientes ativos das formulações, mas também os produtos gerados da sua degradação. Como exemplo disto, uma pesquisa quantificou os ingredientes ativos e seus produtos de degradação em poços de água em Iowa – USA demonstrou que estes os produtos encontravam-se em frequência e quantidades superiores aos seus compostos de origem. Os produtos de

degradação dos herbicidas representaram oito dos dez mais freqüentes e, apesar as concentrações individuais não terem ultrapassado os limites estabelecidos pelas autoridades locais, mais da metade deles não tinha seus limites máximos aceitáveis estabelecidos. Outra questão é que não são considerados o efeito causado pelo conjunto, uma vez que são levadas em consideração apenas os compostos individualmente (KOLPIN *et al.*, 1999).

Outros trabalhos relataram a contaminação de águas de superfície e do sub-solo por pesticidas em diversos locais do mundo. TAPPE *et al.* (2002) detectaram a presença de atrazina em aquíferos na Alemanha. Na África do Sul, DALVIE *et al.* (2003) encontraram endossulfan, deltametrina, clorpirifós, iprodine, fenarimol em águas de superfície e do sub-solo.

O limite estabelecido em águas para o glifosato é de 5.000 µg/L e para o AMPA valores idênticos têm sido aceitos, embora nenhum valor tenha sido oficialmente adotado (WHO, 2003). O glifosato e o AMPA foram pesquisados em águas de superfície na Holanda durante os anos de 1988 e 1989, onde foram encontradas concentrações de 0,5 a 1,0 µg/L e 6,0 µg/L, respectivamente (WHO, 1994). Nos EUA, os valores encontrados em água filtrada após aplicação aérea direta oscilaram de 90 a 1.700 µg/L quando obtida em açudes e 35 a 1.237 µg/L quando provindas de córregos. No Canadá valores de até 5.153 µg/L foram encontrados após aplicação aérea direta deste herbicida sobre lagos e córregos. Estes valores decresceram até níveis indetectáveis de horas a dias após a aplicação, dependendo da vegetação presente (WHO, 2003).

Outra fonte de exposição aos agrotóxicos é a presença de agrotóxicos em alimentos. VALENZUELA *et al.* (2001) detectaram resíduos de acaricidas e inseticidas em 25,4% das 150 amostras de laranja examinadas na cidade de Valencia – Espanha, e em 2,7% das amostras, dois dos inseticidas analisados encontravam-se em valores acima dos limites máximos permitidos. Pesquisa realizada em amostras de uva na Itália, nos anos de 1996 (481 amostras), 1998 (1.195 amostras) e 1999 (1.949 amostras) demonstrou que 7,9%, 6,5% e 2,5%, respectivamente estavam contaminadas com um dos 16 pesticidas analisados (CABRAS & CONTE, 2001). Resíduos de organoclorados suplantando os limites permitidos foram detectados em carne de cordeiro na

logoslávia (SPIRIC & SACIC, 1998) e em hortaliças na Índia (BAKORE *et al.*, 2002).

No Brasil, ARAÚJO *et al.* (1999) pesquisaram resíduos de endossulfan em 32 amostras de 22 plantações individuais de tomates nas proximidades de Recife. Foram encontrados resíduos em 28% das amostras analisadas com valores de 35 a 510 µg/kg de tomate, embora a legislação, desde 1985, só permita o emprego deste agrotóxico nas culturas de cacau, cana-deaçúcar e café, onde os valores máximos permitidos são 10 ppb para as duas primeiras e 40 ppb para grãos, na última. O hexaclorociclohexano e o endossulfan foram detectados em 0,76 e 10,6% respectivamente, das 132 amostras de leite examinadas na cidade de São Paulo. Outros compostos pertencentes aos grupos dos carbamatos, piretróides, organosforados foram pesquisados e não detectados nas amostras analisadas (CISCATO *et al.*, 2002).

CALDAS & SOUZA (2000) avaliaram o risco crônico dos pesticidas na dieta, por meio do cálculo da Ingestão Diária Teórica Máxima (IDTM) em função dos limites máximos permitidos no Brasil ou no exterior (quando inexistente no país) para cada substância e dos dados de consumo de alimentos fornecidos pelo IBGE. O risco foi medido comparando a IDTM com a Ingestão Diária Aceitável (IDA) do Codex Alimentarius. A IDTM foi maior que a IDA para 23 agrotóxicos em pelo menos uma das 11 regiões metropolitanas avaliadas. Os produtos que mais contribuíram para a ingestão de agrotóxicos foram o arroz, o feijão, as frutas cítricas e o tomate.

Dados referentes ao glifosato são menos freqüentes e geralmente oriundos de exposições provocadas experimentalmente. Segundo a FAO/WHO (1986), o uso do glifosato no pré-plantio não resultou em valores detectáveis do produto nos grãos de cereais (0,05 mg/kg do cereal), entretanto, quando a aplicação foi realizada na pré-colheita, os resultados encontrados oscilaram de 0,2 a 4,8 mg/kg do cereal, sendo a IDA para o glifosato em humanos de 0 a 0,3 mg/kg de peso corporal.

Na Dinamarca, o glifosato é o agrotóxico mais utilizado. A pesquisa do mesmo e do seu metabólito AMPA em cereais destinados ao consumo humano, obtidos das safras de 1998 (49 amostras) e 1999 (46 amostras), revelou-se positiva em 60% das amostras analisadas, com valores médios de 0,08 e 0,11 mg/kg de cereal e máximos de 1,25 e 1,62 mg/kg, respectivamente.

Cálculos realizados a partir das concentrações nos cereais e do consumo humano destes forneceram a estimativa de uma ingestão de 7 µg/dia (GRANBY & VAHL, 2001).

Dados específicos da quantificação de resíduos do glifosato em alimentos no Brasil não foram encontrados, entretanto, cálculos baseados no limite máximo permitido de resíduo e na ingestão de alimentos permitiram concluir que a IDTM deste produto não ultrapassa a IDA nas regiões metropolitanas que foram estudadas (CALDAS & SOUZA 2000).

No que se refere a intoxicações humanas, um relatório da Organização Mundial da Saúde com as Nações Unidas, estima que em 1985 cerca de 3 milhões de pessoas apresentaram envenenamento agudo por pesticidas no mundo causando cerca de 220.000 mortes (WHO, 1990). Dados sobre efeitos específicos da exposição crônica aos pesticidas estimam em 735.000 casos, enquanto que para efeitos inespecíficos, como o câncer, estima-se em 37.000 mortes (JEYARATNAM, 1990). Nos países em desenvolvimento, os índices de envenenamento por agrotóxicos são muito superiores aos dos países desenvolvidos. Segundo JEYARATNAM (1993), os países em desenvolvimento respondem por quase 99% das mortes devidas à intoxicação aguda por pesticidas no mundo, porém representam apenas 20% do consumo mundial destes produtos.

No Brasil, os dados estatísticos relacionados com a exposição a estes produtos são incompletos. Os registros nacional de intoxicações não há discriminação quanto ao composto ativo ou fórmula comercial utilizados, sendo somente reportadas apenas como agrotóxicos no uso agrícola, agrotóxicos no uso doméstico ou raticidas. Durante o ano de 2003 foram registrados no Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) 14.064 casos de intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola, com 164 óbitos. A intoxicação por estes agentes representou 2,76% de um total de 82.716 casos, correspondendo a segunda maior causa de intoxicações no país, sendo menor apenas para as ocasionadas por animais peçonhentos (serpentes), que foi de 6.266 casos. Porém, quanto à letalidade é a primeira, com uma taxa de 2,7% e representando 30,94,% do total de 530 óbitos ocorridos. As principais circunstâncias nas quais ocorreram as intoxicações por agrotóxicos foram tentativa de suicídio (79,88%) e acidente individual (9,15%).

A notificação de casos de intoxicação por agrotóxicos não é compulsória e os Centros de Informações Toxicológicas (CITs) não estão presentes em todos os estados. Além disso, o envio dos dados registrados por estes centros ao SINITOX também não é compulsório, de forma que as estatísticas dos casos registrados estão subestimadas (SINITOX). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990) para cada caso notificado de intoxicação haveriam outros 50 não notificados, o que corresponderia, estimativamente, a 8.200 casos de intoxicação por agrotóxicos no Brasil, durante o ano de 2003. Esses dados caracterizam o evento intoxicação por agrotóxicos e as doenças decorrentes deste como um problema de saúde pública.

São raros os dados específicos constando a discriminação dos agrotóxicos envolvidos. O relatório anual da Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações (APCC), referente ao ano de 2001, registrou 2.267.979 casos oriundos dos 64 centros 24 participantes, dos quais 90.010 (4% do total) foram devidos a pesticidas. O glifosato foi o agente tóxico responsável por 4.426 casos, correspondendo a 0,195% de todas as intoxicações e a 4,92% das referentes aos pesticidas (LITOVITZ, 2002).

Em Santa Catarina, um estudo retrospectivo (COLARES, 2002) realizado com base nos casos registrados no CIT-SC entre abril de 1984 e março de 2000 revelou que neste período houve um total de 36.243 intoxicações, das quais 4.111 por agrotóxicos e destas, 396 foram pelo glifosato. A incidência por 100.000 habitantes dos registros de intoxicações por este produto foi zero em 1984 e cresceu para 1,49 em 1999.

A maioria dos registros de intoxicações refere-se a casos agudos, sendo os devidos à exposição crônica raros e subestimados, seja pela dificuldade no estabelecimento de uma relação causal, ou pela falha ou inexistência de um sistema de registro efetivo para esse tipo de envenenamento. Em consequência destas dificuldades os efeitos desse tipo de exposição sobre a saúde humana estão basicamente condicionados às extrapolações de estudos *in vitro*, em animais de laboratório ou a estudos epidemiológicos (ECOBICHON, 2001).

### **3.4. Efeitos sobre a saúde**

Na literatura científica mundial existem inúmeros trabalhos que associam a exposição aos pesticidas com várias patologias ou alterações em parâmetros do organismo humano (STILLER-WINKLER *et al.*, 1999; BUCKLEY *et al.*, 2000; ARBUCKLE *et al.*, 2001; BEARD *et al.*, 2003, FARAHATT *et al.*, 2003).

Em um estudo de FARAHAT e colaboradores (2003) realizado com homens expostos ocupacionalmente a agrotóxicos organofosforados aplicados nas plantações de algodão, no Egito, os indivíduos expostos apresentaram alterações neurocomportamentais, com performance significativamente menor em testes que avaliavam a abstração verbal, memória, atenção, solução de problemas e resposta visual motora, quando comparados com o grupo controle, da mesma faixa etária, condições socioeconômicas e nível educacional.

Uma pesquisa realizada em agricultores do Colorado-EUA, entre 1992 e 1997, concluiu que havia forte associação entre sintomas de depressão e a exposição aos organofosforados (STALONE; BESELER, 2002a). Outro estudo realizado pelos mesmos autores verificou que a dificuldade de concentração, necessidade de anotação para lembrar de tarefas, dificuldade no entendimento de notícias de jornais e revistas, irritação, palpitação, cefaléia e necessidade de dormir mais que o habitual foram sintomas associados significativamente com a exposição aos organofosforados (STALONE; BESELER, 2002b).

Estudo realizado por BENER e colaboradores (1999) nos Emirados Árabes Unidos, demonstrou que os agricultores expostos aos pesticidas apresentavam alta prevalência de sintomas e patologias respiratórias e dérmicas quando comparados com o grupo controle, como tosse, faringite, bronquite, asma, insuficiência respiratória, pneumonia, sinusite, dermatite de contato, irritação nasal e cutânea, além da redução significativa nos parâmetros de espirometria como um todo e elevação dos níveis da IgE sérica total.

Um estudo epidemiológico realizado por BEARD e colaboradores (2003) sobre trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos no período de 1935 a 1996, revelou uma taxa de mortalidade significativamente alta para diabetes e asma, quando considerado o período total analisado, em comparação com a

população australiana em geral. Este estudo também evidenciou elevada mortalidade para outro grupo de patologias freqüentemente associadas à exposição aos pesticidas, as neoplasias. Neste estudo o câncer de pâncreas apresentou elevada incidência de mortalidade para o período associado ao DDT (1955 a 1962), e as leucemias, especialmente a mielóide aguda, apresentaram uma mortalidade significativa para o período dos químicos modernos (1962 a 1996).

HOAR e colaboradores (1986) realizaram um estudo epidemiológico no Estado do Kansas, no qual verificaram um aumento de seis vezes para o risco de desenvolver linfoma não-Hodgkin (LNH), em agricultores expostos por mais de 20 dias/ano aos herbicidas do grupo dos fenoxiacéticos, quando comparados ao grupo controle da população em geral, sendo que este risco aumentava com o tempo de exposição. Outro estudo epidemiológico realizado em crianças e adolescentes americanos, demonstrou a associação entre o aumento da incidência de LNH com a freqüência no uso doméstico de pesticidas, sem relacioná-lo a um produto ou grupo específico (BUCKLEY *et al.*, 2000). BLAIR e ZAHM (1995) revisaram a freqüência das diferentes causas de morte entre agricultores observando um aumento nas causadas por neoplasias, como a morte por leucemias, LNH, câncer de próstata, cérebro, estômago e lábios, melanoma e sarcoma de tecidos moles, mas havendo uma redução nas mortes por doença cardíaca, câncer de pulmão, bexiga, fígado, cólon, esôfago, reto e rins, quando comparada ao grupo controle.

Também foram avaliadas as conseqüências da exposição aos pesticidas na gestação. Em um estudo retrospectivo, realizado nas Filipinas por CRISOSTOMO e MOLINA (2002) foram comparadas mulheres residentes em áreas agrícolas, onde o uso de pesticidas ocorreu de forma tradicional, pressupondo-se maior exposição aos pesticidas, com mulheres na mesma situação ocupacional, porém, localizadas em áreas onde foram empregadas práticas de manejo integrado de pragas, onde haveria uma menor exposição. A freqüência de aborto espontâneo e anomalias ao nascimento foram significativamente maiores nas mulheres residentes em áreas onde os pesticidas foram empregados de forma tradicional.

