

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**MISTURA DE PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES: EFEITOS  
SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS WISTAR  
MACHOS**

**MARCELA RODRIGUES DE CAMARGO**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade  
de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.**

**BOTUCATU, SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**MISTURA DE PRAGUICIDAS EM BAIXAS DOSES: EFEITOS  
SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS WISTAR  
MACHOS**

**Mestranda: Marcela Rodrigues de Camargo  
Orientadora: Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade  
de Medicina de Botucatu, Universidade  
Estadual Paulista – UNESP como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Patologia.**

**BOTUCATU, SP  
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Camargo, Marcela Rodrigues de.

Mistura de praguicidas em baixas doses: efeitos sobre macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos / Marcela Rodrigues de Camargo. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan

Assunto CAPES: 21007004

1. Toxicologia - Estudos experimentais      2. Praguicidas - Efeitos imunotóxicos

Palavras-chave: Imunotoxicologia; Mistura de praguicidas e macrófagos

*Dedicatória*

***Dedico este trabalho***

***Aos meus pais José Luiz e Vanderli***

*por incansavelmente me ensinarem caminhar com dignidade, amor, sabedoria e paciência!*

***Ao meu marido Pedro***

*por partilhar comigo a luta e o crescimento, compartilhar afeto e ideais!*

***E ao meu irmão Gabriel***

*por ajudar esta etapa ser bem menos complicada!*

*Agradecimientos*

Agradeço minha orientadora Dra. Ana  
Lúcia T. S. Barbisan, que participou da  
minha formação, transmitindo seu  
conhecimento e experiência!

Agradeço também aos Professores Doutores  
Luis Fernando Barbisan e Ramon Kaneno por  
estarem sempre presente, proporcionando  
qualidade e eficiência a esse trabalho!



*Agradeço os meus **amigos do Céu e da Terra**, por me auxiliarem sempre;*

*Os meus **familiares**, todos, que sempre acreditaram em mim e me deram forças pra chegar até aqui;*

*À minha mais **nova família**, em especial meu sogro **Paulo** e minha sogra **Cecília**, que em todos os momentos me incentivaram e me ajudaram nas horas mais complicadas;*

*À minha sempre orientadora **Profa. Dra. Maria Sueli P. de Arruda**, pela confiança, pelas oportunidades, pelo carinho, cuidado, compreensão e mais do que tudo, pela vontade de me ver crescer;*

*Ao **Prof. Titular Dr. João Lauro Viana de Camargo** e à **Dra. Carla Adriene da Silva Franchi**, por me transmitirem conhecimento e apoio na realização deste trabalho;*

*Aos **funcionários e amigos dos Departamentos de Patologia e de Microbiologia e Imunologia** por tornarem esse trabalho possível;*

*À professora **Dra. Regina Takahira**, que com muita paciência me ajudou e orientou em parte deste trabalho;*

*Obrigada **Alexandre Domingues, Ana Paula Bondon Graciane, Meire França Martinez e Káttya Christina Paes Jorge** por estarem ao meu lado proporcionando luz na minha trajetória;*

*Às amigas de viagem, **Ana Paula, Michele e Marina** pelas risadas, desabafos e palavras de força nos momentos difíceis;*

*Aos **amigos do Laboratório de Imunopatologia Experimental** pelo amparo, carinho, apoio e compreensão;*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro que permitiu a realização deste trabalho. (processo nº 06/60506-1);*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo auxílio financeiro que permitiu a realização deste trabalho. (processo nº 52035);*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho. (processo nº130467/2008-1);*

*Agradeço enfim todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram dessa etapa da minha vida, me ajudando, confortando, orientando, desafiando... Por me fazer sorrir, chorar, gritar, emudecer e até mesmo me oferecendo um cantinho pra dormir!!!*

***OBRIGADA A TODOS!!!***

*De nada valeria a vida se não fosse para depois,*

*rir dos momentos de desespero!*

# *Sumário*

# Sumário

## CAPITULO I

<b>1. Revisão de Literatura.....</b>	<b>08</b>
1.1 Definição e classificação de agrotóxicos.....	08
1.2 Limites e índices de exposição a praguicidas.....	11
1.3 O sistema imunológico como alvo de substâncias químicas.....	13
1.4 Avaliação do potencial imunotóxico.....	15
1.5 Imunotoxicidade por praguicidas: efeitos biológicos.....	17
<b>2.0 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>20</b>

## CAPITULO II

<b>Artigo.....</b>	<b>26</b>
Resumo.....	27
<b>1. Introdução.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>31</b>
2.1 Animais e ambiente de experimentação.....	31
2.2 Praguicidas.....	31
2.3 Ração com adição da mistura de praguicidas.....	32
2.4 Delineamento experimental.....	32
2.5 Sacrifício, coleta de material e processamento histológico.....	34
2.6 Dosagens bioquímicas.....	35
2.7 Coleta de macrófagos peritoneais.....	36
2.8 Espriamento e fagocitose.....	36
2.9 Determinação da liberação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
2.10 Determinação da liberação de óxido nítrico.....	37
2.11 Quantificação de TNF- $\alpha$ .....	38
2.14 Análise Estatística.....	38
<b>3. Resultados.....</b>	<b>39</b>
3.1 Peso corpóreo, consumo de ração e peso de órgãos.....	39
3.2 Bioquímica.....	41
3.3 Análise histológica.....	41
3.4 Atividade de macrófagos.....	42

3.5 Produção de TNF- $\alpha$ .....	44
<b>4. Discussão.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>51</b>

**Anexo**

Figura 1.....	55
Figura 2.....	56
Figura 3.....	57
Figura 4.....	58

*Capítulo I*

*Revisão de Literatura*

---

## **1. Revisão de Literatura**

### **1.1 Definição e classificação de agrotóxicos**

De acordo com a Organização para Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO), praguicidas são produtos químicos, quaisquer substâncias, ou mistura de substâncias destinadas à prevenção, destruição ou ao controle de pragas (FAO, 2003). Semelhante a esta definição, na legislação brasileira, o termo agrotóxico, genericamente denominado praguicida ou pesticida é definido da seguinte forma: produtos e componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Lei Federal nº7802 de 11/07/1989).

Dada a diversidade de produtos que compõem as formulações comerciais, é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem. Esta classificação, conforme a Agencia de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA), inclui os inseticidas, que pertencem a quatro grupos químicos distintos: os organofosforados, os carbamatos, os organoclorados e os piretróides (EPA, 1986).

Dentro desta classificação, os praguicidas organofosforados são atualmente muito utilizados para ajudar a impulsionar a produção agrícola, sendo mais utilizados na fruticultura, horticultura, cultura do algodão, cereais, sementes e plantas ornamentais. No

---

entanto, esses compostos apresentam ameaça aos organismos vivos, sejam eles silvestres, peixes, crustáceos, ou seres humanos, e são, portanto, um grande motivo de preocupação mundial (Cocco, 2002; Isoda et al., 2005). Os organofosforados são compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico ou ditiofosfórico (ex.: malation, diazinon, folidol, etc.). Por serem altamente hidrolisados, tanto no meio ambiente quanto nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, podem provocar distúrbios cardio-circulatórios, gastrintestinais, endócrinos e no sistema nervoso (Han et al., 2007; Oga, 2008).

Os carbamatos são compostos geralmente conhecidos por seu uso domiciliar como constituinte dos inseticidas e na Índia, como inseticida agrícola. Em geral, esses compostos não apresentam problemas relacionados à persistência e/ou bioacumulação, mas, por outro lado, apresentam toxicidade aguda para mamíferos. Os carbamatos são ésteres do ácido carbâmico e entre os permitidos estão: carbaril, dioxacarb e propoxur. A sintomatologia tóxica dos carbamatos é bem semelhante à dos organofosforados, além disso, também são inibidores da colinesterase, mas de curta duração, afetando o sistema nervoso central e prejudicando as funções normais das vias aéreas, desencadeando sinusite, tosse e bronquite. (Oga, 2008; Chakraborty et al., 2009).

Os organoclorados, diferentemente dos organofosforados, foram extensamente utilizados no mundo devido a sua estabilidade ambiental, baixa solubilidade em água e alta toxicidade para insetos. Porém, por possuírem alto potencial de bioacumulação, apresentando concentrações bilhões de vezes maiores em peixes do que na água poluída, seu emprego (ex.: aldrin, endrin, endosulfan, heptacloro, lindane, etc.) tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido em muitos países (Dutta et al., 2008; Oga, 2008; Salem, 2009). Apesar disto, por apresentar baixo valor de mercado e alta



---

eficiência, os organoclorados ainda são utilizados na agricultura e no saneamento básico em países como a Índia, onde resíduos de substâncias como o dieldrin e o endosulfan ainda podem ser encontrados no ambiente e nos gêneros alimentícios (Sarkar et al., 2008; Salem, 2009). Desta forma, na Índia e em muitos outros países, tanto trabalhadores agrícolas e industriais que estão constantemente expostos aos organoclorados, quanto à população em geral, estão sob risco de exposição crônica, seja através do ar, da água ou dos alimentos (Cocco, 2002; Sarkar et al., 2008). Os organoclorados são compostos à base de carbono, com radicais de cloro. São derivados do clorobenzeno, do ciclohexano ou do ciclodieno. O endosulfan, por exemplo, pertencente à classe dos organoclorados, caracteriza-se por alta toxicidade em peixes e mamíferos e afeta o sistema reprodutivo, imunológico e nervoso (Neuparth et al., 2006; Rana & Shivanandappa, 2009). É conhecido por sua capacidade de modificar as concentrações de enzimas como acetilcolinesterase, fosfatases e glutathione S-transferase, além de inibir a liberação de fatores de crescimento, induzir lesões no DNA de sangue periférico, lesões histopatológicas como necrose epitelial, aneurismas e hemorragia lamelar de peixes e crustáceos (Neuparth et al., 2006; Rana & Shivanandappa, 2009).