Um outro estudo realizado com 2.110 mulheres da população agrícola de Ontário-Canadá avaliou o efeito da exposição aos pesticidas sobre o risco

de aborto espontâneo. Foram analisadas 3.936 gestações e 395 abortos espontâneos. O período da exposição ao agrotóxico (pré-concepção ou pós-concepção) bem como o período do aborto (precoce: menos de 12 semanas de gestação; tardio: 12 a 19 semanas de gestação) foram considerados e os resultados revelaram que o risco de aborto precoce aumentava moderadamente com a exposição préconcepção aos herbicidas do grupo dos fenoxiacéticos e das trizinas e o risco de aborto tardio aumentava fortemente com a exposição pré-concepção ao grupo dos ditiocarbamatos e para o glifosato. Quando relacionados a faixa etária se observou um aumento do risco de aborto para gestantes com mais idade, onde, especialmente com o glifosato, este aumento do risco triplicou (ARBUCKLE *et al.*, 2001). Porém algumas pesquisas tem apresentado resultados controversos, como o de BOLOGNESI e colaboradores (1997). Estes autores obtiveram resultado positivo o ensaio de formação de micronúcleos na medula óssea de camundongos inoculados intraperitonealmente com doses de glifosato menores que as utilizadas por KIER *et al.* (1997), 450 e 550 mg da formulação comercial de glifosato por kg peso corporal, que obtiveram resultado negativo no mesmo tipo de ensaio, com a mesma espécie e via de inoculação.

LIOI e colaboradores (1998a) reportaram a formação de cromossomos aberrantes em linfócitos humanos expostos ao glifosato a partir da concentração de 8  $\mu$ M, em testes realizados *in vitro* (cultura), assim como aumento da atividade da enzima G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) nestas células. Este resultado forneceu uma forte indicação da indução de um estado pró-oxidante como resposta inicial da exposição ao produto, visto que a G6PD catalisa um passo limitante no “*shunt*” da hexose monofosfato além de ser necessária para manter o “*pool*” intracelular da glutathiona reduzida. Estudos dos mesmos parâmetros em linfócitos bovinos apresentaram resultados semelhantes aos anteriores, acrescentando uma significativa redução no índice mitótico não observada com as células de origem humana (LIOI *et al.*, 1998b).

DALLEGRAVE *et al.* (2003) realizaram estudos de teratogenicidade em ratos Wistar com o glifosato na sua formulação comercial Roundup®, em concentrações de 500, 750 e 1000 mg/kg de peso corporal dadas no sexto e décimo quinto dia da gestação. As alterações esqueléticas significantes, observadas nos fetos, foram ossificação incompleta do crânio, dos membros,

do processo de fusão dos segmentos do esterno, ossos interparietais e supraocipitais bipartidos, ausência de vértebra caudal e não ossificação das falanges nas patas traseiras. Alterações esqueléticas ocorreram em 15.4, 33.1, 42.0 e 57.3% dos fetos nascidos dos grupos controles e tratados com 500, 750 e 1000 mg/kg de peso corporal, respectivamente. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004) caracteriza este herbicida como não mutagênico, não teratogênico e não carcinogênico.

DARUICH e colaboradores (2001) avaliaram a atividade da isocitrato desidrogenase (ICD), G6PD e malato desidrogenase (MD), enzimas com função na geração de NADPH. Os órgãos analisados foram o fígado, coração e cérebro das ratas prenhas e de seus fetos. Os resultados demonstraram várias alterações, desde inibições significantes até elevações significantes da atividade para as diferentes enzimas e para a mesma enzima, dependendo da dose e/ou do tecido analisado.

Em um estudo *in vitro* foi testado o efeito do glifosato sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e fosfatase ácida (AcP) em amostras de soro obtido de doadores clinicamente saudáveis. Foram utilizadas dez concentrações numa faixa de 5 a 2000 mM do glifosato, as quais apresentaram efeito sobre todas as enzimas, exceto para a AcP, demonstrando a toxicidade do mesmo nas condições testadas. As concentrações que inibiram 50% da atividade enzimática após incubação de 1 h a 37 °C (Ic50) foram 714, 750, 54, 270, 71 mM para a AChE, LDH, AST, ALT e ALP, respectivamente (EL-DEMERDASH *et al.*, 2001).

Outro aspecto que tem sido objeto de estudo é o efeito do glifosato sobre o ciclo celular. MARC *et al.* (2002) utilizaram um modelo universal de estudo da regulação do ciclo celular para pesquisar a interferência do glifosato (Roundup®) sobre o mesmo e os resultados obtidos demonstraram que este produto interfere no ciclo celular retardando a ativação do complexo regulador, o CDK1/ciclina B. Considerando a universalidade do complexo regulador CDK1/ciclina B entre as espécies, a segurança deste herbicida para a saúde humana é passível de questionamento.

Devido ao importante papel que o sistema imunológico desempenha no organismo como um todo e na prevenção da instalação e desenvolvimento

de neoplasias e outras doenças, pesquisas têm sido realizadas abordando o efeito dos agrotóxicos sobre diferentes parâmetros da imunidade. STILLER-WINKLER e colaboradores (1999) reportaram que trabalhadores rurais expostos aos pesticidas apresentaram prejuízo da função imune por célula mediada, onde houve um aumento de TNF e redução da IgM circulante no soro, que se correlacionava com a duração da exposição. COLOSIO e colaboradores (1999) relataram desde efeitos discretos até evidentes alterações dos parâmetros imunológicos relacionados com a exposição aos pesticidas, entretanto, ainda não estão estabelecidas correlações entre estas alterações e o desenvolvimento de doenças.

EL-GENDY, ALY e EL-SEBAE (1998) expuseram peixes (*Tilapia nilótica*) ao glifosato em uma concentração de 1/1000 da recomendada para uso em plantações, por um período de 1 a 96 h. Foram avaliadas as respostas imunes celular e humoral e os resultados demonstraram reduções significativas em ambas. A resposta imune celular foi significativamente reduzida em todos os períodos de exposição e frente a todos os mitógenos testados, (fitohemaglutinina, concanavalina A e lipopolissacarídeo), sendo que os maiores índices foram alcançados após quatro semanas. A imunidade humoral, avaliada através da formação de placas por células esplênicas após inoculação de eritrócitos de ovelha, foi suprimida de maneira dose dependente decrescendo conforme o tempo.

Entretanto, um estudo de BLAKLEY (1997) mostrou que a produção de anticorpos por células esplênicas de camundongos expostos ao glifosato não apresentou diferenças significativas, mesmo em doses até 75 vezes maiores do que as que poderiam ser encontradas em pastagens sob condições normais de aplicação.

### **3.5. Barreira Hemato-Encefálica (BBB)**

O microambiente cerebral é separado das flutuações de íons e da concentração de metabólitos do sangue por duas estruturas, uma que separa o sangue sistêmico da circulação do fluido intersticial, definida como barreira hemato-encefálica (BBB), e outra que separa o sangue do fluido cerebrospinal (CSF), denominada barreira hemato-CSF (ZHENG *et al.*, 2003). Estas

barreiras participam ativamente de vários aspectos do funcionamento cerebral, como o envolvimento nos primeiros estágios de desenvolvimentos cerebral, na maturação cerebral, na homeostasia do sistema nervoso central (SNC) e na regulação drogas (STRAZIELLE & GHERSI-EGEA, 2000a, 2000b; ZHENG, 2001a, 2001b). Sendo assim vários estudos têm sido feitos para compreender a influência fisiopatológica das barreiras em distúrbios neuronais, como edema cerebral induzido por químicos, desenvolvimento cerebral anormal e o possível início de doenças neurodegenerativas (ZHENG *et al.*, 2003).

A BBB é formada por células endoteliais que são ligadas umas as outras por junções oclusivas, as quais isolam o cérebro do sangue. Mas estas junções não se apresentam tão fortes em todas as regiões, como no plexo coróide. Desta maneira drogas hidrofílicas e tóxicos podem ter acesso, em uma extensão limitada, ao cérebro através do plexo coróide. Primeiro, estas trocas se dão devido a não usual localização e organização histológica do epitélio coróide e, segundo, este tecido tem grande capacidade de metabolização de drogas (STRAZIELLE & GHERSI-EGEA, 2000a).

Diferentes transportadores, sozinhos ou ligados ao metabolismo intracelular de drogas, tanto formam uma eficiente barreira funcional a diferentes compostos tóxicos e drogas como aceleram a eliminação de metabólitos endógenos tóxicos, assim como xenobióticos e drogas de fora do CSF, influenciando sobre a sua biodisponibilidade no cérebro (SUZUKI *et al.*, 1997; GHERSI-EGEA & STRAZIELLE, 2002).

Ao contrário de outros tecidos e órgãos do corpo, a função normal do cérebro se deve a uma delicada coordenação da atividade neuronal. Pequenas mudanças na química cerebral podem ter um profundo impacto na aprendizagem, memória e comportamento. Ademais, danos cerebrais induzidos por químicos são altamente seletivos em algumas áreas do cérebro, mas não em outras. Desta mesma maneira ocorre uma disposição química seletiva no SNC, onde a BBB tem papel determinante e pode contribuir para os padrões únicos de sensibilidade de regiões cerebrais a neurotóxicos. Isto se deve a diferentes fluxos sangüíneos, composição celular, variação morfológica, padrões de expressão de proteínas, funcionamento das junções oclusivas e o efeito dos tóxicos sobre estas porções da barreira. Sendo assim, as barreiras

protegem os tecidos neurais contra agentes químicos orgânicos e inorgânicos através de mecanismos complementares diferentes (ZHENG *et al.*, 2003).

### **3.6. O sistema imune e suas interações neuroimunocomportamental**

A resposta imune compreende a uma variedade de mecanismos de controle cuja finalidade é restaurar o estado de repouso do organismo quando este gera uma resposta a determinado antígeno, qualquer partícula não-própria ao organismo, onde em uma resposta imune eficiente o resultado final do reconhecimento do antígeno pelo organismo e as interações entre o antígeno e uma rede de células imunologicamente competentes acarretará na eliminação do antígeno (PEAKMAN & VERGANI, 1999; ROIT *et al.*, 1999).

A resposta imune pode ser dividida basicamente em dois níveis de defesa contra agentes externos: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata ou natural age como a primeira linha de defesa contra as infecções, sendo os monócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares as células responsáveis pela defesa. A imunidade inata, esta é amplamente mediada pelos granulócitos, que formam coleção de células, muitas das quais aptas a ingerir e destruir microrganismos (ROIT *et al.*, 1999).

A resposta imune adaptativa é altamente específica e desencadeada pela presença de um agente estranho que não foi eliminado inicialmente pelo sistema imune inato. As respostas adaptativas são mediadas por linfócitos, que proporcionam a imunidade duradoura, ou seja, esta possui memória, manifestada após a doença ou a vacinação. Os linfócitos são as células centrais das respostas imunes adaptativas uma vez que reconhecem, especificamente, patógenos individuais; quer eles estejam localizados no interior das células do hospedeiro, quer se localizem nos fluídos teciduais ou no sangue (ROIT *et al.*, 1999).

Existem vários tipos de linfócitos, mas eles podem ser enquadrados em duas categorias básicas: linfócitos T e linfócitos B. Os linfócitos B combatem patógenos extracelulares e seus produtos através da liberação do anticorpo, uma molécula que, especificamente, reconhece uma molécula-alvo (antígeno) e se liga a ela. O antígeno por sua vez pode ser uma molécula na

superfície de um patógeno ou uma toxina produzida pelo patógeno. Já os linfócitos T possuem uma ampla variedade de atividades, sendo principalmente a coordenação da resposta imune. Os linfócitos T ainda podem estar envolvidos no controle da produção e diferenciação dos linfócitos B e na produção de anticorpos (produção clonal), outros podem interagir com as células fagocitárias facilitando a localização e a destruição dos antígenos, e um terceiro grupo reconhece e destrói células infectadas por patógenos (ROIT *et al.*, 1999).

A resposta imune humoral à antígenos envolve a produção de anticorpos pelos plasmócitos, linfócitos B diferenciados, a ligação deste anticorpo ao antígeno e a eliminação deste pelas células acessórias e por moléculas do sistema imunológico (citocinas). A resposta humoral requer usualmente a ação de células T auxiliares que liberam sinais químicos para que haja a produção de anticorpos específicos para um fragmento peptídico do antígeno. Neste caso, o linfócito B prolifera e se diferencia no microambiente especializado dos tecidos linfóides, onde a hipermutação somática gera diversidade nas imunoglobulinas de superfície da célula B, e as células B que ligam o antígeno mais avidamente são selecionadas para diferenciação posterior pelo contato com o antígeno na superfície de células dendríticas foliculares. Tais eventos possibilitam que a afinidade dos anticorpos aumente no decurso de uma resposta humoral e especialmente nas respostas repetidas ao mesmo antígeno (JANEWAY *et al.*, 2002).

As células T auxiliares também direcionam a variação de isótipo, o que leva a produção de anticorpos de vários isótipos que podem ser distribuídos pelos diversos compartimentos do corpo (SCROFERNEKE & POHLMANN, 1998).

As imunoglobulinas, também conhecidas como anticorpos, são proteínas encontradas no sangue e em outros fluídos corporais que fornecem a especificidade para o sistema imunológico natural. As imunoglobulinas são encontradas na superfície dos linfócitos B ou como proteínas solúveis produzidas por plasmócitos, linfócitos-B diferenciados, e sua função consiste em se ligar a substâncias não-próprias do corpo desencadeando uma reação que leva a eliminação do antígeno. As imunoglobulinas também podem se ligar a antígenos, não necessariamente patogênicos e assim dar início a uma

reação imunológica, podendo neutralizar toxinas bacterianas, fazendo com que eles possam ser instrumentos úteis de diagnóstico (SCROFERNEKE & POHLMANN, 1998; STITES *et al.*, 1992).

Na maioria dos mamíferos superiores existem cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulinas, de mesma estrutura básica, que são designadas de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. Estas imunoglobulinas diferem em tamanho, conformação espacial, cargas elétricas, composição de aminoácidos e no conteúdo de carboidratos (ROIT *et al.*, 1999). O que conferem a elas funções diferentes (STITES *et al.*, 1992).

Elas são moléculas bifuncionais que se ligam a antígenos e, também, iniciam fenômenos biológicos, independente da especificidade do anticorpo (STITES *et al.*, 1992).