Outro grupo de inseticidas é o dos piretróides, que são compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes a piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (Pyrethrum) cinerariifolium* (ex.: aletrina, cipermetrina, permetrina, decametrina, etc.). São caracterizados pela fotoestabilidade, pouca deposição de resíduos em plantas e, relativamente, baixa toxicidade para mamíferos. Em sua estrutura química podem ser distinguidos pela ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupo alfa-ciano substituinte no alfa-carbono da parte phenoxybenzyl (Vershoye & Aldridge, 1980;

---

Soderlund et al, 2002). Este grupo de praguicidas sintéticos possui alto índice de absorção gástrica e, alta lipossolubilidade na presença de uma glicoproteína transportadora, o que facilita sua entrada no sistema nervoso central podendo causar efeitos neurotóxicos adversos como cefaléia, tontura, hiperexcitabilidade e distúrbios do equilíbrio (Vershoyle & Aldridge, 1980; Soderlund et al, 2002; Oga, 2008). Os piretróides sintéticos tipo II ainda podem induzir ansiedade, efeitos imunossupressores ou imunoestimuladores (aparecimento de reações alérgicas, dermatites de contato e possíveis reações anafiláticas) em animais de laboratório (Santoni et al., 1998; 1999; Righi & Palermo-Neto, 2005; Oga, 2008).

## **1.2 Limites e índices de exposição a praguicidas**

A exposição aos praguicidas não ocorre somente em trabalhadores rurais, que manipulam diretamente esses compostos (exposição ocupacional), mas também na população em geral, através de exposição acidental com resíduos, ingestão de água e alimentos contaminados. Uma vez que tais substâncias persistem no ambiente e acumulam na cadeia alimentar, representam sério risco para a saúde humana. Enquanto a exposição ocupacional afeta um grupo limitado de trabalhadores, numa faixa de partes por milhão (ppm), as exposições acidentais, através da água, ar, alimentos e locais de despejo, podem estar na faixa de partes por bilhão (ppb). Com base neste cenário, a Organização Mundial da Saúde (WHO) e a FAO estabeleceram índices de ingestão diária aceitável (IDAs) de resíduos de praguicidas considerados seguros para a saúde humana.

As IDAs são valores limite que, baseados em conhecimento toxicológico sobre determinado agente químico, indicam que é improvável que a exposição a seus resíduos represente qualquer risco à saúde humana se forem ingeridos dentro daqueles limites

---

durante toda a vida dos indivíduos. A IDA de determinado praguicida é geralmente obtida a partir do NOEL (*no-observed-effect-level* = nível sem efeito observável), estimado em estudos de toxicidade com animais de laboratório e corrigido por fatores de segurança, que podem variar de 10 a 2.000 vezes (WHO, 1962; Lu, 1988).

Diversas substâncias químicas utilizadas na agricultura são reconhecidas como possíveis agentes tóxicos, teratogênicos, mutagênicos e cancerígenos (Feber & Cabral, 1991; IARC, 1991). Apesar de terem como alvo específico algumas pragas, efeitos adversos em seres humanos e outras espécies decorrentes de exposição crônica ainda não foram devidamente caracterizados (Weiss et al., 2004). A determinação e a extensão de doenças relacionadas à exposição ambiental é difícil de ser calculada. Além disso, os riscos potenciais para a saúde humana, associados com a exposição a misturas químicas tornam-se uma preocupação crescente (Carpenter et al., 2002).

Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou que cerca de 80 % dos alimentos *in natura* (alface, batata, cenoura, morango, tomate, entre outros) analisados no período de 2001 a 2004, coletados em 12 estados do Brasil, apresentava resíduos de praguicidas. Nesta análise de resíduos 30 % das culturas estavam irregulares, sendo que 16,6 % continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) e 83,4 % continham resíduos de produtos não autorizados para aquele tipo de cultura. As culturas com maior frequência de irregularidades foram as de tomate, maçã e morango. Particularmente com relação aos tomates analisados entre 2001 e 2004, foram detectados resíduos de seis praguicidas não autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós), e cinco praguicidas permitidos mostraram

---

resíduos acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2005).

Dentre os praguicidas encontrados pela ANVISA como contaminantes, três eram organoclorados (dicofol, dieldrin e endosulfan), e cinco eram organofosforados (diclorvós, monocrotofós, clorpirifós, metamidofós e triazofós). A estimativa do risco da exposição aos clorados é complexa: devido à sua característica lipofílica e acúmulo no organismo, possíveis efeitos somatórios ou sinérgicos podem ocorrer quando há exposição concomitante e/ou prolongada a dois ou mais destes agentes (Carpy, 2000; Boobis et al., 2008). Como estes praguicidas podem se depositar na água ou se ligar a partículas do solo - propriedades devidas as suas ligações cloro-carbono, de difícil quebra - sua persistência e a de seus metabólitos no meio ambiente levam a exposição contínua de animais e seres humanos (Carpy, 2000; Galloway, 2003).

Em 2008, a ANVISA publicou outro documento relatando que culturas de tomate, morango e alface ainda apresentavam cerca de 40% ou mais de suas culturas contaminadas com praguicidas não autorizados para aquele tipo de cultura ou com limites acima do permitido. Nestes estudos, o uso de produtos não autorizados representa aproximadamente 85% dos resultados insatisfatórios, podendo significar risco à saúde (ANVISA, 2008).

Em 1994, o Brasil ocupava a 5ª posição mundial no uso de praguicidas, ficando atrás dos EUA, China, Austrália e Índia (Ecobichon, 2001). Hoje, o país é referido como o 3º maior mercado de praguicidas do globo, movimentando cerca de US\$ 4 bilhões em 2004 (Marchiori, 2005). Além disso, no Brasil, as intoxicações agudas por praguicidas ocupam a 3ª posição dentre os agentes causais, sendo a maior parte (cerca de 73%) dos

---

casos provocada pelos inseticidas da classe dos organofosforados, piretróides, carbamatos ou organoclorados (Oga, 2008).

Em geral, a maioria das populações humanas está exposta a várias substâncias tanto no ambiente em que vivem como em sua atividade ocupacional. Embora vários estudos tenham apontado a necessidade de se conhecer a toxicidade de misturas químicas para conduzir o processo de análise de risco, há escassez de dados sobre os efeitos de mistura sobre o sistema imunológico de mamíferos (Olgun, et al., 2004). Com relação aos níveis de exposição, os dados sobre os efeitos agudos resultantes de exposições em altos níveis são normalmente bem conhecidos, mas, o entendimento dos possíveis efeitos decorrentes de exposição crônica em baixas doses é freqüentemente escasso. Entre estes efeitos está a imunotoxicidade.

### **1.3 O sistema imunológico como alvo de substâncias químicas**

A interação entre xenobióticos e componentes do sistema imunológico tem despertado grande interesse da comunidade científica, uma vez que o desequilíbrio deste sistema pode levar à disfunção imunológica do hospedeiro facilitando o aparecimento de doenças auto-imunes e reações de hipersensibilidade, bem como, a susceptibilidade aumentada ao aparecimento de infecções oportunistas, e ao desenvolvimento de neoplasias (Luster & Rosenthal, 1993; Descotes et al., 2000; Kimber & Dearman, 2002).

Nas últimas décadas vários estudos têm demonstrado que diferentes classes de substâncias afetam o sistema imunológico que é extremamente vulnerável e sensível à modulação por agentes químicos (Luster et al., 1990; De Wall et al., 1992; Luster & Rosenthal, 1993; Vandebriel et al., 1998; Voccia et al., 1999; Descotes et al., 2000;

---

Kimber & Dearman, 2002). Dentre estas substâncias, os bifenis policlorinados (PCBs), hidrocarbonetos aromáticos, dioxinas, praguicidas como dieldrin e DDT (dicloro difenil tricloroetano) e metais pesados, têm mostrado efeitos imunotóxicos (Luster et al., 1990; De Wall et al., 1992; Voccia et al., 1999; Kaioumova et al., 2001). Estes efeitos indesejados podem resultar da ação direta e/ou indireta do xenobiótico (e/ou produtos de sua biotransformação) sobre o sistema imunológico; de uma resposta imunológica do hospedeiro à substância e/ou seus metabólitos ou de modificações dos antígenos do hospedeiro pelos próprios compostos ou seus metabólitos (IPCS, 1996).

O campo da imunotoxicologia vem crescendo consideravelmente desde a década de 70 (Descotes, 2004). Os caminhos atuais seguidos por essa ciência abrangem experimentos de avaliação de toxicidade em roedores, sob condições controladas de exposição, na tentativa de mimetizar situações as quais os seres humanos estão expostos (Vohr & Ruhl-Fehlert, 2001). Dados de estudos animais têm sido muito úteis para prever o potencial de imunotoxicidade e seus efeitos sobre a resistência do hospedeiro. Além disso, os resultados de estudos experimentais estão sendo aplicados em modelos de paralelogramas para reduzir as incertezas associadas à organização biológica cruzada, e extrapolação de dados animais para o homem (Selgrade, 1999). Os resultados experimentais também auxiliam no discernimento com relação à variabilidade intra-espécie e a relação entre os efeitos decorrentes de exposição, aguda, subaguda e crônica. Em última instância estes achados podem auxiliar na decisão sobre o risco da substância para a população humana (Selgrade, 1999).

A EPA desenvolveu um Guia (Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.7800 Immunotoxicity) para avaliação de praguicidas e substâncias tóxicas em roedores,

---

enfocando parâmetros imunológicos, cuja proposta é fornecer melhores informações a respeito da supressão do sistema imunológico em decorrência da exposição repetida a um determinado xenobiótico (EPA, 1997). Da mesma forma, o Guia para estudo de toxicidade oral de 90 dias em roedores estabelecido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, sigla do inglês) acrescentou um adendo com ênfase em parâmetros imunológicos (OECD 408, 1995).

#### **1.4 Avaliação do potencial imunotóxico**

A dinâmica do sistema imunológico, caracterizada pela proliferação e diferenciação celular, amplificação, transcrição e tradução gênica, faz dele um importante alvo dos efeitos tóxicos de xenobióticos (Vial et al., 2002). Dentre os diferentes órgãos que constituem o sistema imunológico, o timo e a medula óssea, responsáveis pelos processos de maturação e diferenciação dos componentes do sistema imunológico, são órgãos centrais para avaliação de imunotoxicidade (IPCS, 1996).

Os efeitos adversos decorrentes da interação de xenobióticos com componentes do sistema imunológico geralmente incluem danos estruturais e/ou funcionais em órgãos linfóides tais como, alteração da celularidade do timo, baço, medula óssea e linfonodos, proliferação anormal de células progenitoras na medula óssea, alteração no processo de maturação das células imunológicas e alterações funcionais das respostas humoral e/ou celular (Kimber & Dearman, 2002). Essa diversidade de efeitos resultantes da exposição a agentes químicos, e a possibilidade do desenvolvimento de eventos adversos tardios, faz da avaliação do potencial imunotóxico de xenobióticos uma ciência de grande

---

complexidade e revela a necessidade de cautela na interpretação de dados (Kimber & Dearman, 2002; Descotes et al, 2000).

Em função da complexidade do sistema imunológico, diversos biomarcadores de toxicidade devem ser avaliados para caracterização do potencial imunotóxico de uma substância. Para tal, um painel de testes que abrange a análise histológica de órgãos linfóides e estudos de função imunológica, como teste de resistência do hospedeiro e produção de citocinas têm sido proposto (Luster et al., 1988; Vandebriel, 1998; Schuurman, 1994; Kuper et al., 2006). Em animais de laboratório, o primeiro painel, utilizado como "screening" para direcionamento dos parâmetros imunológicos a serem avaliados abrange testes não-funcionais onde se enquadram as avaliações de peso corpóreo, peso e histopatologia de órgãos linfematopoiéticos, e hematologia. O segundo painel inclui os testes funcionais, tais como atividade de macrófagos, atividade NK, marcadores de superfície, resposta proliferativa, ensaios de citotoxicidade, produção de anticorpos e modelos de resistência do hospedeiro (Luster et al., 1988; IPCS, 1996). Em especial, os macrófagos ativados representam um componente chave da resposta imunológica celular. O processo de ativação dos macrófagos envolve diversas alterações morfológicas, funcionais e metabólicas. Tais células, quando ativadas, são capazes de fagocitar microorganismos, auxiliar no recrutamento celular, liberar enzimas citotóxicas, entre outras, demonstrando papel fundamental na resposta inflamatória e defesa do organismo. Além disso, os macrófagos participam nas etapas de processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos. (Stout & Suttles, 2004; Descotes, 2006; Zhao et al., 2009).



---

Dentre os testes de imunotoxicidade, a observação de achados histopatológicos em órgãos linfóides primários e secundários é uma ferramenta indispensável na caracterização da toxicidade de compostos sobre o sistema imunológico (Germolec et al., 2004; Kuper et al., 2006). O uso de técnicas histológicas associadas a testes funcionais, cultura de células e tecidos, permite uma melhor compreensão dos mecanismos de imunotoxicidade (Schuurman, 1994; Descotes, 2006). Com o avanço da imunologia molecular, os estudos de modo e mecanismo de ação estão se tornando mais práticos. E, com isso, a indústria e agências de regulamentação de substâncias estão propondo o uso de técnicas de expressão gênica para identificar e classificar o potencial imunotóxico de substâncias. Além disso, diversos estudos de imunotoxicidade publicados sugerem que a análise por “microarray” é uma prática significativa para explorar as vias que levam a disfunção imunológica (Luebke et al., 2006).

### **1.5 Imunotoxicidade por praguicidas: efeitos biológicos**

Há hoje um grande número de substâncias e químicos ambientais que tem o potencial de modificar diferentes componentes do sistema imunológico alterando suas funções (Haschek & Rousseaux, 1996; Boffeta, 2006). Além disso, o sistema imunológico é considerado sensível à exposição química em baixas doses quando nenhum outro sistema apresenta qualquer grau de toxicidade (Luster & Rosenthal, 1993; Colosio et al., 2005). Entre estas substâncias estão alguns praguicidas cujo potencial imunotóxico vem sendo estudado.

Han et al. (2007) demonstraram que o endosulfan administrado em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  aumenta a

---

produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas pró-inflamatórias tais como interleucina-6 (IL-6), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) de maneira dose-dependente. Um estudo sobre efeitos da toxicidade crônica de praguicidas em frangos mostrou que o endosulfan administrado na dieta na concentração de 2 ppm diminuiu o peso da bursa de Fabricius e do timo, achado este correlacionado com alterações histológicas relevantes (Garg et al., 2004).

Estudos feitos *in vitro* com 1,1-dichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethylene, (p,p'-DDE) derivados do DDT, cuja estrutura química é muito semelhante a do dicofol, demonstraram que o DDE nas concentrações entre 5 ng e 50  $\mu$ g/ml não afeta a viabilidade de leucócitos e a proliferação de linfócitos de peixes *Sparus aurata L.*, porém apresenta aumento na expressão de genes responsáveis pela produção interleucina IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I e II (MHC-I e MHC-II), receptor Toll-like-9 (TLR-9) e receptor de célula T (TCR) (Cuesta, 2008). Outro estudo demonstrou que o DDT induziu a produção de TNF- $\alpha$  e NO pelos macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos tratados *in vitro* com a concentração de 100  $\mu$ g/ml e diminuiu a resposta nas concentrações de 1 e 10  $\mu$ g/ml, contribuindo para reações inflamatórias, desequilíbrio das citocinas e alteração no sistema imunológico como à apoptose, sendo um dos principais mecanismos que contribuem para os efeitos imunossupressores do inseticida (Dutta et al., 2008).

Outro estudo *in vitro* demonstrou que o organofosforado diclorvós, nas doses de 70 e 100  $\mu$ M, administrado em cultura de neutrófilos de sangue periférico humano aumentou o índice de fagocitose de maneira dose dependente (Podstawka, 1994).

---

Em 1992, Flipo e colaboradores observaram que os praguicidas dieldrin e carbofuran administrados individualmente apresentam efeito imunossupressor sobre a atividade fagocítica de macrófagos de camundongos C57B1/6, porém, os mesmos praguicidas administrados em misturas levam a respostas semelhantes ao controle.

A interação de xenobióticos com um determinado órgão-alvo pode causar efeitos aditivos, sinérgicos ou de antagonismo em decorrência de mecanismos de ação iguais ou semelhantes. Estes efeitos podem ocorrer ao mesmo tempo em um único órgão ou em diferentes órgãos-alvo, desta forma, torna-se crescente a preocupação com estes compostos químicos já que a tendência poderá ser pelo menos em parte, atribuível a produtos em novos e/ou modificados padrões de exposição. (Carpy, 2000; Boobis et al., 2008). De acordo com Robinson (2004) e Boobis et al. (2008), a exposição de indivíduos a praguicidas isolados ou em misturas pode levar a uma maior susceptibilidade a doenças, deixando muitos sistemas biológicos e as interações entre esses sistemas comprometidas, alterando suas inter-relações de funcionamento e potencialmente levando a um estado de doença.