A IgM é a primeira imunoglobulina produzida na resposta humoral (PEAKMAN & VERGANI, 1999), predominando na primeira fase da resposta imune e depois tendendo a ser menos abundante (STITES *et al.*, 1997). Desempenha um papel na proteção contra infecções na corrente circulatória, enquanto isotipos mais maduros, como a IgG, se difundem nos tecidos (JANEWAY *et al.*, 2002), por isto engloba certas respostas de anticorpo, como os anticorpos “naturais” para os grupos sangüíneos (STITES *et al.*, 1992).

A IgM é basicamente um pentâmero composto de cinco monômeros de IgM unidos pela cadeia J, possuindo assim múltiplos domínios funcionais, com dez sítios de ligação com o antígeno. Por utilizar múltiplos sítios de ligação pode intensificar a ligação com anticorpos de afinidade mais baixa, o que é uma vantagem fundamental da resposta primária (PEAKMAN & VERGANI, 1999). Ela constitui, aproximadamente 10% das imunoglobulinas do soro normal (STITES *et al.*, 1997), mas não possui a alta afinidade observada nos isotipos tardios (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

A IgM é ainda um potente ativador do complemento (PEAKMAN & VERGANI, 1999), onde apenas uma única molécula de IgM ligada ao antígeno é capaz de desencadear a cascata do complemento, e é a Ig mais comumente expressa na superfície de células B (STITES *et al.*, 1992, STITES *et al.*, 1997) e particularmente em linfócitos B imaturos (STITES *et al.*, 1997).

A IgG corresponde a 75% do total das imunoglobulinas séricas e é a imunoglobulina mais abundante produzida durante a resposta humoral

secundária no sangue (STITES *et al.*, 1997). Ela ocorre como um monômero e esta classe pode ser dividida em quatro subclasses, sendo estas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, com concentrações relativas de 60 a 70% IgG1, 14 a 20% IgG2, 4 a 8% IgG3 e 2 a 6% IgG4 (STITES *et al.*, 1992). Além da concentração sérica, a habilidade de exercer funções efetoras varia conforme a subclasse (PEAKMAN & VERGANI, 1999).

É uma das principais ativadoras da via clássica do complemento, capaz de fixá-lo no soro. Através de receptores da porção Fc o anticorpo pode ligar-se recrutar e ativar fagócitos mononucleares e polimorfonucleares, assim como natural killers, estimulando a função citotóxica, e facilitam a opsonização por estes (STITES *et al.*, 1992).

É a única imunoglobulina que atravessa a placenta, através de processo ativo, conferindo imunidade ao recém-nascido em seu primeiro mês de vida (PEAKMAN & VERGANI, 1999, STITES *et al.*, 1992, STITES *et al.*, 1997).

O sistema imune é regulado pelos sistemas sensorial, simpático, parassimpático, por citocinas e hormônios, sendo que entre estes últimos, os glicocorticóides possuem importante função reguladora do sistema imune (MCEWEN *et al.*, 1997; MCCABE *et al.*, 2000).

As citocinas são um grupo heterogêneo de mensageiros moleculares produzidas pelas células imunocompetentes, como linfócitos e macrófagos, para regular as respostas imunes. Elas podem ser divididas em duas categorias gerais, sendo classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Tabela 3.6.) (KRONFOL & REMICK, 2000).

Tabela 3.6. Algumas citocinas e suas características.

Citocina	Família	Célula produtora	Categoria	Expressão central da citocina e seu receptor
Interleucina-1	Não determinada	Macrófagos	Pró-inflamatória	+
Interleucina-2	Hematopoetinas	Células T	Pró-inflamatória	+
Interleucina-4	Hematopoetinas	Células T	Anti-inflamatória	?
Interleucina-6	Hematopoetinas	Macrófagos, células T	Pró-inflamatória	+
Interleucina-8	Quimocinas	Macrófagos	Nenhuma	+
Interleucina-10	Não determinada	Macrófagos, células T	Anti-inflamatória	+
Interleucina-12	Não determinada	Macrófagos, células B	Pró-inflamatória	?
Interleucina-13	Hematopoetinas	Células T	Anti-inflamatória	?
TNF- $\alpha$	Família TNF	Macrófagos, células NK	Pró-inflamatória	+
TNF- $\beta$	Família TNF	Células T, células B	Pró-inflamatória	+
Interferon- $\alpha$	Interferons	Leucócitos	Pró-inflamatória	+
Interferon- $\gamma$	Interferons	Células T, células NK	Pró-inflamatória	+

Adaptado de SCHIEPERS *et al.*, 2005.

Nas últimas décadas tem se investigado as interações que ocorrem entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico (Fig. 3.3). O cérebro não é mais visto como um órgão imunologicamente favorecido que é separado completamente das células imune circulantes pela BBB e apresenta uma alterada ou reduzida resposta imune (SHIEPERS *et al.*, 2005) e se tem procurado elucidar as influências recíprocas entro o sistema nervoso e o imunológico e seus efeitos na saúde e no comportamento (LOZOVAYA & MILLER, 2003).

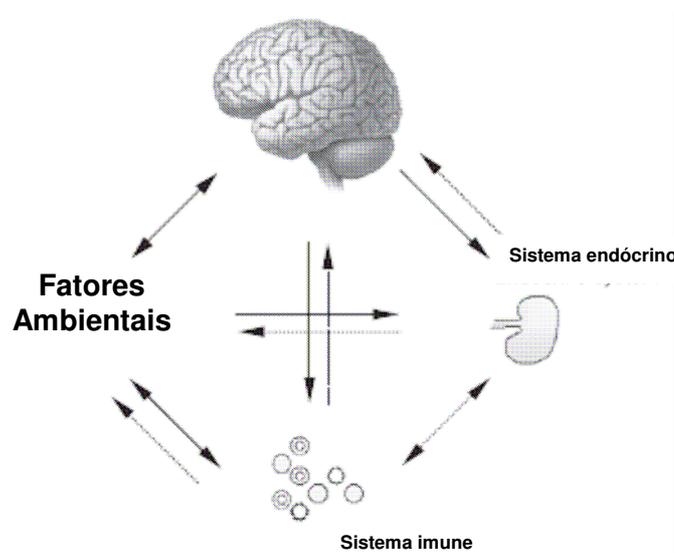


Figura 3.3. Vias de comunicação entre o SNC e demais sistemas, onde a maioria delas é bidirecional. As linhas sólidas indicam conexões neurais e as linhas tracejadas indicam conexões humorais. Fonte: SCHIEPERS *et al.*, 2005.

O conceito de uma comunicação bidirecional entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) levou ao questionamento sobre o papel desempenhado por ele, além das interações cérebro-imunes corriqueiras, como no envolvimento de neuropatologias (MILLER *et al.*, 1999).

Uma patologia associada com a atividade funcional do sistema imune é a depressão maior, que é relacionada com a ativação do sistema de resposta inflamatória. A ativação imune periférica, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias é responsável pela variedade de alterações comportamentais, neuroendócrinos e neuroquímicos associada com esta condição psiquiátrica (SHIEPERS *et al.*, 2005).

Um outro comportamento causado pelas citocinas secretadas pelo sistema imune periférico é o “comportamento doentio” (*“sickness behavior”*), que são os efeitos fisiológicos e psicológicos da ativação imune durante o quadro de infecção. Este “comportamento de doença” é tipicamente acompanhado por febre e uma variedade de respostas comportamentais, como diminuição do apetite, anorexia, perda de peso, retardo da atividade motora, redução do interesse pelo ambiente físico e social, perda da libido, redução das habilidades cognitivas, disforia, anedonia e humor depressivo (DANTZER *et al.*, 1999; YIRMIYA *et al.*, 2000; DANTZER, 2001). A maior parte destas respostas é mediada pelo hipotálamo, e estas mudanças comportamentais aparentam ser uma expressão de um estado de motivação central que reorganiza as prioridades do indivíduo doente de maneira a lidar com a fonte de infecção (DANTZER, 1999).

Sendo o comportamento um conjunto de ações ou reações que uma pessoa ou animal tem em resposta a um estímulo interno ou externo (THE AMERICAN HERITAGE, 2002), toda e qualquer influência que os produtos da atividade imune possam causar sobre o mesmo torna-se um interessante objeto de estudo.

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é o principal componente neuroendócrino que responde aos estímulos do sistema imune, através da secreção de catecolaminas e glicocorticóides da córtex da adrenal, modulando a resposta imune. O problema reside quando há um longo período de exposição aos mesmos, podendo ser gerada uma gama de alterações no sistema imune (FRANCIS *et al.*, 1999).

Através desta perspectiva, se faz interessante a abordagem da interação destes aspectos já que não há estudos que abordem as interações entre os sistemas nervoso, imunológico e o comportamento sobre a influência do glifosato.

## **4 METODOLOGIA**

#### **4.1. Aprovação na Comissão de Ética**

Esta dissertação está inserida no projeto: “Estudos voltados para os efeitos da utilização de agrotóxicos e outros agentes na produção agrícola, sobre a saúde ocupacional e ambiental”, que foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animal da Universidade Federal de Santa Catarina, tendo sido aprovado conforme ofício 146/CEUA/DAP/PRPG, de 04 de julho de 2001.

#### **4.2. Animais**

Foram utilizados 70 camundongos isogênicos BALB/c, com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), sendo mantidos em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas e com temperatura ambiente entre 22 e 24°C. Água e ração foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período do experimento. Os animais foram utilizados de acordo com as normas do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da UFSC.

#### **4.3. Grupos experimentais**

Foram utilizados seis grupos experimentais compostos de 10 animais cada, sendo tratados da seguinte maneira:

- a) Grupo controle (controle): animais inoculados oral e intraperitonealmente com salina.
- b) Grupo OVA (O): animais inoculados oralmente com salina e intraperitonealmente com OVA.
- c) Grupo glifosato-1/10 (G-1/10): animais inoculados oralmente com glifosato e intraperitonealmente com salina.
- d) Grupo glifosato-1/100 (G-1/100): animais inoculados oralmente com glifosato e intraperitonealmente com salina.
- e) Grupo glifosato-1/10 e OVA (G-1/10+O): animais inoculados oralmente com glifosato e intraperitonealmente com OVA.
- f) Grupo glifosato-1/100 e OVA (G-1/100+O): animais inoculados oralmente com glifosato e intraperitonealmente com OVA.

#### **4.4. Inoculação de glifosato**

Os grupos Glifosato-1/10 (G-1/10) e Glifosato-1/10 e OVA (G-1/10+O) foram inoculados por gavagem intragástrica com 0,1ml de glifosato na dose de 1/10 da LD<sub>50</sub> para camundongos (LD<sub>50</sub>=1570mg/kg de peso corporal), e os grupos Glifosato-1/100 (G-1/100) e Glifosato-1/100 e OVA (G-1/100+O) foram inoculados por gavagem intragástrica com 0,1ml de glifosato na dose de 1/100 da LD<sub>50</sub> para camundongos (LD<sub>50</sub>=1570mg/kg de peso corporal). A água destilada foi usada como veículo nos inóculos. Os inóculos foram administrados em intervalos de 48 horas, por um período de 30 dias. (BENEDETTI *et al.*, 2004)

#### **4.5. Inoculação de OVA**

Os grupos OVA (O) e Glifosato e OVA (G/O) foram inoculados com 180µg de ovalbumina contidos em 0,2ml de solução fisiológica (TOMAI *et al.*, 1999), nos tempos 0, 7, 14, 21 dias. Todos os inóculos foram realizados por via intraperitoneal e sem a adição de adjuvantes.

#### **4.6. Testes comportamentais**

Todos os animais de todos os grupos foram submetidos aos três testes comportamentais, sendo estes realizados da seguinte maneira: primeiramente foi realizado o teste do campo aberto, o segundo teste aplicado foi o labirinto em cruz elevado, realizado oito horas após o primeiro teste, e o último teste aplicado foi o nado forçado, realizado cinco horas após o segundo teste.

##### **4.6.1. Campo aberto**

No teste de campo aberto (HOLLAND & WELDON, 1968) cada animal foi colocado no centro de um aparato, o qual consiste em uma base retangular (60,0 cm X 50,0 cm), dividida em 12 quadros iguais e cercada por muros de 40 cm de altura. A iluminação foi feita com uma lâmpada de 60W posicionada a 90cm do centro do chão do aparato. Durante 10 minutos foram registrados o tempo de duração total da permanência do animal nos quadrados centrais e nos periféricos e o número total de quadrados percorridos por ele. O número

total de quadrados percorridos serviu como meio de mensuração da atividade locomotora geral na arena.

#### 4.6.2. *Labirinto em cruz elevado*

O labirinto em cruz elevado, um teste amplamente utilizado baseado na aversão natural de roedores a altura e espaços abertos, foi originalmente desenvolvido por PELLOW *et al.* (1985). O número e a percentagem de entradas nos braços abertos, assim como o tempo de permanência nos braços é usualmente utilizado para caracterização de efeitos ansiolíticos de drogas, sendo usado assim para avaliação do parâmetro comportamental de ansiedade (PELLOW & FILE, 1986; RODGERS *et al.*, 1997). O labirinto em cruz consiste em dois braços abertos e dois braços fechados, elevados 45,0 cm do chão. Cada braço apresenta 25,0 cm de comprimento e 5,0 cm de largura. Os braços fechados possuem lados de 15,0 cm de altura, enquanto os braços abertos não possuem lados. No início de cada triagem, o camundongo foi colocado no centro do labirinto de frente para um dos braços abertos. Durante 5 minutos foram registradas as entradas em cada braço e o tempo de permanência nos mesmos, sendo que um braço é considerado visitado quando o animal entra com as quatro patas neste. Ao fim da triagem o camundongo foi removido e o labirinto limpo com água.

#### 4.6.3. *Nado forçado*

O teste é o mais comumente utilizado como teste preditivo de ação antidepressiva de drogas, sendo utilizado para a avaliação do parâmetro comportamental de depressão. O teste de nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1978) consiste em um cilindro de 10 cm de diâmetro por 25 cm de altura, contendo 19 cm de água a 23-25°C. Os camundongos foram colocados dentro dos mesmos gentilmente e foi medido o tempo de duração total da imobilidade durante apresentado durante 6 minutos de observação. Cada camundongo foi considerado imóvel quando este parou de se debater e se manteve flutuando na água, fazendo apenas movimentos necessários para manter a cabeça fora da água.

#### **4.7. Coleta de sangue**

As amostras de sangue foram coletadas no dia seguinte aos testes comportamentais e imediatamente antes do início da perfusão dos animais, através de punção cardíaca, com seringa heparinizada, com os camundongos anestesiados superficialmente com Éter P.A. O animal foi colocado em posição deitado em suporte apropriado e o local a ser puncionado limpo com álcool. A agulha foi introduzida até encontrar o coração e o sangue foi aspirado lentamente até se obter o volume desejado, retirando-se por final a agulha do animal (HARKNESS & WAGNER,1993). Uma vez obtido o soro, este foi armazenado em freezer sob temperatura de 15° C negativos.

#### **4.8. Coleta do encéfalo**

Depois de sacrificados, o cérebro dos camundongos foi retirado. Uma amostra do mesmo foi destinada para avaliação da barreira hemato-encefálica, enquanto o restante foi homogeneizado e destinado à dosagem de IgG e IgM.

#### **4.9. Avaliação da integridade da barreira hemato-encefálica (BBB)**

A integridade da barreira hemato-encefálica foi acessada utilizando-se o extravasamento de azul de Evans. Foram injetados 100µl de azul de Evans (1% em salina) através da veia caudal do animal. Seis minutos após a injeção, os camundongos foram anestesiados com 200µl hidrato de cloral a 7% contido em água destilada e intracardialmente perfusados com 50ml de paraformoldeído a 4% e 50ml de salina, respectivamente (HELLAL *et al.*, 2004). Amostras de cérebro foram homogeneizadas em ácido tri-cloro acético a 60% e centrifugadas. A absorbância do extrato tingido no sobrenadante foi determinada com filtro de 620nm em leitor de ELISA e a quantificação de azul de Evans contida no tecido foi estabelecida através de uma curva linear padronizada e expressa como gramas de azul de Evans por grama de tecido (CERNAK *et al.*, 2004).

#### **4.10. Dosagem de IgM e IgG totais**

Foram analisados os níveis de IgM e IgG no sangue periférico e cérebro total de animais dos grupos experimentais. A dosagem foi feita em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, feita em poliestireno. Os poços

foram sensibilizados, por 12 horas a 4°C, com 100 µl por poço, de uma solução de anticorpo anti-IgM (IgM cadeia-κ específica anti-camundongo produzido em cabra - Zymed) ou anticorpo anti-IgG (IgG porção H+L específica anti-camundongo produzido em cabra - Zymed) na concentração de 20µg/ml e 10µg/ml, respectivamente, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Transcorrido o tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e bloqueadas com PBS-T20 0,05% + M5% (leite mólico a 5,0%) (UCHÔA *et al.*, 1999) por 60 minutos à temperatura ambiente, em um volume de 100 µl por poço (TOMAI *et al.*, 1999).

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas com os soros a serem testados diluídos em 1:5, em um volume total de 50 µl/poço, com PBS-T20 0,05 % + M1 % sendo incubados por 120 minutos a 37°C. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05%.

Após a lavagem das placas, foi adicionado o conjugado para IgM (IgM cadeia-κ específica anti-camundongo conjugado com peroxidase produzido em cabra - Sigma) e para IgG (IgG segmento Fab específica anti-camundongo conjugado com peroxidase produzido em cabra - Sigma), em PBS-T20 0,05%, diluído 1:10000 e 1:30000, respectivamente, em um volume de 50 µl/poço, e incubado por 60 minutos a 30°C.

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05 %, e a seguir, 50 µl do substrato foram adicionados a cada poço e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. O substrato enzimático foi preparado na hora do uso, consistindo de 5,0 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peridróxido de hidrogênio).

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 10 µl de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura realizada logo após a interrupção enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm.

#### **4.11. Dosagem de IgM e IgG anti-OVA**

Para a dosagem de IgM e IgG anti-OVA foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços, feita em poliestireno. Os poços foram sensibilizados, por 12 horas a 4°C, com 200 µl por poço, de uma solução de antígeno solúvel de OVA na concentração de 150 µg/ml em tampão

carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. Transcorrido o tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05 % e bloqueadas com PBS-T20 0,05 % + M5 % (leite molico a 5 %) (UCHÔA *et al.*, 1999) por 60 minutos à temperatura ambiente, num volume de 200 µl por poço (TOMAI *et al.*, 1999).

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05 % e incubadas com os soros a serem testados, diluídos em 1:5, em um volume final de 50µl/poço, com PBS-T20 0,05 % + M1 % sendo incubados por 120 minutos a 37°C. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05%.

Após a lavagem das placas, foi adicionado o conjugado para IgM (Goat anti-mouse IgM  $\kappa$ -chain specific peroxidase conjugate - Sigma) e para IgG (Goat anti-mouse IgG Fab specific peroxidase conjugate - Sigma), em PBS-T20 0,05%, diluído 1:10000 e 1:30000, respectivamente, em um volume de 50µl/poço, e incubado por 60 minutos a 30°C.

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05 %, e a seguir, 50 µl do substrato foram adicionados a cada poço e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. O substrato enzimático foi preparado na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de 30 %H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peridróxido de hidrogênio).

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 10 µl de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura foi feita logo após a interrupção enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm.

#### **4.12. Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados foi utilizando o programa Statistica/w 5.0. Os níveis de significância foram avaliados através de teste estatístico paramétrico ANOVA de uma via, seguido do teste pos-hoc de Tukey HSD. Os dados foram considerados significantes para P<0,05.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1. Integridade da barreira hemato-encefálica**

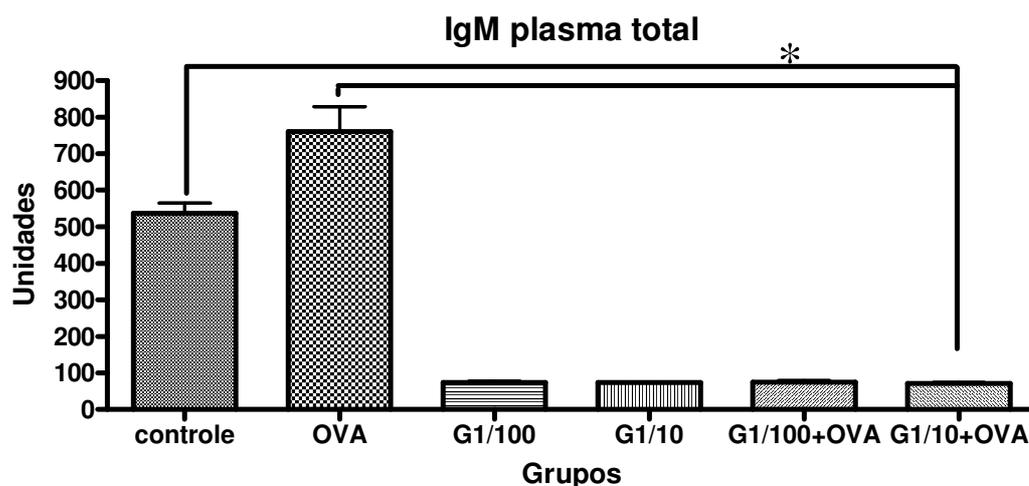
A integridade da BBB foi acessada através do extravasamento de Azul de Evans, e os valores de corante encontrados para todos os grupos não apresentaram diferenças significativas. Isto nos leva a conclusão de que não há um dano na estrutura física da barreira, não ocorrendo permeabilização aleatória. Se a permeabilidade da BBB é afetada para a passagem de determinadas substâncias específicas, o que não pode ser avaliado através deste teste, esta modificação provavelmente se deve a mecanismos fisiológicos específicos.

### **5.2. Parâmetro imune humoral**

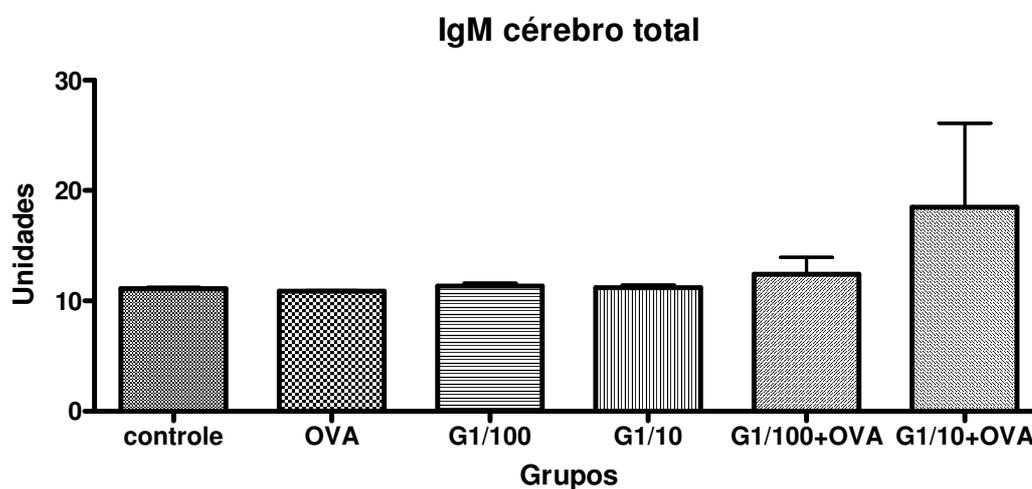
#### *5.2.1. Dosagem de IgM total*

Os valores de IgM presentes no plasma dos grupos controle e OVA mostraram-se significativamente maiores que os apresentados nos demais grupos (Fig. 5.1). Já para a IgM contida no cérebro houve uma inversão deste quadro, onde o grupo G1/100+OVA apresentou os maiores valores, não sendo estes significativamente diferentes dos demais grupos.

Podemos observar um efeito supressor significativo da produção de IgM quando há a administração do glifosato, mesmo quando há o estímulo do desafio antigênico. Interessantemente observamos que o nível de IgM intracerebral apresentou um aumento em relação ao grupo controle (Fig. 5.2). Este resultado sugere que a média maior de IgM no cérebro deve-se não a uma maior produção do anticorpo, mas sim por um aumento da entrada do mesmo, já que não há a produção desta imunoglobulina no SNC, por um estímulo de co-administração de glifosato e OVA.



**FIGURA 5.1.** Determinação dos valores de anticorpos IgM, avaliados pelo método de ELISA, presentes no plasma do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p < 0.001$ ;  $F = 115.4$ ; Tukey,  $*p < 0.05$ ).

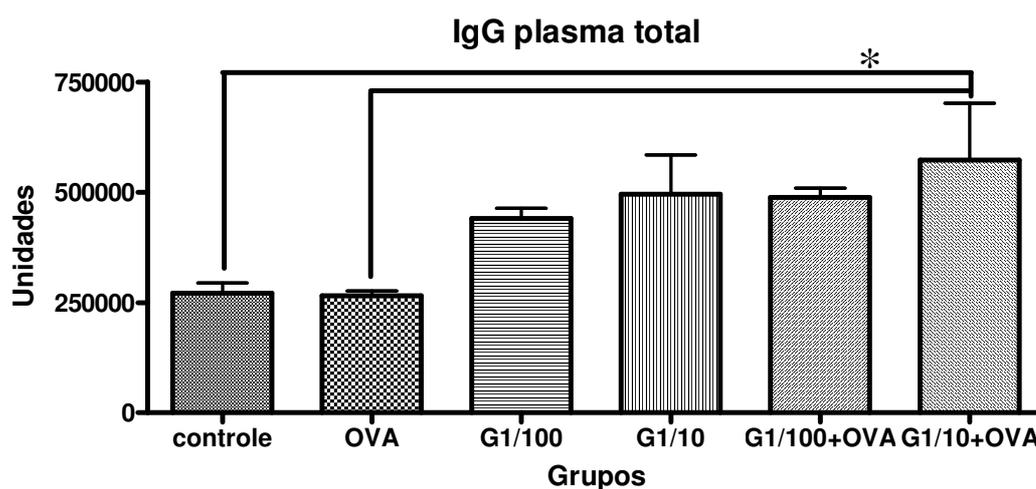


**FIGURA 5.2.** Determinação dos valores de anticorpos IgM, avaliados pelo método de ELISA, presentes no cérebro do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.5214$ ;  $F = 0.8488$ ).

### 5.2.2. Dosagem de IgG total

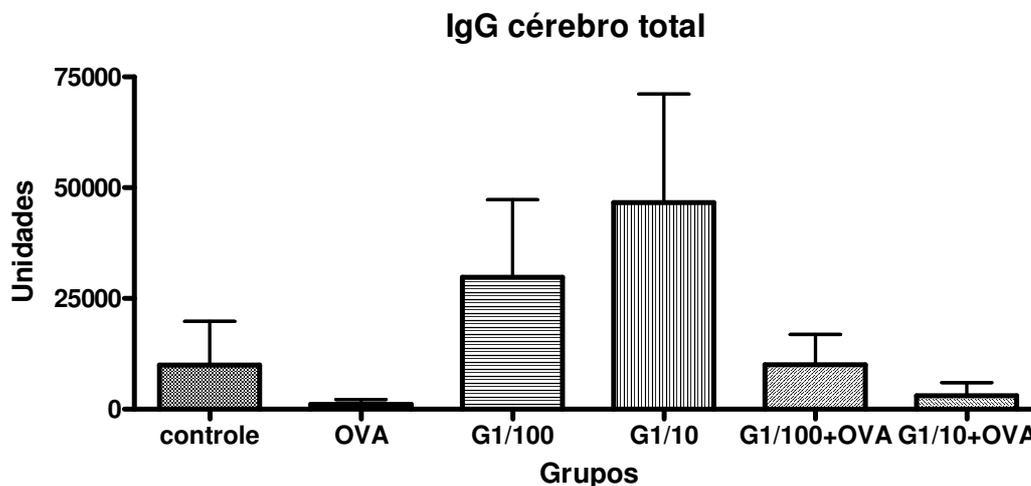
O grupo G1/10+OVA apresentou a maior média valores de IgG presentes no plasma, diferindo significativamente dos grupos controle e OVA (Fig. 5.3). No compartimento cerebral as maiores médias dos valores de IgG ocorreram nos grupos G1/100 e G1/10, apesar disto não houve diferenças significativas entre os grupos devido à grande variação apresentada dentre os mesmos.

Ao contrário do observado nos dados de IgM, podemos observar um aumento de produção de IgG quando houve a administração do glifosato, tendo a co-administração de OVA um pequeno efeito aditivo, estimulando a produção do anticorpo. Quando observamos os gráficos deste anticorpo no cérebro, nota-se uma maior entrada de anticorpos no cérebro novamente não ligada a um aumento da produção deste, mas por um aumento da entrada dos mesmos, que é revertida para valores próximos aos do grupo controle havendo a co-administração de OVA e glifosato. Este efeito é aumentado quando na administração de uma dose maior de glifosato, adquirindo uma característica dose-dependente.