Neste contexto, muitos países vêm enfrentando um aumento no número de doenças relacionadas a alterações no sistema imunológico, como asma e doenças auto-imunes, ou mesmo a imunossupressão que pode aumentar a susceptibilidade ao câncer e o risco a infecções (Colosio, 2005; Corsini et al, 2008). Porém, um dos aspectos mais críticos dos estudos envolvendo imunotoxicologia é a dificuldade em distinguir entre "adaptativo / não adversas" e "adversas", e as conclusões sobre o significado do prognóstico das pequenas mudanças freqüentemente observado em estudos imunotoxicológicos humanos (Colosio, 2005).

---

Desta forma, a avaliação da imunotoxicidade se apresenta como uma ferramenta importante de estudo para avaliar as possíveis conseqüências da interação entre o sistema imunológico e xenobióticos.

## **2. Referências Bibliográficas**

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília, DF, 2005. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 30 set 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA). Nota técnica sobre o risco de consumo de frutas e hortaliças cultivadas com agrotóxicos, 2008. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) (acesso:30/09/2009).

Boffetta, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mut. Res.* 2006; 608: 157-162.

Boobis AR. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letters.* 2008; 180: 137–150.

Carpenter, DO. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ. Health Perspect.* 2002; 10, 25.

---

Carp, SA. Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2000; 1:1-25.

Chakraborty S et al. Chronic exposures to cholinesterase – inhibiting pesticides adversely affect respiratory health on agricultural workers in India. *J. occup.health.* 2009; 51: 488-97.

Cocco P. On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saúde Pública.* 2002; 1: 379-402.

Colosio C. Low level exposure to chemicals and immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005; 207: S320 – S328.

Corsini E, et al. Effects of pesticide exposure on the human immune system. *Hum Exp Toxicol.* 2008; 9: 671-80.

Cuesta A. Effects of the organochlorines p,p0-DDE and lindane on gilthead seabream leucocyte immune parameters and gene expression. *Fish & Shellfish Immunology.* 2008; 25: 682-688.

De Wall EJ, et al. Alterations in the cortical thymic epithelium of rats after in vivo exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD): An (immuno)histological study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 115: 80-88.

Descotes J et al. Responses of the immune system to injury. *Toxicol. Pathol.* 2000; 28: 479-481.

---

Descotes, J. Importance of immunotoxicity in safety assessment: a medical toxicologist's perspective. *Toxicol Lett.* 2004; 149: 103-108.

Descotes J. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Drug Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2: 249-59.

Dutta R. Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1-trichloroethane) on complement system and macrophages. *Toxicology*; 2008.

Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's *Toxicology, the basic science of poisons.* New York, 6<sup>th</sup> ed. 2001; 22: 763-810.

EPA (Environmental Protection Agency). Increased incidence of malignant and combined malignant and benign tumors in male and female rats and increased incidence of malignant tumors in female mice, 1997.

EPA. Environmental Protection Agency. Lead arsenate EPA Pesticide Fact Sheet 12/86. EPA, 1986. Disponível em: <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/fenitrothion-methylpara/lead-arsenate/insect-prof-leadars.html>. Data de acesso: 06 mar. 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides.* Rome, 2003.

Feber A & Cabral R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Aditives Contam.* 1991; 8: 755-776.

Flipo D, et al. Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14: 747-752.

Galloway T. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology.* 2003; 12: 345- 363.

---

Garg UK, et al. Haemato-biochemical and immuno-pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *Int Immunopharmacol.* 2004; 4:1709-22.

Germolec DR, et al. Extended Histopathology in Immunotoxicity Testing: Interlaboratory Validation Studies. *Toxicological science.* 2004; 78:107-115.

Han EH. Inflammatory effect of endosulfan via NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007; 355: 860-865.

Haschek WM & Rousseaux CG. *Fundamentals of Toxicologic Pathology.* California USA: Academic Press; 1998.

International Agency for Research Cancer (IARC). WHO International Life Sciences Institute. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Human.* 1991; 5, 612.

Isoda H. Effects of organophosphorous pesticides used in china on various mammalian cells. *Environ Sci.* 2005; 1:9-19.

Kaioumova D, et al. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere.* 2001; 43: 801-805.

Kimber, I. & Dearman, RJ. Immune response: adverse versus non-adverse effects. *Toxicol. Pathol.* 2002; 30: 54-58.

Kuper, FC. 3<sup>rd</sup> European Congress of Toxicologic Pathology, 2005, Copenhagen. Denmark. *Experimental and toxicologic pathology.* 2006; 57: 363-366.

Lei Federal n<sup>o</sup> 7802 de 11/07/1989. Disponível em: [www.geofiscal.eng.br/agrotoxico.htm](http://www.geofiscal.eng.br/agrotoxico.htm)  
Acesso em: 10/12/2009.

---

Lu, FC. Acceptable daily intakes: inception, evolution and application. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 1988; 8: 45-60.

Luebke RW, et al Immunotoxicogenomics: The potential Genomics Technology in the Immunotoxicity Risk Assessment Process. *Toxicological science.* 2006; 94: 22-27.

Luster MI, et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Programs guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988; 10: 2-19.

Luster, M.I., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J., Immunotoxicology: review of current status. *Ann. Allergy* 1990; 64: 427-432.

Luster, MI & Rosenthal, GJ. Chemical agents and the immune response. *Environ. Health Perspect.* 1993; 100: 219-236.

Marchiori B. Um período de dificuldades. *Exame.* 2005; 849: 46-47.

Neuparth T. Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assays. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2006; 76: 242–248.

OECD Guide line for the testing of chemicals. Repeated dose 28-day Oral Toxicity Study in rodents. No. 407, July 1995.

Oga S. *Fundamentos de Toxicologia.* 3<sup>a</sup> ed. 2008; São Paulo: Atheneu Editora.

Olgun S, et al. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicol.* 2004; 196:181-195.

Podstawka U. Toxic effects of dichlorvos on neutrophils of human peripheral blood in vitro. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 1994;45: 119-23.



---

Rana I & Shivanandappa T. Mechanism of Potentiation of Endosulfan Cytotoxicity by Thiram in Ehrlich Ascites Tumour Cells. *Toxicol In Vitro*. 2009.

Righi DA & Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. *Toxicology* 2005; 212: 98–106.

Robinson P. Priorities for mixtures health effects research. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2004; 18: 201–213.

Salem NM. Organochlorine pesticide residues in dairy products in Jordan. *Chemosphere*. 2009; 77: 673–678.

Santoni G, et al. Cypermethrin-induced alteration of thymocyte distribution and functions in prenatally-exposed rats. *Toxicology*. 1998; 125: 67-78.

Santoni G et al. Alterations of T cell distribution and functions in prenatally cypermethrin-exposed rats: possible involvement of catecholamines. *Toxicol*. 1999; 138: 175-187.

Sarkar SK. Occurrence, distribution and possible sources of organochlorine pesticide residues in tropical coastal environment of India: an overview. *Environ Int*. 2008; 34:1062-71.

Schuurman HJ, Kuper CF, Vos JG. Histopathology of the immune system as a tool to assess immunotoxicity. *Review. Toxicology*. 1994; 86: 187-212.

Selgrade, MK. Use of immunotoxicity data in health risk assessments: uncertainties and research to improve the process. *Toxicology*. 1999; 133: 59-72.

---

Soderlund DM, et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 2002; 171:3-59.

Stout R D & Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 76.

Vandebriel RJ, et al. Effects of *in vivo* exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide, hexachlorobenzene, and benzo(a)pyrene on cytokine (receptor) mRNA levels in cultured rat splenocytes and on IL-2 receptor protein levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 148: 126-136.

Verschoye RD, Aldridge WN. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Arch Toxicol.* 1980; 45: 325-9.

Vial T et al. Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system. *Toxicology*. 2002; 174: 3-11.

Voccia, I; Blakley, B; Brousseau, P; Fournier, M. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicol. Ind. Health.* 1999; 15:119-132.

Vohr H.W & Ruhl-Fehlert C. Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. *Sci Total Environ.* 2001; 270: 12-133.

Weiss, B; Amler, S; Amler, RW. Pesticides. *Pediatric.* 2004; 113: 1030-1036.

WHO: Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues. WHO Tech. Rep. Ser. v. 240, 1962.

Zhao M. Induction of Macrophage Apoptosis by an Organochlorine Insecticide Acetofenate. *Chem. Res. Toxicol.* 2009; 22: 504–510.

*Capítulo I I*

*Artigo*

---

---

**Mistura de praguicidas em baixas doses: avaliação da atividade macrofágica peritoneal e histopatologia de órgãos linfohematopoiéticos de ratos Wistar machos**

Marcela Rodrigues de Camargo<sup>1</sup>; Luís Fernando Barbisan<sup>2</sup>; João Lauro Viana de Camargo<sup>1</sup>; Carla Adriene da Silva Franchi<sup>1</sup>; Ana Lúcia Tozzi Spinardi-Barbisan<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Patologia – TOXICAM, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia - Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil.