**FIGURA 5.3.** Determinação dos valores de anticorpos IgG, avaliados pelo método de ELISA, presentes no plasma do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10,

G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p < 0.0072$ ;  $F = 3.585$ ; Tukey,  $*p < 0.05$ ).

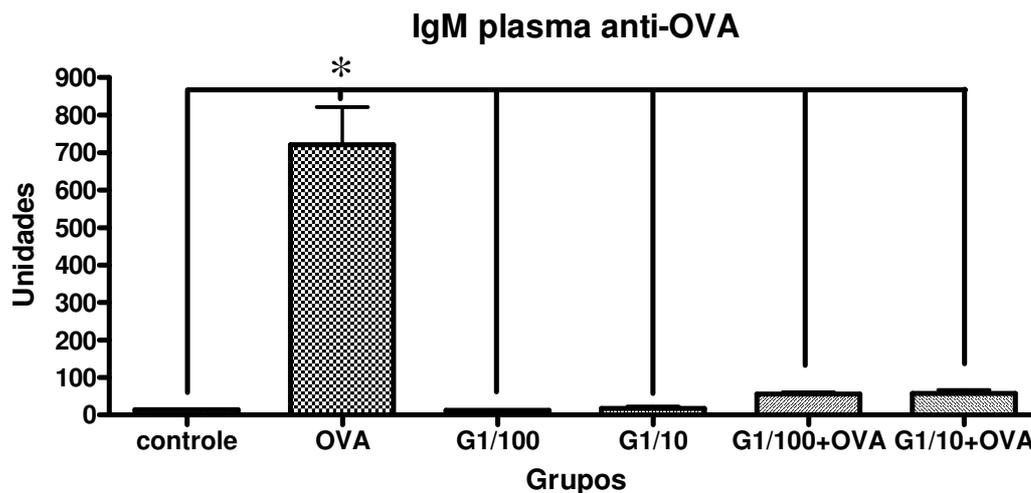


**FIGURA 5.4.** Determinação dos valores de anticorpos IgG, avaliados pelo método de ELISA, presentes no cérebro do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.1396$ ;  $F = 1.747$ ).

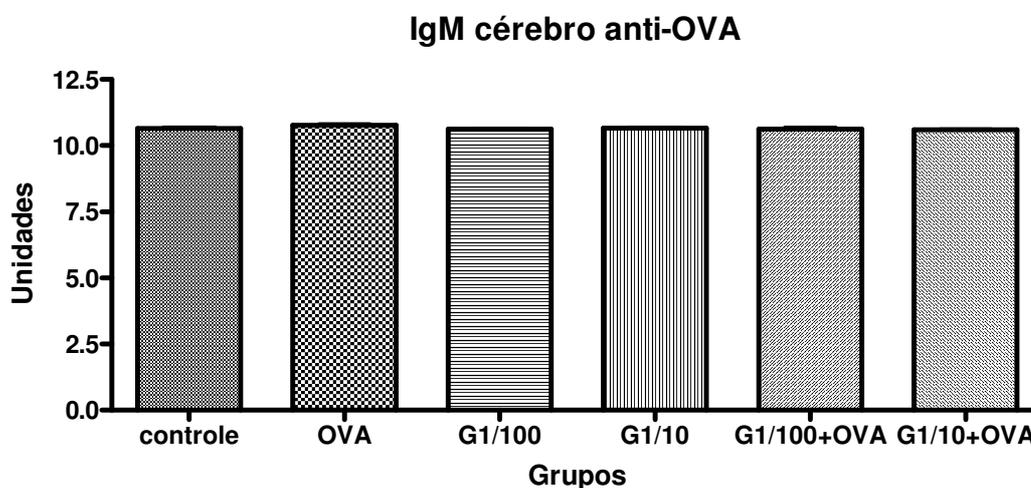
### 5.2.3. Dosagem de IgM anti-OVA

O grupo OVA apresentou valores bastante superiores de IgM anti-OVA no plasma dos animais, diferindo significativamente dos demais grupos, o que não se repetiu para o compartimento cerebral, onde os valores médios não diferiram entre os grupos.

Os dados da produção de IgM anti-OVA seguem a linha observada nos resultados dos valores de IgM total presente. Como se esperava o grupo controle não apresentou produção do anticorpo, já que não foi confrontado com o desafio antigênico. Mas a redução da produção do anticorpo específico acompanha a produção geral da classe de imunoglobulina.



**FIGURA 5.5.** Determinação dos valores de anticorpos IgM anti-OVA, avaliados pelo método de ELISA, presentes no plasma do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.0001$ ;  $F = 52.81$ ; Tukey,  $*p < 0.05$ ).

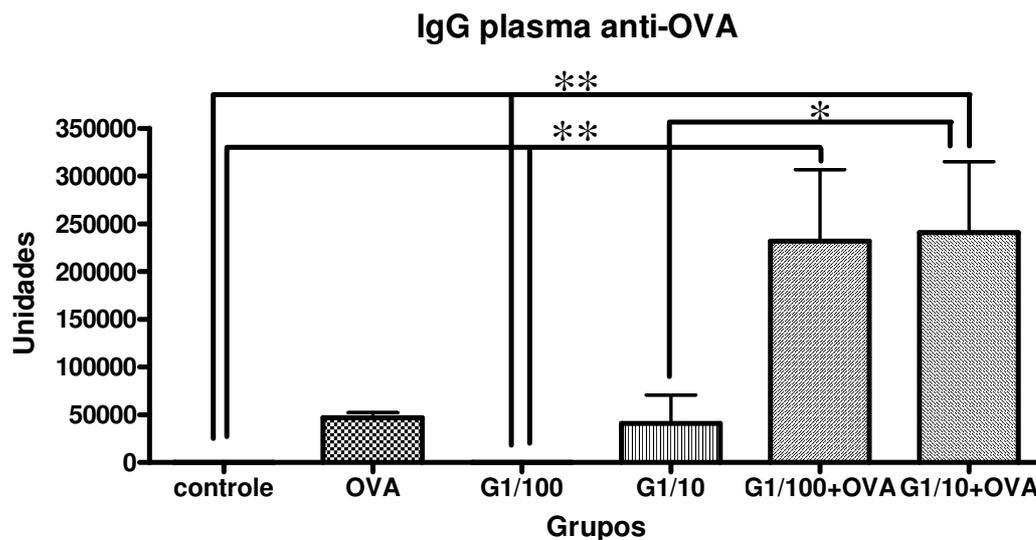


**FIGURA 5.6.** Determinação dos valores de anticorpos IgM anti-OVA, avaliados pelo método de ELISA, presentes no cérebro do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.0767$ ;  $F = 2.122$ ).

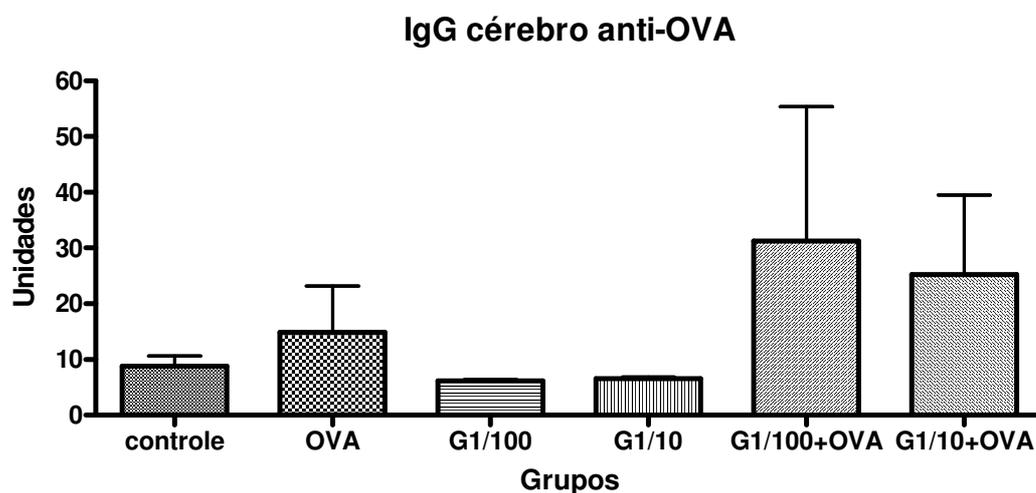
#### 5.2.4. Dosagem de IgG anti-OVA

Dentre os valores de IgG anti-OVA contidos no plasma apresentados pelos grupos G1/100+OVA e G1/10+OVA diferiram significativamente de alguns dos demais grupos, onde o grupo G1/100+OVA diferiu significativamente do grupo controle e G1/100, e o grupo G1/10+OVA diferiu significativamente do grupo controle, G1/100 e G1/10 (Fig. 5.7). Apesar dos valores maiores apresentados pelos mesmos grupos para IgG anti-OVA contida no cérebro, estes não apresentaram diferenças significantes para os demais grupos (Fig. 5.8).

Para a produção de anticorpo específico IgG anti-OVA observou-se a mesma tendência, observada anteriormente para a produção total desta classe de imunoglobulinas, de aumento da produção destes anticorpos quando ocorreu a administração de glifosato. O efeito de maior entrada no cérebro de IgG anti-OVA acompanhou a apresentada anteriormente nos grupos G1/100+OVA e G1/10+OVA, onde houve uma entrada superior quando comparado ao grupo OVA (Fig. 5.8). O mesmo efeito não foi verificado para os grupos G1/100 e G1/10, uma vez que estes não receberam o desafio antigênico. Novamente este maior transporte de IgG anti-OVA para o compartimento cerebral deve-se provavelmente a um mecanismo específico de transporte, não sendo aleatório.



**FIGURA 5.7.** Determinação dos valores de anticorpos IgG anti-OVA, avaliados pelo método de ELISA, presentes no plasma do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.0002$ ;  $F = 5.870$ ; Tukey,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).



**FIGURA 5.8.** Determinação dos valores de anticorpos IgG anti-OVA, avaliados pelo método de ELISA, presentes no cérebro do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de

trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.6155$ ;  $F = 0.7141$ ).

### **5.3. Testes Comportamentais**

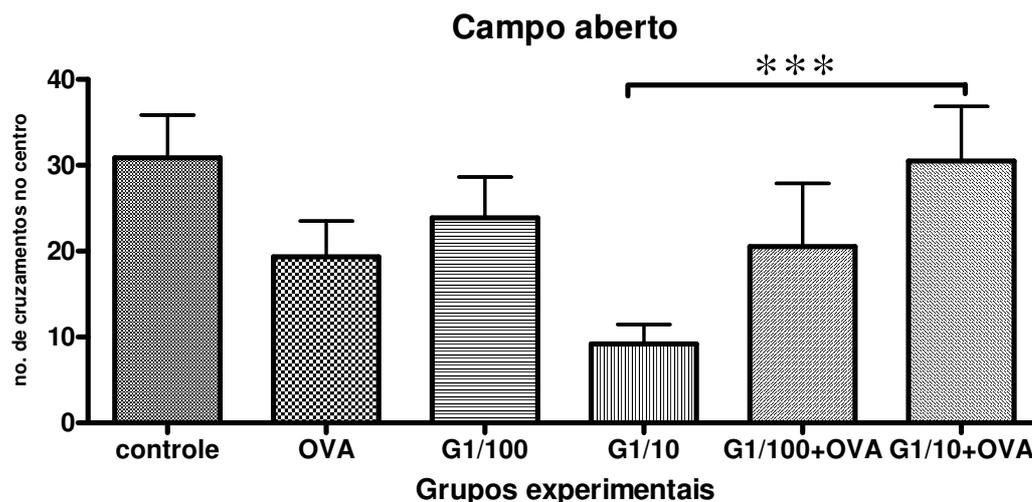
#### **5.3.1. Campo aberto**

No campo aberto foram observadas as seguintes variáveis: número de cruzamentos no centro (Fig. 5.9), número de cruzamentos na periferia (Fig. 5.10), número de cruzamentos totais (Fig. 5.11) e tempo de permanência no centro (Fig. 5.12).

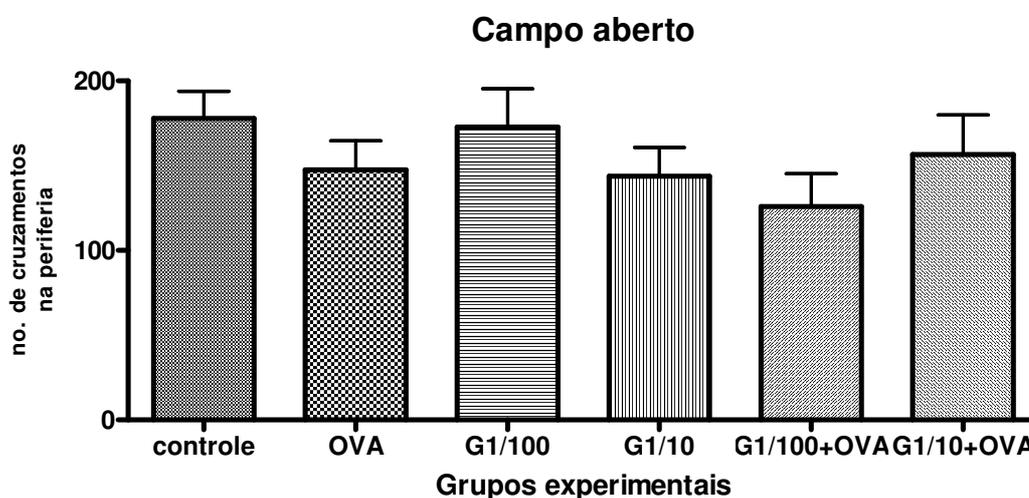
A diferença entre as médias observadas para a primeira variável não foram significativas ( $p = 0.0596$ ), onde os grupos controle e G1/10+OVA apresentaram os maiores valores e o grupo G1/10 o menor, mas quando comparados os grupos G1/10 e G1/10+OVA isoladamente, estes apresentaram diferenças significativas (Fig. 5.9). O inconstante número de cruzamentos na periferia apresentou uma menor variação de médias entre os grupos, não sendo esta significativa ( $p = 0.4145$ ), sendo os valores dos grupos controle e G1/100 levemente acima dos demais e o grupo G1/100+OVA o menor dentre os grupos. Quando tomados nos números totais de cruzamentos observa-se que não há diferença entre as médias apresentadas (Fig. 5.11).

Na variável tempo de permanência no centro há diferença significativa entre as médias ( $p < 0.0001$ ), sendo significativa a diferença entre os grupos G1/10 e G1/10+OVA ( $p = 0.0011$ ).

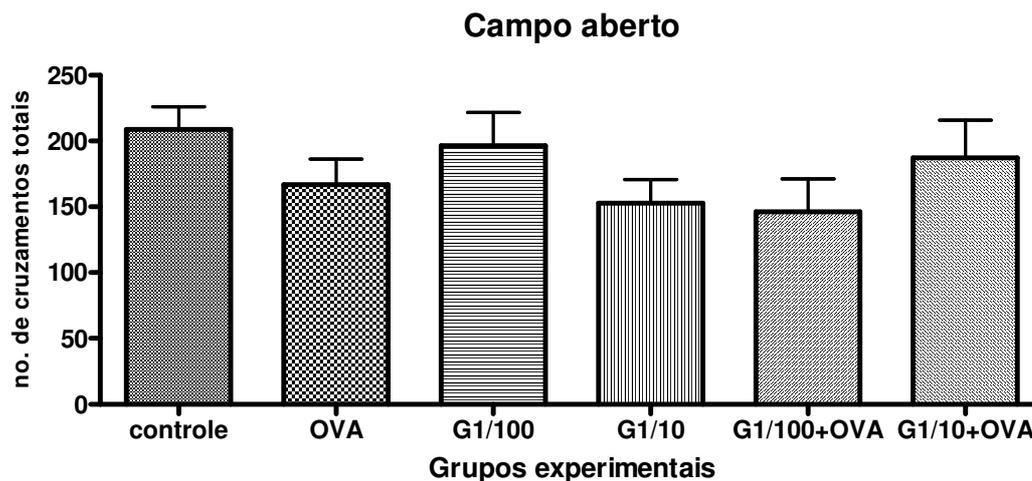
Estes resultados indicam que, apesar de os animais tratados com glifosato 1/10 da  $LD_{50}$  terem apresentado menor número de cruzamentos no centro e tempo de permanência neste quando comparado com o grupo que recebeu o mesmo tratamento de glifosato e os inóculos de OVA, o que indica que o primeiro grupo tende a expor-se menos que os demais grupos, este comportamento é não só recuperado como aumentado, não há diferença de capacidade locomotora entre os grupos.



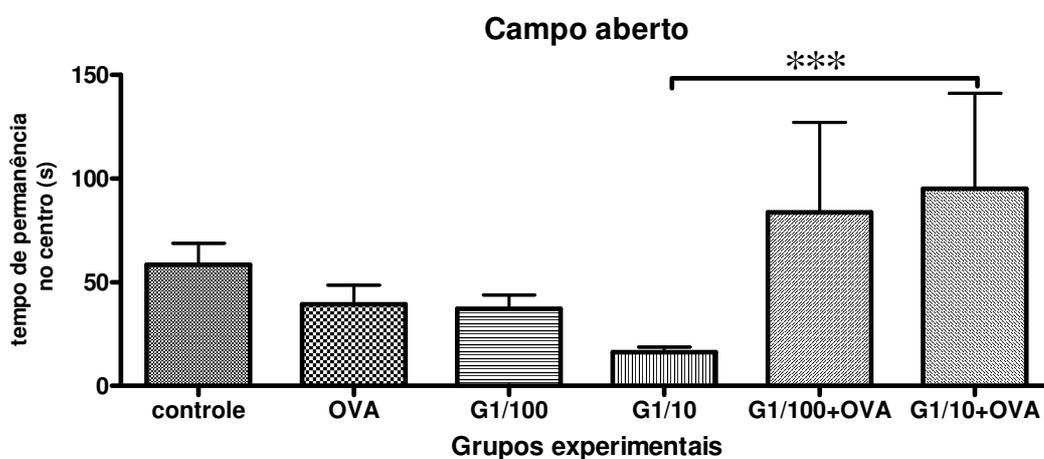
**FIGURA 5.9.** Número de cruzamentos no centro da arena de campo aberto efetuados pelo grupo controle e pelos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p < 0.0596$ ;  $F = 2.278$ ; Mann-Whitney,  $***p = 0.001$ ).



**FIGURA 5.10.** Número de cruzamentos na periferia da arena de campo aberto efetuados pelo grupo controle e pelos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.4145$ ;  $F = 1.021$ ).



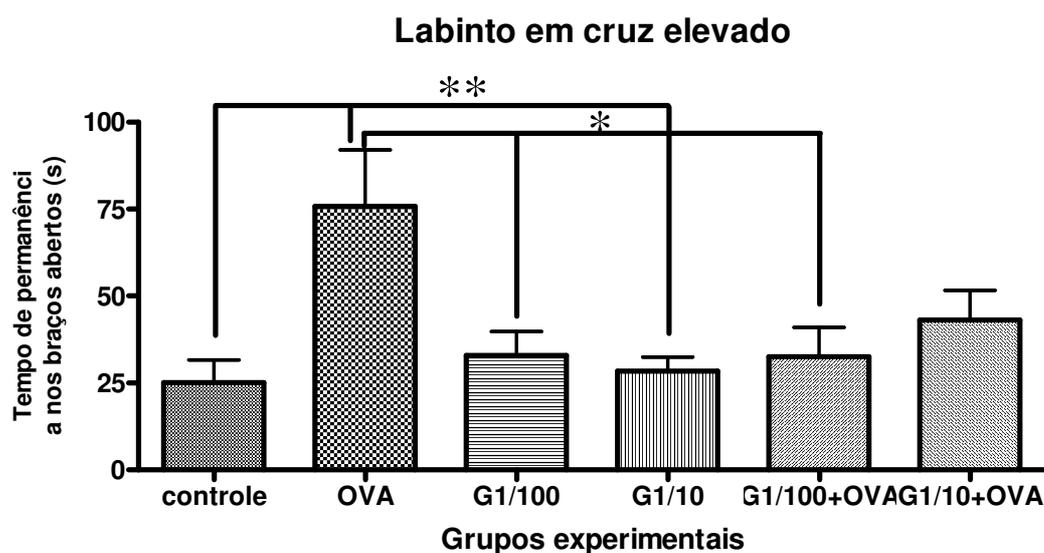
**FIGURA 5.11.** Número de cruzamentos totais na arena de campo aberto efetuados pelo grupo controle e pelos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato (ANOVA  $p < 0.3137$ ;  $F = 1.217$ ).



**FIGURA 5.12.** Tempo de permanência no centro da arena de campo aberto do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p < 0.3340$ ;  $F = 1.174$ ; Mann-Whitney,  $***p = 0.001$ ).

### 5.3.2. Labirinto em cruz elevado

Os indivíduos do grupo OVA apresentaram um tempo maior de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, diferindo significativamente dos grupos controle ( $p=0.0077$ ), G1/100 ( $p=0.0074$ ), G1/10 ( $p=0.0151$ ) e G1/100+OVA ( $p=0.0198$ ), mas não do grupo G1/10+OVA ( $p=0.1377$ ). Estes resultados indicam que o inóculo de OVA surtiu um efeito ansiolítico, mas este é revertido quando há administração conjunta da OVA com o glifosato (Fig. 5.13).

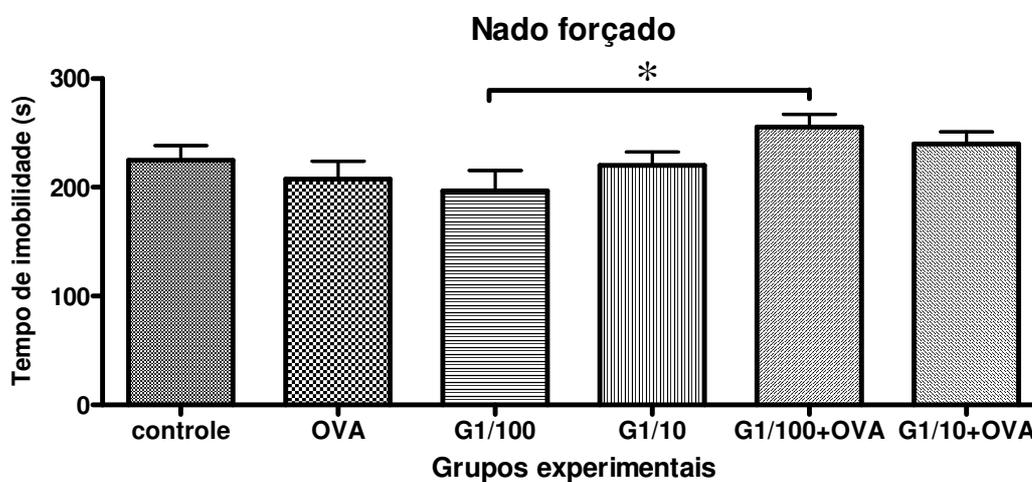


**FIGURA 5.13.** Tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p<0.0033$ ;  $F= 4.074$ ; Tukey,  $*p<0.05$ , Tukey,  $**p<0.01$ ).

### 5.3.3. Nado forçado

Dentro deste teste comportamental, as médias dos grupos de tempo de imobilidade não diferiram significativamente ( $p=0.0523$ ), mas os grupos G1/100 e G1/100+OVA quando comparados entre si apresentaram diferença significativa de  $p=0.0427$  (Fig. 5.14). Apesar de não podermos afirmar que o glifosato tem efeito depressivo, podemos observar que há uma recuperação

deste estado quando há co-administração de OVA no grupo tratado com a mesma dose de glifosato 1/100 da LD<sub>50</sub>.



**FIGURA 5.14.** Tempo de imobilidade durante o teste de nado forçado do grupo controle e dos grupos tratados intraperitonealmente com albumina de ovo (OVA, G1/100+OVA, G1/10+OVA), nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, e oralmente com glifosato nas doses 1/10 (G1/10, G1/10+OVA) e 1/100 (G1/100, G1/100+OVA) da DL50 do produto, por um período de trinta dias, com intervalos de 48hs entre as administrações do glifosato. (ANOVA  $p < 0.0523$ ;  $F = 2.359$ ; Tukey,  $*p < 0.05$ ).

## **6 DISCUSSÃO**

Os pesticidas são conhecidos por apresentarem diversos efeitos sobre a saúde, sendo que muitos deles afetam o sistema imune de várias maneiras, levando a alterações da resposta imune humoral e celular e o comportamento. O desequilíbrio do sistema imune pode gerar várias conseqüências, onde o aumento da atividade imune pode levar, em última instância, ao desenvolvimento de doenças autoimunes, hipersensibilidade ou alergias, enquanto a supressão deste sistema pode levar a um aumento a incidência de infecções ou neoplasias (DEAN *et al.*,1982).

Neste estudo, o glifosato demonstrou capacidade de modular o sistema imune, reduzindo a produção de IgM e aumentando a de IgG independente de estímulo imunogênico. Este resultado confirma o que foi encontrado por STILLER-WINKLER e colaboradores (1999), que observaram uma diminuição de IgM e C4 presentes no plasma de trabalhadores alemães expostos a pesticidas. Entretanto foram observados valores maiores de neopterina e do receptor solúvel de fator de necrose tumoral (sTNF RII) no grupo exposto. Isto indica uma ativação de macrófagos e outras células imunocompetentes, já que a síntese de neopterina é associada à ativação de macrófagos e a alta quantidade de sTNF RII pode ser atribuída ao efeito antagonístico devido ao aumento da secreção de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) por macrófagos ativados. Porém, este mesmo estudo observou valores elevados do receptor solúvel da interleucina-2 (sIL-2R) e leve redução os valores de IgA, IgG, C3c. Os valores de IgE apresentados pelo grupo dos trabalhadores expostos aos pesticidas não apresentaram diferenças significativas em relação aos não expostos, eliminando a possibilidade de desenvolvimento de doenças mediadas por este anticorpo.

Este efeito de diminuição do mecanismo de defesa humoral e da atividade celular é inversamente proporcional ao tempo de exposição aos pesticidas. Contudo, este efeito pode ser revertido, especialmente sobre a imunidade mediada por célula, durante períodos sem exposição aos pesticidas, onde pode haver a recuperação do sistema imune. Desta maneira, a diminuição da função imune humoral e celular pode estar associada a exposições recentes ou continuada a pesticidas (STILLER-WINKLER *et al.*, 1999).

Os baixos valores de IgM e o altos de IgG encontrados demonstram uma modulação da resposta imune humoral onde a imunidade humoral inicial, constituída por IgM, é preterida em relação a imunidade humoral tardia, constituída por IgG. Este processo é dependente da maturação de linfócitos B, que se transformam em plasmócitos secretores de anticorpos, ocorrendo uma troca de classe da imunoglobulina produzida. Esta substituição da classe predominante de imunoglobulina produzida durante a resposta imune a um desafio antigênico ocorre normalmente, sendo ambas importantes no desempenho de seus papéis. Esta indução precoce do class switching entre IgM e IgG pode gerar uma resposta deficiente ao combate de patógenos já que a IgM é essencial no combate a estes junto com o complemento nos sete primeiros dias da resposta (WABL & STEINBERG, 1996).

Esta class switching precoce entre IgM e IgG pode prejudicar a formação de uma resposta imune de longa duração, uma vez que é através dos linfócitos B, que possuem sua superfície celular recoberta por IgM, uma das formas de apresentação de antígeno que vão gerar a memória imunológica.

Observamos valores levemente maiores de IgM no conteúdo cerebral nos grupos tratados com glifosato e OVA e valores maiores de IgG no conteúdo cerebral nos grupos tratados somente com glifosato, que demonstram uma permeabilização seletiva da BBB pelo glifosato. Este efeito acentuou-se com o desafio imunogênico no transporte de IgM e foi suprimido no transporte de IgG quando houve esta co-administração.

A inoculação de OVA por si só não alterou os valores médios de IgM e IgG presentes no plasma apesar de haver valores consideráveis destes anticorpos contra esta substância. O desafio imunogênico também não apresentou efeito sobre a permeabilidade da BBB quando considerado isoladamente, porém a estimulação imune em conjunto com a administração do glifosato modifica o efeito deste último sobre a BBB.