<sup>1\*</sup> Autor correspondente

Departamento de Patologia, TOXICAM, Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu, 18618-000, SP, Brazil

Fone: 55-0-XX-14-3811-6238 / Fax: 55-0-XX-14-3815-2348

e-mail: [anabarbi@fmb.unesp.br](mailto:anabarbi@fmb.unesp.br)

---

---

## Resumo

O presente estudo avaliou o potencial imunotóxico da mistura de cinco praguicidas em baixas doses sobre a atividade de macrófagos peritoneais e histopatologia de órgãos linfohematopoiéticos de ratos. Para tal, 55 ratos Wistar machos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos e expostos aos praguicidas por 28 dias consecutivos: G I - controle negativo: ração basal semipurificada; G II (baixa dose): ração contendo diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22 mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg,; GIII (dose efetiva): ração semi-purificada contendo diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg e G IV a, b, c, d, e (controles positivos): ração semi-purificada contendo 2,3 mg/kg de diclorvós ou 2,5 mg/kg de dicofol ou 2,9 mg/kg de endosulfan ou 0,05 mg/kg de dieldrin ou 25,0 mg/kg de permetrina, respectivamente. Para avaliar o efeito destes praguicidas sobre a atividade de macrófagos peritoneais o índice de fagocitose, produção de óxido nítrico (NO), água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) foram quantificados. Também foram avaliados parâmetros bioquímicos e histopatologia de fígado, rins, adrenais e órgãos linfohematopoiéticos. A exposição a misturas de praguicidas foi incapaz de alterar a produção de TNF- $\alpha$ , NO e não interferiu na liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espontânea ou induzida por PMA. Não foram encontradas diferenças no espriamento de macrófagos e na fagocitose entre os diferentes grupos. Não foram encontradas alterações estruturais dignas de nota em baço, linfonodos e placas de Payer. Os presentes resultados demonstram que a mistura de praguicidas em baixas doses contendo diclorvós, dicofol, endosulfan, dieldrin e permetrina não exerce efeitos sobre a atividade de macrófagos de ratos Wistar machos após 28 dias de exposição.

**Palavras chave:** Imunotoxicidade, Mistura de Praguicidas, Macrófagos, Rato, Órgãos linfóides.

---

---

## 1. Introdução

A utilização de agentes químicos como praguicidas vem aumentando significativamente desde meados da década de 1960, contudo, seu uso se ampliou consideravelmente durante o século XX com o desenvolvimento da síntese química de moléculas específicas para um propósito (IARC, 1991). Embora o uso de praguicidas seja benéfico para aumentar a produtividade agrícola e reduzir a disseminação de insetos e doenças endêmicas, a exposição humana a estes agentes químicos é inevitável, devido à contaminação do ar, da água, do solo, e de alimentos (Ecobichon, 2001). Conseqüentemente, os efeitos adversos decorrentes da exposição do homem e de animais domésticos aos praguicidas estão se tornando um problema de saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde (WHO) e a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabeleceram índices de ingestão diária aceitável (IDAs) de resíduos de praguicidas. As IDAs são valores limite que, baseados em conhecimento toxicológico sobre determinado agente químico, indicam que é improvável que a exposição a seus resíduos represente qualquer risco à saúde humana se forem ingeridos dentro daqueles limites durante toda a vida dos indivíduos.

No Brasil, recentemente a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indicou que a população brasileira também está exposta a esses resíduos (ANVISA, 2005). Entre julho de 2001 e dezembro de 2004, o Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) pesquisou resíduos em 4.001 amostras de alimentos *in natura* (alface, banana, batata, cenoura, laranja, maçã, mamão, morango e tomate) coletadas em 12 estados da Federação. Do total de amostras analisadas, 3.271 apresentaram resíduos, sendo que 931 (28,5%) estavam irregulares, pois continham níveis acima dos Limites Máximos de Resíduos (LMR) (16,6%) ou continham resíduos de praguicidas não-autorizados para o tipo de cultura (83,4%). As culturas com maior freqüência de irregularidades foram as de

---

---

tomates, maçãs e morangos. Particularmente com relação aos tomates analisados entre 2001 e 2004, foram detectados resíduos de seis praguicidas não-autorizados (dicofol, dieldrin, endosulfan, monocrotofós, clorpirifós e diclorvós), e cinco praguicidas permitidos mostraram resíduos acima do LMR (metamidofós, permetrina, triazofós, ditiocarbamatos e cialotrina) (ANVISA, 2005). Em outra análise publicada em 2008 pela mesma agência, ainda foram encontradas culturas contaminadas com praguicidas não autorizados para aquele tipo de cultura ou com limites acima do permitido, deixando clara a exposição do ser humano a estes praguicidas (ANVISA, 2008).

Muitos praguicidas foram extensivamente estudados quanto aos seus efeitos tóxicos, no entanto, a maioria dos estudos conduzidos avaliou o efeito do agente químico isolado. Recentemente, os estudos toxicológicos têm dado grande importância ao estudo de misturas pelo fato da população ser exposta diariamente a uma diversidade de substâncias ao mesmo tempo, ou dentro de um curto espaço de tempo (Boobis et al., 2008).

Embora vários estudos tenham apontado a necessidade de se conhecer a toxicidade de misturas químicas para conduzir o processo de análise de risco, há escassez de dados sobre os efeitos e mecanismos de mistura sobre o sistema imunológico de mamíferos (Olgun et al., 2004). Com relação aos níveis de exposição, os dados sobre os efeitos agudos resultantes de exposições em altos níveis são normalmente bem conhecidos, mas, o conhecimento dos possíveis efeitos conseqüentes de exposição crônica em baixas doses é freqüentemente escasso. Entre estes efeitos está a imunotoxicidade.

Dentre as várias classes de substâncias, os praguicidas são reconhecidos por atuarem sobre o sistema imunológico modificando suas funções e/ou resposta do organismo hospedeiro frente a infecções e ao desenvolvimento de neoplasias (Descotes et al., 2000). Além disso, o sistema imunológico é considerado sensível a agentes químicos

---

---

em baixas doses quando não há evidência de toxicidade em nenhum outro sistema (Colosio, 2005).

A dinâmica do sistema imunológico, caracterizada pela proliferação e diferenciação celular, amplificação, transcrição e tradução gênica, faz dele um importante alvo dos efeitos tóxicos de xenobióticos (Vial et al., 2002). Dentre os diferentes órgãos que constituem o sistema imunológico, o timo e a medula óssea, responsáveis pelos processos de maturação e diferenciação dos componentes do sistema imunológico, são órgãos centrais para avaliação de imunotoxicidade (Pearse, 2006; Travlos, 2006).

Dentre os mecanismos de defesa imunológicos os aspectos funcionais de macrófagos têm sido propostos para avaliação do potencial imunotóxico de substâncias (Descotes, 2006). Conhecido como elemento-chave da resposta imune celular, o macrófago tem a capacidade de fagocitar microorganismos, produzir mediadores como citocinas e quimiocinas para o recrutamento celular, liberar enzimas citotóxicas, metabólitos do "burst" respiratório como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, demonstrando papel fundamental na resposta inflamatória e na defesa do organismo. Assim, torna-se ferramenta fundamental para o estudo de misturas em baixas doses devido ao seu papel chave entre a resposta imunológica inata e adaptativa (Stout & Suttles, 2004; Zhao, 2009).

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a exposição de ratos Wistar machos a cinco praguicidas (permetrina, dicofol, dieldrin, endosulfan e diclorvos) separadamente ou misturados em nível de NOEL (*No-observed effect level*) e LOAEL (*Low observed adverse effect level*) de cada um deles, sobre macrófagos peritoneais e órgãos linfematopoiéticos. Deve ser destacado que os cinco praguicidas escolhidos estão entre os contaminantes ambientais mais frequentes em vários países ao redor do globo.



---

## 2. Metodologia

### 2.1 Animais e ambiente de experimentação

Ratos Wistar machos, com 4 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp (CEMIB - Campinas, SP) foram alocados no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – SP em sala com condições ambientais controladas: temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade relativa do ar ( $55 \pm 10$  %), ciclo de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e circulação contínua de ar. Após aclimatação por duas semanas, período no qual receberam água e ração basal *ad libitum*, animais com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média cerca de 238g foram utilizados neste estudo. Durante todo o período experimental, os animais foram pesados e submetidos à avaliação clínica semanal. Diante da detecção de morbidade ou morte iminente, foi realizada a eutanásia do animal e os dados de necropsia registrados.

Todos os protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, SP, protocolo numero: 679.

### 2.2 Praguicidas

O praguicida dicofol ( $C_{14}H_9Cl_6O$ ), produto analítico 96,5 % (Milenia Agrociências S/A, Londrina, PR). O diclorvós ( $C_4H_7Cl_2O_4P$ ), produto analítico 99,4 %; permetrina, mistura de isômeros *cis* e *trans* ( $C_{21}H_{20}Cl_2O_3$ ), produto analítico 98,0 %; endosulfan, mistura de isômeros *alfa* e *beta* (2:1) ( $C_9H_6Cl_6O_3S$ ), produto analítico 100,0 %; dieldrin ( $C_{12}H_8Cl_6O$ ), produto analítico 97,9 % foram adquiridos da Fluka Chemicals, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA).