Os poucos estudos que relatam efeitos do glifosato sobre o sistema nervoso, tratando geralmente do efeito deste sobre a ChE, não tendo sido avaliado até então o efeito do mesmo sobre a BBB, que tem um papel importante na homeostasia do sistema nervoso central, fibrinólise e coagulação,

regulação do tônus dos vasos e ativação e migração das células sanguíneas durante os processos fisiológicos e patológicos (ZENG et al., 2003). Os resultados apontam para um efeito do glifosato sobre a BBB, porém o mecanismo de ação sobre ela e as vias de entrada deste no sistema nervoso central ainda não foram descritas, sendo passível de objeto de futuras pesquisas esta interação.

Em relação ao comportamento, os animais expostos somente ao glifosato apresentaram uma diminuição do tempo de permanência e número de cruzamentos no centro, podendo ser correlacionado com uma tendência de menor exposição a lugares abertos que são considerados lugares de risco. Observamos o resgate para valores próximos do grupo controle no número de cruzamentos no centro e o aumento do tempo de permanência quando há a co-administração com OVA. Este efeito é observado quando comparamos os grupos tratados com a maior dose de glifosato.

Quando observamos o grupo tratado somente com OVA vemos que o tratamento diminuiu levemente todos os parâmetros mensurados no campo aberto, porém não há diferenças significativas quando comparado ao controle. Estas diferenças não se devem a uma diferença de atividade motora entre os grupos, já que não houve diferenças significativas no número total de cruzamentos.

No labirinto em cruz elevado o glifosato não apresentou nenhum efeito significativo sobre o tempo de permanência no braço aberto. Neste teste o grupo tratado apenas com OVA apresentou a maior permanência nos braços abertos, caracterizando um comportamento menos ansioso que os demais grupos.

No nado forçado se observou uma diferença significativa entre os grupos tratados com a menor dose de glifosato, onde o grupo que recebeu somente glifosato apresentou um menor tempo de imobilidade quando comparado com o grupo que recebeu co-administração de glifosato e OVA. O glifosato teria uma propriedade "antidepressiva" sendo esta revertida quando há o desafio imunológico.

Observamos que a metodologia dos testes comportamentais pode influenciar nos resultados dos mesmos, sendo importante a aplicação de diferentes metodologias para a corroboração destes resultados.

Existem vários estudos que demonstram uma base sólida de comunicação molecular e bioquímica entre o sistema imune e o sistema neuroendócrino, onde ambos dividem receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos. Citocinas podem ser sintetizadas no sistema nervoso e hormônios como o ACTH e TSH podem ser produzidos por linfócitos (BESEDOVSKY & DEL REY, 1996). Esta interação bidirecional possui um papel importante não só na fisiologia destes sistemas, mas também em vários processos patológicos (ADER *et al.*, 1995). Já se encontram vários trabalhos que associam mudanças comportamentais a estímulos sobre o sistema imune, como o efeito ansiogênico da alergia (BASSO *et al.*, 2003)

Infelizmente não existem trabalhos publicados até o momento atual que ajudem a elucidar os mecanismos pelo o qual o glifosato interage com os sistemas imune e neuroendócrino alterando as atividades do sistema nervoso central afetando o comportamento destes animais.

Em nosso trabalho experimental, tentamos elucidar alguns efeitos do glifosato ao nível do sistema imune e efeitos na barreira hematoencefálica. Observamos que houveram alterações na produção de anticorpos e na permeabilidade específica da BBB em relação aos mesmos. Estes efeitos podem ser indiretos, por modulação na produção de citocinas, ou diretamente alterando a secreção de proteínas por linfócitos.

Estes pontos estão em estudo no nosso Laboratório e podem significar a continuidade de estudos a partir dessa dissertação.

## **7 CONCLUSÕES**

A exposição ao glifosato por 30 dias modulou sistema imune dos animais expostos a ele, apresentando uma redução dos níveis de IgM total e IgM anti-OVA, e um aumento de IgG e IgG anti-OVA presentes no plasma;

A maior quantidade de imunoglobulinas no cérebro indicam que há alteração no sistema de transporte da barreira hemato-encefálica, sendo este seletiva já que esta se manteve íntegra, não ocorrendo a passagem do corante Azul de Evans para o compartimento cerebral;

O glifosato causou alterações nos parâmetros comportamentais, diminuindo o número de cruzamento e tempo de permanência no centro do campo aberto, o que indica que estes animais tenderam a uma menor exposição, e no tempo de imobilidade do nado forçado, indicando uma ação antidepressiva;

Estes resultados demonstraram que, apesar da modulação que o glifosato induz no sistema imune, a manutenção da responsividade do sistema imune a desafios imunogênicos ocorre, e em alguns parâmetros os restaura à níveis próximos ao do grupo controle;

Isto nos sugere que, quando ocorrem levantamentos epidemiológicos, deveram ser levados em consideração os episódios de ativação do sistema imune, de forma que os reais efeitos deste agrotóxico não sejam subestimados.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABUCKLE, T.; LIN, Z.; MERY, L. S. (2001). An exploratory analysis of the effect pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environmental Health Perspectives** **109**, (8): 851-857.

ADER, R.; COHEN, N.; FELTEN, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. **Lancet** **345**, (8942): 99-103.

AGCAOILI M. C.; ROSEGRANT, M. W. (1994). World Production of Cereals, 1966-90. **International Food Policy Research Institute** (IFPRI). Disponível em: <http://www.ifpri.org/2020/briefs/number03.htm>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

AGROCHEMICAL products: Part 1 – the key agrochemical product groups. (1996). In: **World Agrochemical Market**. [s. 1, s. n.].

ANDREI, E. (Org.). **Compêndio de defensivos agrícolas**. 6 ed. São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda., 1999, p. 478-480.

ARAÚJO, A. C. P.; TELLES, R.; GORNI, R.; LIMA, L. L. A. (1999). Endossulfan residues in Brazil tomatoes and their impact on public health and the environment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** **62**, (6): 671-676.

AZEVEDO, P. R. G. **Manual técnico do consultor agroquímico**. São Paulo: Icone, 1995, p. 345-400.

Bakore, N.; John, P.J.; Bhatnagar, P. (2002). Evaluation of organochlorine insecticide residue levels in locally marketed vegetables of Jaipur City, Rajasthan, India. **Journal of Environmental Biology / Academy Of Environmental Biology, India**, **23**, (3): 247-252.

BARBOSA E. R.; LEIROS DA COSTA, M. D.; BACHESCHI, L. A.; SCAFF, M.; LEITE, C. C. (2001). Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders** **16**, (3): 565-568.

BASSO, A.S.; PINTO, F.A.C.; RUSSO, M.; BRITTO, L.R.G.; DE SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMO NETO, J. (2003). Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology** **140**, (1-2): 69-77.

BEARD, J.; SLADDEN, T.; MORGAN, G.; BERRY, G.; BROOKS, L.; MCMICHAEL, A. (2003). Health impacts of exposure pesticide in a cohort of outdoor workers. **Environmental Health Perspectives** **111**, (5): 724-730.

BENEDETTI, A.L.; Universidade Federal de Santa Catarina. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico glifosato sobre a saúde: estudos em modelo animal**. Florianópolis, 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

BENEDETTI, A.L.; VITURI, C.L.; TRENTIN, A.G.; DOMINGUES, M.A.C.; ALVAREZ-SILVA, M. (2004). The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb® **Toxicology Letters** **153**: 227-232.

BENER, A.; LESTRINGANT, G. G.; BESHWARI, M. M.; PASHA, M. A. (1999). Respiratory symptoms, skin disorders and serum IgE levels in farm workers. **Allergy Immunology** **31**, (2): 52-56.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. (1996). Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews** **17**, (1): 64– 102.

BIO/DYNAMICS INC. A chronic feeding study of glyphosate in mice (Project n. 77.2061[BDN-77-420]). East Millstone, New Jersey, Bio/Dynamics Inc., Division of Biology and Safety Evaluation (Unpublished report submitted by Monsanto Ltda), 1983. Apud: WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159: glyphosate**. Geneva, 1994. 177p.

BLAIR, A.; ZAHM, S. H. (1995). Agricultural exposure and cancer. **Environmental Health Perspectives 103**, (8): 205-208.

BLAKLEY, B. R. (1997). Effect of Roundup and Tordon 202c herbicides on antibody production in mice. **Veterinary and Human Toxicology 39**, (4): 204-206.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABBONI, R.; ROGGIERI, P.; ABBONDANDOLO, A. (1997). Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry 45**: 1957-1962.

BRASIL. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002**. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/sda/agrotox\\_afins.htm](http://www.agricultura.gov.br/sda/agrotox_afins.htm). Acesso em: 01 de junho de 2006.

BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA. **Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992**-Anexo III. Brasília, 1992. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/03\\_92.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/03_92.htm). Acesso em: 01 de junho de 2006.

BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA. **SAI – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos: glifosato**, sd. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm\\_dados\\_ingrediente.asp?iVarAux=1&Codigo=219](http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&Codigo=219). Acesso em: 01 de junho de 2006.

BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/FIOCRUZ. **Dados sobre agrotóxicos**, 2006. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/agrotóxicos/agrotóxicos.htm>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

BRASIL-MAPA-ANVISA-IBAMA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIAINSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE). **Sistema integrado de informações sobre agrotóxicos**. sd. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp> . Acesso em: 01 de junho de 2006.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. (1991). Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. **Fundamental and Applied Toxicology 17**, (1): 43-51.

BUCKLEY, J. D.; MEADOWS, A. T.; KADIN, M. E.; LE BEAU, M. M.; SIEGEL, S.; ROBISON, L. L. (2000). Pesticide exposure in children with non-Hodgkin lymphoma. **Cancer 89**, (11): 2315-2321.

CABRAS, P.; CONTE, E. (2001) Pesticides residues in grapes and wine in Italy. **Food Additives and Contaminants 18**, (10): 880-885.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. (2000). Avaliação do risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública 34**, (5): 529-537.

CERNAK, I.; VINK, R.; ZAPPLE, D.N.; CRUZ, M.I.; AHMED, F.; CHANG, T.; FRICKE, S.T.; FADEN, A. (2004). The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. **Neurobiology of Disease** **17**, (1): 29-43.

CISCATO, C. H.; GEBARA, A. B.; SPINOSA, H. S. (2002). Pesticide residues in cow milk consumed in São Paulo City (Brazil). **Journal of Environmental Science and Health, Part B—Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes** **37**, (4): 323-330.

COLARES, C. F. **Perfil dos casos envolvendo glifosato registrados pelo Centro de Informações Toxicológicas de Santa Catarina**. Trabalho para Conclusão de Curso de Graduação em Medicina, UFSC, Florianópolis. 2002. p. 31-40.

COLOSIO, C.; CORSINI, E.; BARCELLINI, W.; MARONI, M. (1999). Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. **Toxicology Letters** **108**, 285-295.

CREMLYN, R.J. Introduction: historical aspects. In: \_\_\_\_\_. **Agrochemicals: preparation and mode of action**. 1. ed. Cichester: John Wiley & Sons. 1991. p. 1-15.

CRISOSTOMO, L.; MOLINA, V. V. (2002). Pregnancy outcomes among farming households of Nueva Ec with conventional pesticide use versus integrated pest management. **International Journal of Occupational and Environmental Health** **8**, (3): 232-242.

DALLEGRAVE, E.; MANTESE, F.D.; COELHO, R.S.; PEREIRA, J.D.; DALSENTER, P.R.; LANGELOH, A. (2003). The teratogenic potential of herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters** **142**: 45-52.

DALVIE, M.A.; CAIRNCROSS, E.; SOLOMON, A.; LONDON, L. (2003). Contamination on rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. **Environment Health: A Global Access Science Source** **2**, (1): 1-15.

DANTZER, R. (2001). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Annals of the New York Academy of Sciences**: 222– 234.

DANTZER, R.; AUBERT, A.; BLUTHE´, R.-M.; GHEUSI, G.; CREMONA, S.; LAYE´, S.; KONSMAN, J.P.; PARNET, P.; KELLEY, K.W. (1999). Mechanisms of the behavioral effects of cytokines. In: DANTZER, R.; WOLLMAN, E.E.; YIRMIYA, R. (Eds.), **Cytokines, stress and depression**. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, pp. 83–105.

DARUICH, J.; ZURULMIK, F.; GIMENEZ, M.S. (2001). Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research Section A** **85**: 226-231.

DEAN, J.H.; LUSTER, M.; BOORMANN, G.A.; LAUER, L.D. (1982). Procedures available to examine the immunotoxicity of chemicals and drugs. **Pharmacology Review** **34**: 137–148.

ECOBICHON, D.J. (2000). Our changing perspectives on benefit and risks of pesticides: a historical overview. **NeuroToxicology** **21**, 211-218.

ECOBICHON, D.J. (2001). Pesticide use in developing countries. **Toxicology 160**: 27-33.

EDDLESTON, M.; KARALLIEDDE, L.; BUCKLEY, N.; FERNANDO, R.; HUTCHINSON, G.; ISBISTER, G.; KONRADSEN, F.; MURRAY, D.; PIOLA, J.C.; SENANAYAKE, N.; SHERIFF, R.; SINGH, S.; SIWACH, S.; SMIT, L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world – a minimum pesticides list. **The Lancet 360**, (12): 1163-1167.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M; I.; ELAGAMY, E.I. (2001). Influence of paraquat, glyphosate, and cadmium on activity of some serum enzymes and protein electrophoretic behavior (in vitro). **Journal of Environmental Science and Health, Part B 36**, (1): 29-42.

EL-GENDY, K. S.; ALY, N. M.; EL-SEBAE, A. H. (1998). Effects of edinphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of Bolti fish (*Tilapia nilotica*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B 33**, (2): 135-149.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Article 2. Terms and definitions. In: \_\_\_\_\_. **International code of conduct on the distribution and use of pesticides** (Revised Version). Rome, 2003. p. 5-8.

FAO/WHO. **Pesticide residues in food** – Evaluations – Part I – Residues. Rome, 1986. 16p.

FARAHAT, T. M.; ABDELRASOUL, G.M.; AMR, M.M.; SHEBL, M.M.; FARAHAT, F.M.; ANGER, W.K. (2003). Neurobehavioral effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupational and Environmental Medicine 60**, (4): 279-286.