---

---

### 2.3 Ração com adição da mistura de praguicidas

A ração basal AIN 93M fornecida aos animais durante todo o período experimental foi produzida pela empresa HN&C Consultoria, Campinas-SP, assegurando-se, em sua formulação, o uso de constituintes livres de quaisquer resíduos de praguicidas. O processo de mistura e peletização da ração procedeu-se no dietário experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP onde a ração em pó e o óleo componente da formulação (8 %) foram misturados e peletizados. Para a ração acrescida dos praguicidas, estes foram previamente diluídos em óleo componente da formulação (8 %) e, em seguida misturados a ração basal em pó e, peletizada. Os diferentes tipos de ração foram identificados, embalados e conservados sob refrigeração a - 20 °C. Os consumos de ração e de água foram avaliados pela diferença de peso entre o oferecido e o residual, duas vezes/semana.

### 2.4 Delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido conforme o protocolo apresentado na Figura 1. Para a formação dos grupos experimentais, ratos Wistar machos foram randomizados e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos sendo os grupos 1, 2 e 3 constituídos de 10 animais cada e o grupo 4 subdividido em 5 grupos (a, b, c, d, e) contendo 5 animais cada.

**Grupo 1** - Grupo controle negativo: os animais receberam ração basal semipurificada *ad libitum* durante 28 dias consecutivos.

**Grupo 2** - Grupo baixa dose (NOEL): os animais receberam ração semi-purificada contendo diclorvós 0,23 mg/kg, dicofol 0,22mg/kg, endosulfan 0,6 mg/kg, dieldrin 0,025 mg/kg, permetrina 5,0 mg/kg, *ad libitum*, durante 28 dias consecutivos. Estas concentrações correspondem ao NOEL para ratos dos respectivos praguicidas (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996)

**Grupo 3** - Grupo dose efetiva (LOAEL): Os animais receberam ração semi-purificada *ad libitum* contendo diclorvós 2,3 mg/kg, dicofol 2,5 mg/kg, endosulfan 2,9 mg/kg, dieldrin 0,05 mg/kg, permetrina 25,0 mg/kg, *ad libitum*, durante 28 dias consecutivos. Estas concentrações correspondem aos LOAELs (*lowest observed level adverse effect* = menor nível de efeito adverso observável) para ratos dos praguicidas dieldrin e endosulfan. Para o dicofol foi utilizado o LOEL (*lowest observed effect level*), e para o diclorvós e permetrina o LEL (*lowest effect level*) (FAO/WHO, 1986; WHO/FAO, 1970; 1989; 1996).

**Grupo 4 (a, b, c, d, e)** - Grupos controles positivos: Os animais de cada subgrupo (n = 5) receberam durante 28 dias consecutivos ração semi-purificada *ad libitum* contendo: a) 2,3 mg/kg de diclorvós; b) 2,5 mg/kg de dicofol; c) 2,9 mg/kg de endosulfan; d) 0,05 mg/kg de dieldrin e e) 25,0 mg/kg de permetrina.

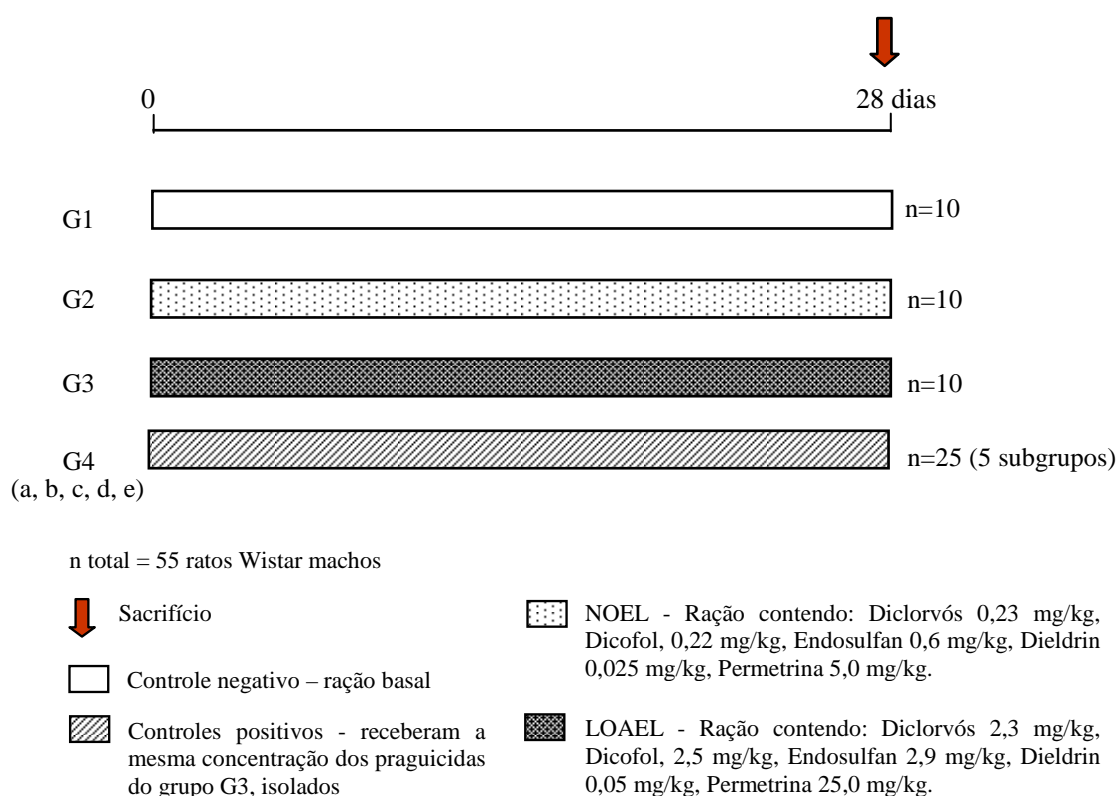


Figura I – Delineamento experimental

---

---

## 2.5 Sacrifício, coleta de material e processamento histológico

Ao final de 28 dias de exposição aos praguicidas, todos os animais foram submetidos à narcose induzida em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram coletados, através de punção, cardíaca, cerca de 8 ml de sangue para a obtenção de soro utilizado na análise do perfil bioquímico. Então, procedeu-se a coleta dos macrófagos peritoneais utilizados para avaliar o índice de fagocitose e de espriamento de macrófagos, a detecção da liberação de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) espontânea e induzida pelo acetato miristato de forbol (PMA, sigla do inglês), a produção de óxido nítrico (NO) e de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Após o procedimento de coleta dos macrófagos peritoneais foi realizada a necropsia para a retirada do fígado, rins, adrenais e órgãos linfohematopoiéticos (timo, baço, fêmur, linfonodos mesentéricos e placas de Payer) para análise histopatológica. Todos os órgãos foram fixados em formalina 10 % tamponada (tampão fosfato pH = 7,2). O fêmur foi descalcificado em solução citrato de sódio + ácido fórmico, por período de 10 dias antes do recorte e inclusão em parafina. O processamento histológico seguiu método convencional e os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica.

Os critérios para análise histológica dos órgãos linfohematopoiéticos estão apresentados na Tabela 1, seguindo critérios semi-quantitativos apresentados por Kuper et al. (2000).

O fígado, os rins, as adrenais, o timo e o baço foram pesados em balança analítica de precisão. O peso relativo dos órgãos de cada animal foi calculado a partir do peso absoluto do órgão em relação ao peso do animal x 100.

Tabela 1. Critérios para análise histopatológica de órgãos linfohematopoiéticos.

<b>Órgãos e tecidos</b>	<b>Alterações nos órgãos <sup>a</sup></b>
<b>Medula óssea</b>	Alterações da celularidade (aumentada ou diminuída, relação mielóide/eritróide) e da maturação das séries mielóide e eritróide
<b>Timo</b>	Relação córtex/medula, alterações da celularidade na córtex e medula, macrófagos em aspecto de céu estrelado
<b>Baço</b>	Alterações da celularidade na polpa branca (PALS <sup>b</sup> , na zona marginal, folículos) e da polpa vermelha, hematopoiese extramedular
<b>Linfonodos mesentéricos</b>	Alterações da celularidade da área paracortical, cortical e medular, desenvolvimento de centro germinativo, formação de roseta eritrocitária, histiocitose, plasmocitose

<sup>a</sup>Baseado em critérios estabelecidos por Kuper et al., 2000; <sup>b</sup>PALS, sigla do inglês: bainha linfocítica periarteriolar.

## 2.6 Dosagens bioquímicas

Amostras de soro dos diferentes grupos foram processadas em espectrofotômetro modelo SB-190 (CELM), no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, SP. Foram mensuradas as seguintes provas bioquímicas: alanina aminotransferase (ALT) - método otimizado cinético em UV (ALT /TGP UV – KATAL), albumina - método colorimétrico por reação com o verde de bromocresol (Albumina – KATAL), proteína sérica total - método colorimétrico por reação com o reativo de biureto (Proteínas totais – KATAL), creatinina - método colorimétrico por reação cinética com o picrato alcalino (Creatinina cinética – KATAL) e uréia - método enzimático colorimétrico, (Uréia Enzimática UV – KATAL).

---

---

## **2.7 Coleta de macrófagos peritoneais**

Todos os animais foram inoculados com 20 ml de solução salina tamponada (PBS, pH= 7,4) gelada, na cavidade peritoneal. Após o inoculo, o abdômen foi massageado por cerca de 60 vezes, e com o auxílio de uma seringa, o líquido peritoneal foi colhido e transferido para tubos estéreis (mantidos sob refrigeração). Este procedimento foi repetido duas vezes e as suspensões celulares foram centrifugadas sob refrigeração por 10 minutos a 200 g. As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas-SP) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas-SP). O número de células foi ajustado para  $2 \times 10^6$  macrófagos/ml de acordo com o critério morfológico (0.02% vermelho neutro) sendo utilizadas suspensões com viabilidade superior a 90% (azul de Trypan) e predominância de macrófagos superior a 90%, quando comparados a outros tipos celulares.

## **2.8 Espreadimento e fagocitose**

O método utilizado para estudar o efeito da mistura dos praguicidas sobre o espreadimento e fagocitose dos macrófagos foi baseado naquele descrito por Fonseca et al. (2002). Foram utilizados macrófagos peritoneais, obtidos conforme descrito anteriormente, de todos os grupos experimentais. Para o espreadimento de macrófagos, 200 µl de cada suspensão celular foram plaqueados em duplicata (monocamadas) em lamínulas de vidro. Vinte minutos após, os poços foram lavados com PBS gelado, adicionado 1 ml de meio RPMI 1640 e as placas incubadas a 37° C em estufa de CO<sub>2</sub> por 1 h. Após a incubação as células foram novamente lavadas com PBS gelado e as células aderentes fixadas com 0,5 % de glutaraldeído por 10 minutos. Foram contadas 100 células (redondas ou espreadas) em microscópio de contraste de fase na objetiva de 40 x, coradas com H&E.

---

---

Para o índice de fagocitose foi utilizado o mesmo método acima sendo adicionado 1 mg de Zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (2,5 mg/ml de solução) a cada poço da placa antes do período de incubação de 1 h e coradas por May Grünwald – Giemsa.

## **2.9 Determinação da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Liberações espontâneas ou induzidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram determinadas em monocamadas de macrófagos estimulados ou não com PMA seguindo o método descrito por Pick & Mizel (1981). Suspensões celulares obtidas conforme descrito anteriormente, na concentração de  $2 \times 10^6$ /ml, foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas por 2 h a 37 °C. Em seguida, as células não-aderentes foram removidas e a monocamada de macrófagos incubada novamente a 37 °C por 24 h. Após este período, o sobrenadante foi coletado e reservado para a dosagem de NO, e, à monocamada de macrófagos foi adicionado 100 µl de solução de vermelho fenol contendo 140 mM de NaCl, 10 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5,5 mM de dextrose, 0,5 mM de vermelho fenol e peroxidase de raiz forte tipo II (0,01 mg/ml). A reação foi interrompida 1h após o início com 10 µl de NaOH 1 M e a absorbância foi determinada em leitor Elisa a 620 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2 x 10<sup>5</sup> células, comparando-se a D.O. de uma curva-padrão com concentrações conhecidas.

## **2.10 Determinação da liberação de óxido nítrico**

Foi determinada em sobrenadante de cultura de macrófagos (obtido conforme descrito anteriormente) pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (Green, 1981). Para cada 50 µl do sobrenadante foi adicionado 50 µl do reagente de Griess contendo 1 % sulfanilamide (Synth, Diadema, SP, Brazil), 0.1% naphthylene diamine

---

---

dihydrochloride (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) e 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, por 10 min e o acúmulo de nitrito foi quantificado em leitor Elisa no comprimento de onda de 540 nm. A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva-padrão conhecida e os níveis de absorvância expressos em  $\mu\text{mols}/2 \times 10^5$  células.

### **2.11 Quantificação de TNF- $\alpha$**

Suspensões de macrófagos peritoneais (obtido conforme descrito anteriormente) foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^6/\text{ml}$  para quantificação da produção basal de TNF- $\alpha$  e sob estímulo *in vitro*. Para a produção basal de TNF- $\alpha$ , as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 acrescido de 10 % de soro bovino fetal (500  $\mu\text{l}$ /poço). Para avaliar a produção de TNF- $\alpha$  sob estímulo *in vitro* as células foram cultivadas com *Staphylococcus aureus* Cowan strain 1 (SAC - Calbiochem, San Diego, CA, EUA, Pansorbin, cells standartized, Ref 507861) na diluição de 1:5000, 500  $\mu\text{l}$ /poço. As placas foram incubadas a 37 °C, em estufa com tensão de 5 % de CO<sub>2</sub>, por 24 h. Após a incubação, o sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado em tubos *ependorf* de 500  $\mu\text{l}$  e congelados em freezer - 70 °C até o momento da análise.

Para detecção do TNF- $\alpha$  foi utilizado Kit Elisa ELISA Ready-SET-Go (eBioscience, San Diego, USA). Todos os protocolos utilizados seguiram as recomendações dos fabricantes. A leitura do ensaio foi realizada em leitor Elisa (Multiskan Ex, Labsystems, Finlândia) a 450 nm. A quantidade de citocina foi calculada a partir da curva-padrão da citocina recombinante, utilizando-se o método de regressão linear.

### **2.12 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software GraphPad InStat para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para as comparações dos



---

---

grupos foram cruzados G1 x G2 e G3 e G1 x G4 a, b, c, d, e. Os resultados referentes às medidas de peso corpóreo e de órgãos, consumos de ração e água, dados bioquímicos e atividade de macrófagos foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis, de acordo com a distribuição de normalidade dos dados. O nível de significância considerado para estabelecer diferenças entre os grupos foi de  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados**

#### **3.1 Peso corpóreo, consumo de ração e peso de órgãos**

A Tabela 2 mostra que a exposição aos praguicidas em mistura ou isolados não altera o peso corpóreo final (G1 x G2 e G3  $p = 0,995$ ; G1 x G4 a,b,c,d,e  $p = 0,135$ ) e o ganho de peso corpóreo médio (G1 x G2 e G3  $p = 0,071$ ; G1 x G4 a,b,c,d,e  $p = 0,914$ ) nos diferentes grupos. Da mesma forma, o consumo de ração (Tabela 2) e de água (dados não mostrados) não foi alterado entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, foi observado aumento do peso corpóreo inicial ( $p < 0,001$ ) nos grupos expostos ao diclorvós e endosulfan (Tabela 2). Nenhuma diferença foi encontrada com relação ao peso absoluto (dados não mostrados) e relativo do fígado, rins, adrenais, baço e timo, ao final de 28 dias de exposição aos praguicidas (Tabela 3).

Tabela 2. Peso corpóreo inicial, final, ganho de peso corpóreo médio e consumo médio de ração pelos animais controles e expostos a diferentes praguicidas, em mistura ou isolados, por 28 dias.

Grupos	No. de animais	Peso corpóreo médio (g)			Consumo médio de ração (g/dia/animal)
		Inicial	Final	Ganho	
Controle	10	220,10 ± 18,37 <sup>a</sup>	343,40 ± 35,55 <sup>a</sup>	123,30 ± 24,17 <sup>a</sup>	20,47 ± 0,79 <sup>a</sup>
NOEL <sup>1</sup>	10	238,70 ± 28,02 <sup>a</sup>	341,90 ± 30,11 <sup>a</sup>	103,20 ± 11,76 <sup>a</sup>	21,22 ± 2,59 <sup>a</sup>
LOAEL <sup>2</sup>	9	238,50 ± 18,69 <sup>a</sup>	342,56 ± 37,53 <sup>a</sup>	103,11 ± 25,76 <sup>a</sup>	19,38 ± 0,93 <sup>a</sup>
Dieldrin	5	215,40 ± 16,94 <sup>a</sup>	327,20 ± 32,54 <sup>a</sup>	111,80 ± 15,96 <sup>a</sup>	19,38 ± 1,18 <sup>a</sup>
Diclorvós	4	252,80 ± 16,54 <sup>b</sup>	371,75 ± 28,04 <sup>a</sup>	115,25 ± 19,91 <sup>a</sup>	19,50 ± 3,65 <sup>a</sup>
Dicofol	3	242,40 ± 20,27 <sup>a</sup>	365,33 ± 23,46 <sup>a</sup>	112,67 ± 14,05 <sup>a</sup>	19,82 ± 2,72 <sup>a</sup>
Endosulfan	4	264,60 ± 16,64 <sup>b</sup>	382,25 ± 38,81 <sup>a</sup>	114,75 ± 35,26 <sup>a</sup>	20,77 ± 3,01 <sup>a</sup>
Permetrina	4	236,20 ± 20,75 <sup>a</sup>	352,50 ± 15,80 <sup>a</sup>	116,75 ± 36,28 <sup>a</sup>	19,83 ± 3,00 <sup>a</sup>

<sup>1,2</sup> mistura de 5 praguicidas (dieldrin, diclorvós, dicofol, endossulfan e permetrina) em doses de NOEL - No-observed-effect-level e LOAEL – Low-observed-adverse-effect level respectivamente; Valores apresentados na forma de média ± SD dos 28 dias de tratamento; letras diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,001$ ).

Tabela 3. Peso relativo<sup>1</sup> do fígado, rins, adrenais, baço e timo de animais controles e expostos a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias.