FARQUHARSON, I. D. Pesticides: a guide to terminology. In: GUNN, D. L.; STEVENS, J. G. R. **Pesticides and human welfare**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1976. p. 256-273.

FRANCIS, D.D.; CALDJI, C.; CHAMPAGNE, F.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. (1999). The role of corticotropin-releasing factor norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and andocrine responses to stress. **Biological Psychiatry 46**, 1153-1166.

GHERSI-EGEA, J.F.; STRAZIELLE, N. (2002). Choroid plexus transporters for drugs and other xenobiotics. **Journal of Drug Targeting 10**, 353–357.

GRANBY, K.; VAHL, M. (2001). Investigation of the herbicide glyphosate and the plant growth regulators chlormequat and mepiquat in cereals produced in Denmark. **Food Additives and Contaminants 18**, (10): 898-905.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J. E. (1993). *Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores*. 3.ed. São Paulo: Roca, p.238.

HELLAL, F.; BONNRFONT-ROUSSELOT, D.; CROCI, N.; PALMIER, M.; PLOTKINE, M.; MARCHAND-VERRECCHIA, C. (2004). Pattern of cerebral edema and hemorrhage in a mice model of diffuse brain injury. **Neuroscience Letters 357**, (1):21-24.

HENAO, S.H.; COREY, O. G. **Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas**. OMS: México, 1991. 179 p. (Série Vigilância, 11).

HOAR, S.K.; BLAIR, A.; HOLMES, F.F.; BOYSEN, C.D.; ROBEL, R.J.; HOOVER, R.; FRAUMENI JR, J.F. (1986). Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and softtissue sarcoma. **JAMA** **256**, (9): 1141-1147.

HOLLAND, H.C.; WELDON, E. (1968). A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. **Acta Psychologica** **28**, (3): 293-300.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 1963, p. 60.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dados históricos dos censos**. População residente, por situação do domicílio e por sexo – 1940-1996. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Previsão e acompanhamento de safras. **Uso de agrotóxicos no Estado do Paraná**. Safra 1998/1999. Rio de Janeiro, 2001. 48p. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/default.shtm>

IBMA. **Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.I.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JEYARATNAM, J. (1990). Acute pesticide poisoning: a major global health problem. **World Health Statistics Quarterly** **43**, (3): 139-144.

JEYARATNAM, J. (1993). Occupational health issues in developing countries. **Environmental Research** **60**: 207-212.

KIER, L. D.; STEGEMAN, S. D.; DUDEK, S.; MCADAMS, J. G.; FLOWERS, F. J.; HUFFMAN, M. B.; HEYDENS, W. F. (1997). Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor herbicides formulation. **Fundamental and applied toxicology** **36**, (1): 305. Part 2.

KNUTSON, R.D. Economic impacts of reduced pesticide use in the United States: measurement of costs and benefits. **Agricultural and Food Policy Center**. AFPC 99-2, 1999. 21p.

KOLPIN, D.W.; THURMAN, E. M.; LINHART, S. M. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for the degradates. **U.S. Geological Survey Toxic Substances Hydrology Program-IN: PROCEEDINGS OF THE TECHNICAL MEETING CHARLESTON SOUTH CAROLINA MARCH 8-12, 1999**. v. 2 (Contamination of Hydrologic Systems and Related Ecosystems). Water-Resources Investigation Report 99, 4018B, 1999.

KRONFOL, Z.; REMICK, D.G. (2000). Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **The American Journal of Psychiatry** **157**, (5): 683– 694.

LARINI, L. (1999). Herbicidas. In:\_\_\_\_\_. **Toxicologia dos praguicidas**. 1. ed. São Paulo: Manole, p. 178-179.

LIOI, M.B.; SCARFÌ, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. (1998b). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research** **403**: 13-20.

LIOI, M.B.; SCARFI, M.R.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; ZENI, O.; SALVEMINI, F.; DI BERARDINO, D.; URSINI, M.V. (1998a). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPXE9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis** **32**, (1): 39-46.

LITOVITZ, T.L. 2001 Annual report of the American Association of Poison Centers. **American Association of Poison Control Centers – Toxic Exposure Surveillance System**. Washington DC, 2002. p. 391, 399, 434.

LOZOVAYA, N.; MILLER, A.D. (2003). Chemical neuroimmunology: health in a nutshell bidirectional communication between immune and stress (limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal) systems **ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology** **4**, (6): 466-484.

MAGE, D.T.; ALAVANJA, M.C.; SANDLER, D.P.; MCDONNELL, C.J.; KROSS, B.; ROWLAND, A.; BLAIR, A. (2000). A model for predicting the frequency of high pesticide exposure events in the agricultural health study. **Environmental Research** **83**, 67-71.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BOULBEN, S.; HUREAU, D.; DURAND, G.; BELLÉ, R. (2002). Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemical Research in Toxicology** **15**, 326-331.

MARONI, M.; COLOSIO, C.; FERIOLI, A.; FAIT, A. (2000). Biological monitoring of pesticide exposure: a review. Introduction. **Toxicology** **143**, (1): 5-8.

MARONI, M.; FAIT, A.; COLOSIO, C. (1999). Risk and management of occupational exposure to pesticides. **Toxicology Letters** **107**, 145-153.

MCCABE, P.M.; SHERIDAN, J.F.; WEISS, J.M.; KAPLAN, J.P.; NATELSON, B.H.; PARE, W.P. (2000). Animal models of disease. **Physiology and Behaviour** **68**, 501-507.

MCEWEN, B S; BIRON, C A; BRUNSON, K W; BULLOCH, K; CHAMBERS, W H; DHABHAR, F S; GOLDFARB, R H; KITSON, R P; MILLER, A H; SPENCER, R.L.; WEISS, J.M. (1997). The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews** **23**, (1-2): 79-133.

MCEWEN, B.S.; BIRON, C.A.; BRUNSON, K.W.; BULLOCK, K.; CHAMBERS, W.H.; DHABHAR, F.S.; GOLDFARB, R.H.; KITSON, R.P.; MILLER, A.H.; SPENCER, R.L.; WEISS, J.M. (1997). Neuronal-endocrine immune interactions: the role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease. **Brain Research** **70**, 321-334.

MILLER, A.H.; PARIANTE, C.M.; PEARCE, B.D. (1999). Effects of cytokines on glucocorticoid receptor expression and function. Glucocorticoid resistance and relevance to depression. In: DANTZER, R.; WOLLMAN, E.E.; YIRMIYA, R. (Eds.), **Cytokines, Stress and Depression**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 107–116.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA/SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA. **Meios de produção**. 2003. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/ch01/1\\_6.xls](http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/ch01/1_6.xls). Acesso em: 01 de junho de 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual de preenchimento de notificação e atendimento em Centros de Assistência Toxicológica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2001. p. 10.

OMS/PNUMA - ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD/PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. Produccion y empleo de plaguicidas. In: \_\_\_\_\_. **Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura**. OMS. Ginebra, 1992. p. 15-16.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 01-11; 33-39.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an EPM as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods** 14 (3), 149–167.

PELLOW, S.; FILE, S.E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemical and Behaviour** 24, 525– 529.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. **European Journal of Pharmacology** 47, 379–391.

RIDLEY, W.P. & MIRLY, K. (1988) The metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats. Part I. Excretion and tissue distribution of glyphosate and its metabolites following intravenous and oral administration. Unpublished report, study No. 86139, project No. ML-86-438, dated March 1988, from Monsanto Environmental Health Laboratory, St. Louis, Missouri, USA. Submitted to WHO by Monsanto Int. Services SA, Brussels, Belgium. In: WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Pesticide residues in food - 2004: toxicological evaluations**. WHO/PCS/06.1. Geneva, 2004. 723 p. Disponível em: [http://www.who.int/ipcs/publications/jmpr/draft\\_jmpr\\_2004\\_monograph.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/jmpr/draft_jmpr_2004_monograph.pdf). Acesso em: 01 de junho de 2006.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T.; CARR, J.; HODGSON, T.P. (1997). Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. **Behaviour Brain Research** 86, 71–77.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999, p.1-3, 7-10, 61-82.

SCHIEPERS, O.J.G.; WICHERS, M.C.; MAES, M. (2005). Cytokines and major depression. **Progress In Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 29, (2): 201-217.

SCROFERNEKER, M.L.; POHLMANN, P.R. **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998. p. 63-69.

SINITOX. **Tabulação a nível nacional**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

SNAPPER, C.M.; MOND, J.J. (1993). Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. **Immunology Today** **14**: 15-17.

SPIRIC, A.; SAICIC, S. (1998). Monitoring chlorinated pesticides and toxic elements in tissues of food-producing animals in Yugoslavia. **Journal Association of Official Analytical Chemists International** **81**, (6): 1240-1244.

STALONE, L.; BESELER, C. (2002a). Pesticide poisoning and depressive symptoms among farm residents. **Annals of Epidemiology** **12**, (6): 389-334.

STALONE, L.; BESELER, C. (2002b). Pesticide illness, farm practices, and neurological symptoms among farm residents in Colorado. **Environmental Research** **12**, (6): 389-334.

STILLER-WINKLER, R.; HADNAGY, W.; LENG, G.; STRAUBE, E.; IDEL, H. (1999). Immunological parameters in humans exposed to pesticides in the agricultural environment. **Toxicology Letters** **107**, 219-224.

STITES, D.P.; TERR, A.I. *et al.* **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Prentice-Hall, 1992. p. 8-12; 90-91.

STITES, D.P.; TERR, A.I. *et al.* **Medical immunology**. 9<sup>a</sup> ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997. p. 52-62; 95-102.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. (2000a). Implication of blood-brain inter-faces in cerebral drug metabolism and drug metabolite disposition, in: WILLIAMS, G.M.; ARUOMA, O.I. (Eds.), **Molecular Drug Metabolism and Toxicology**, OICA International, London, pp. 181-200.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. (2000b). Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology** **59**, 561-574.

SUZUKI, H.; TERASAKI, T.; SUGIYAMA, Y. (1997). Role of efflux transport across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barrier on the disposition of xenobiotics in the central nervous system. **Advanced Drug Delivery Reviews** **25**, 257-285.

TALBOT, A. R.; SHIAW, M.H.; HUANG, J.S.; YANG, S.F.; GOO, T.S.; WANG, S.H.; CHEN, C.L.; SANFORD, T.R. (1991). Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): a review of 93 cases. **Human & Experimental Toxicology** **10**, (1): 01-08.

TAPPE, W.; GROENEWEG, J.; JANTSCH, B. (2002). Diffuse atrazine in German aquifers. **Biodegradation** **13**, (1): 3-10.

THE AMERICAN HERITAGE. **The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary**. Houghton Mifflin Company, 2002. Disponível em: <http://dictionary.reference.com/browse/behavior>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

TOMAI, J.; HANZL-DUJMOVI, I.; POLJAR, B.; VRANEI, B.; ANTAK, M.; JOVII, A. (1999). Comparative study of the effects of peptidoglycan monomer and structurally related adamantyltripeptides on humoral immune response to ovalbumin in the mouse. **Vaccine** **18**, (13): 1236-1243.

U. S. CENSUS BUREAU – INTERNATIONAL DATA BASE. **Total midyear population for the world: 1950-2050.** 2002. Disponível em <http://www.Census.gov/ipc/www/worldpop.html>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

UCHÔA, C.M.A.; DUARTE, R.; LAURENTINO-SILVA, V.; ALEXANDRE, G.M.C.; FERREIRA, H.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. (1999). Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32** (6): 661-669.

VALENZUELA, A. I.; PICO, Y; FONT, G. (2001). Determination of five pesticide residues in oranges by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography to estimate daily intake of consumers. **Journal Association of Official Analytical Chemists International** **84**, (3): 901-909.

WABL, M.; STEINBERG, C. (1996). Affinity maturation and class switching. **Current Opinion in Immunology** **8**, (1): 89-92.

WALSH, L.P.; MCCORMICK, C.; MARTIN, C.; STOCCO, D.M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives** **108**, (8): 769-776.

WESTER, R. C.; MELENDRES, J.; SARASON, R.; McMASTER, J.; MAIBACH, H. (1991). Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. **Fundamental and Applied Toxicology** **16**, (4): 725-734.

WESTER, R. C.; QUAN, D.; MAIBACH, H. I. (1996). In vitro percutaneous absorption of model compounds glyphosate and malathion from cotton fabric into through human skin. **Food and Chemical Toxicology** **34**, (8): 731-735.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Draft documents on chemicals – Glyphosate (Chemical draft 2003/39). In: \_\_\_\_\_. **Guidelines for drinking water quality**. 3. ed. Geneva, 2003. 9p.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Our planet, our health**. Report of the WHO commission on health and environment. Geneva, 1992. 282 p.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159**; glyphosate. Geneva, 1994. 177 p.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Public health impact of pesticides used in agriculture . Geneva. 1990. In: JEYA-RATNAM J. Occupational health issues in developing countries. **Environmental Research**, n.60, p. 207-212. 1993.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000-1**. WHO PCS/01.4. Geneva, 2000. 64 p.

WIKIPEDIA. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Agrot%C3%B3xico>. Acesso em: 01 de junho de 2006.

WILLIAMS, G.M.; KROES, R.; MUNRO, I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and pharmacology** **31**, 117-165.

YIRMIYA, R.; POLLAK, Y.; MORAG, M.; REICHENBERG, A.; BARAK, O.; AVITSUR, R.; SHAVIT, Y.; OVADIA, H.; WEIDENFELD, J.; MORAG, A.; NEWMAN, M.E.; POLLMICHER, T. 2000. Illness, cytokines, and depression. **Annals of the New York Academy of Sciences** **917**: 478–487.

ZANIN, M. (coordenadora); NIEWEGLOWSKI, A.M.; MEDEIROS, M.L., SLISZ, R.; FOWLER, R.; CVALET, V.; ZAPPIA, V. **Agrotóxicos: a realidade do Paraná**. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná, 1992. 93p.

ZHENG, W. (2001a). Toxicology of choroid plexus: a special reference to metal-induced neurotoxicities. **Microscopic Research Technology**. **52**, 89–103.

ZHENG, W. (2001b). Neurotoxicology of the brain barrier system: new implications. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**. **39**, 711–719.

ZHENG, W.; ASCHNER, M.; GHERSI-EGEA, J.F. (2003) Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. **Toxicology and Applied Pharmacology** **192**, 1–11.