Grupos	nº de animais	Fígado	Rins <sup>2</sup>	Adrenais <sup>3</sup>	Baço	Timo
Controle	10	4,30 ± 0,35	0,47 ± 0,11	0,013 ± 0,005	0,29 ± 0,04	0,18 ± 0,03
NOEL <sup>4</sup>	10	4,05 ± 0,41	0,62 ± 0,27	0,011 ± 0,003	0,29 ± 0,02	0,16 ± 0,03
LOAEL <sup>5</sup>	9	4,40 ± 0,37	0,53 ± 0,10	0,015 ± 0,008	0,27 ± 0,03	0,17 ± 0,03
Dieldrin	5	4,26 ± 0,15	0,52 ± 0,12	0,010 ± 0,002	0,30 ± 0,05	0,18 ± 0,01
Diclorvós	4	4,21 ± 0,26	0,51 ± 0,15	0,014 ± 0,004	0,30 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Dicofol	3	4,02 ± 0,37	0,51 ± 0,13	0,015 ± 0,008	0,26 ± 0,03	0,15 ± 0,01
Endosulfan	4	4,08 ± 0,33	0,52 ± 0,13	0,010 ± 0,005	0,27 ± 0,03	0,14 ± 0,02
Permetrina	4	4,26 ± 0,21	0,46 ± 0,08	0,009 ± 0,004	0,30 ± 0,03	0,17 ± 0,05

<sup>1</sup> peso relativo: calculado a partir do peso absoluto do órgão em relação ao peso do animal x 100; <sup>2,3</sup> valores médios dos rins e adrenais direita e esquerda, respectivamente; <sup>4,5</sup> mistura de 5 praguicidas (dieldrin, diclorvós, dicofol, endossulfan e permetrina) em doses de NOEL - No-observed-effect-level e LOAEL – Low-observed-adverse-effect level, respectivamente; Valores apresentados na forma de média ± SD dos 28 dias de tratamento.

### 3.2 Bioquímica

Os níveis séricos de albumina, proteína total e creatinina não diferem daqueles observados no grupo controle (Tabela 4). Entretanto, os níveis de uréia foram significativamente maiores ( $p = 0,009$ ) no grupo exposto à dose efetiva (LOAEL) da mistura. Em se tratando da exposição isolada aos praguicidas, o nível sérico da enzima ALT foi significativamente menor ( $p = 0,002$ ) no grupo exposto a permetrina, comparado ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos de animais controles e expostos a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias.

Grupos	No. de animais	ALT <sup>1</sup>	Albumina	Proteína Total	Creatinina	Uréia
Controle	10	52,82 ± 11,03	4,62 ± 0,45	6,99 ± 0,55	0,71 ± 0,11	50,81 ± 21,81
NOEL <sup>2</sup>	10	46,56 ± 10,32	4,34 ± 0,48	6,73 ± 0,61	0,81 ± 0,13	68,50 ± 13,48
LOAEL <sup>3</sup>	9	45,11 ± 7,26	4,38 ± 0,33	6,33 ± 0,79	0,76 ± 0,17	80,30 ± 14,93
Dieldrin	5	51,94 ± 6,36	4,58 ± 0,48	6,34 ± 0,73	0,74 ± 0,10	61,26 ± 11,34
Diclorvós	4	52,78 ± 24,92	4,50 ± 0,19	6,08 ± 0,48	0,70 ± 0,07	61,28 ± 10,60
Dicofol	3	30,57 ± 2,57	4,03 ± 0,26	6,67 ± 0,12	0,83 ± 0,12	65,97 ± 44,01
Endossulfan	4	39,68 ± 4,27	4,43 ± 0,29	6,73 ± 0,25	0,93 ± 0,29	69,95 ± 26,60
Permetrina	4	28,68 ± 2,45	4,15 ± 0,23	5,85 ± 0,93	0,75 ± 0,09	58,25 ± 5,26

<sup>1</sup>Alanina aminotransferase <sup>2,3</sup>mistura de 5 praguicidas (dieldrin, diclorvós, dicofol, endossulfan e permetrina) em doses de NOEL - No-observed-effect-level e LOAEL - Low-observed-adverse-effect level respectivamente; Valores apresentados na forma de média ± SD dos 28 dias de tratamento; letras diferentes indicam diferenças entre os grupos ( $p < 0,009$ ).

### 3.3 Análise histológica

O exame microscópico dos diferentes órgãos linfohematopoiéticos não revelou alterações histológicas dignas de nota no baço, placas de Payer do intestino delgado e linfonodos mesentéricos nos diferentes grupos (anexo, Figuras 1 e 2). Entretanto, no timo e

---

---

na medula óssea, a exposição a misturas resultou em alterações estruturais focais não significativas. No timo, as alterações mais frequentemente encontradas foram: aumento do número de macrófagos em aspecto de céu estrelado e focos de hemorragia medular (anexo, Figura 3). Tais alterações foram mais frequentes nos grupos expostos a mistura de praguicidas em nível de NOEL (62 % dos animais expostos x 43 % dos animais controles apresentaram aumento do número de macrófagos em aspecto de céu estrelado) ou LOAEL (44 % dos animais expostos x 28 % dos animais controles apresentaram aumento de hemorragia medular) (anexo, Figura 3). Na medula óssea, a alteração estrutural mais frequentemente observada em todos os grupos expostos ou não aos praguicidas isolados ou em mistura (média de 20 % dos animais/grupo x 11 % controle) foi o aumento focal de tecido adiposo unilocular (anexo, Figura 1).

Os animais expostos aos praguicidas em mistura ou isolados não apresentaram alterações estruturais hepáticas dignas de nota. Entretanto, nos rins tanto a análise macroscópica como microscópica mostrou evidente hidronefrose em cerca de 80 % dos animais nos diferentes grupos experimentais, inclusive no grupo controle. As alterações mais frequentemente observadas foram: dilatação tubular focal ou difusa unilateral ou bilateral e atrofia glomerular, de padrão leve ou intenso, associadas a compressão do parênquima renal (anexo, Figura 4).

### **3.4 Atividade de macrófagos**

Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de espraiamento [G1 x G2, G3 ( $p = 0,369$ ) e G1 x G4 a,b,c,d,e ( $p = 0,078$ )] e de fagocitose [G1 x G2, G3 ( $p = 0,954$ ) e G1 x G4 a,b,c,d,e ( $p = 0,710$ )] ao final de 28 dias de exposição aos praguicidas em mistura ou isolados. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

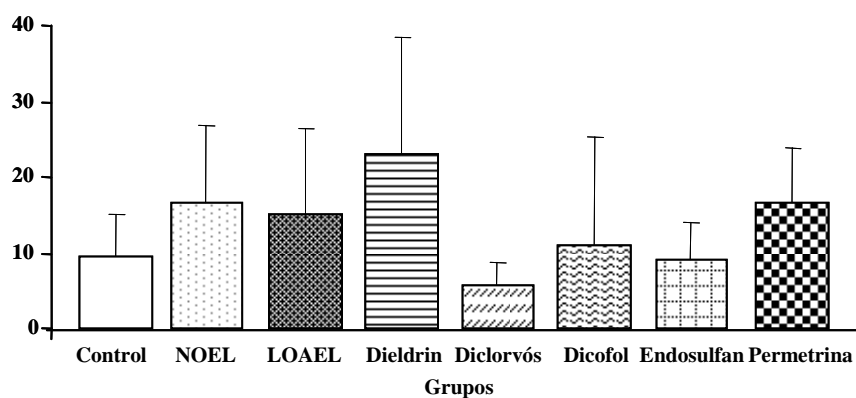


Figura 2. Efeitos da exposição a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias, sobre o índice de espraiamento de macrófagos.

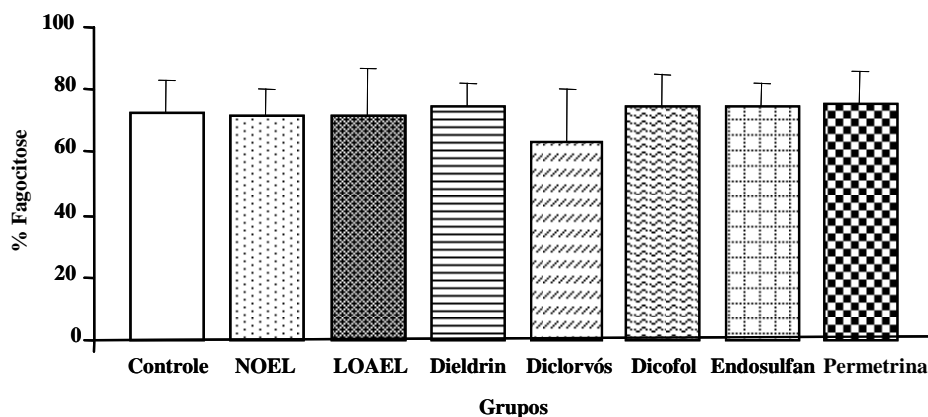


Figura 3. Efeitos da exposição a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias, sobre o índice de fagocitose de macrófagos.

As Figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ( $0,922 < p > 0,081$ ) com relação à liberação de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de macrófagos estimulados ou não *in vitro*, respectivamente.

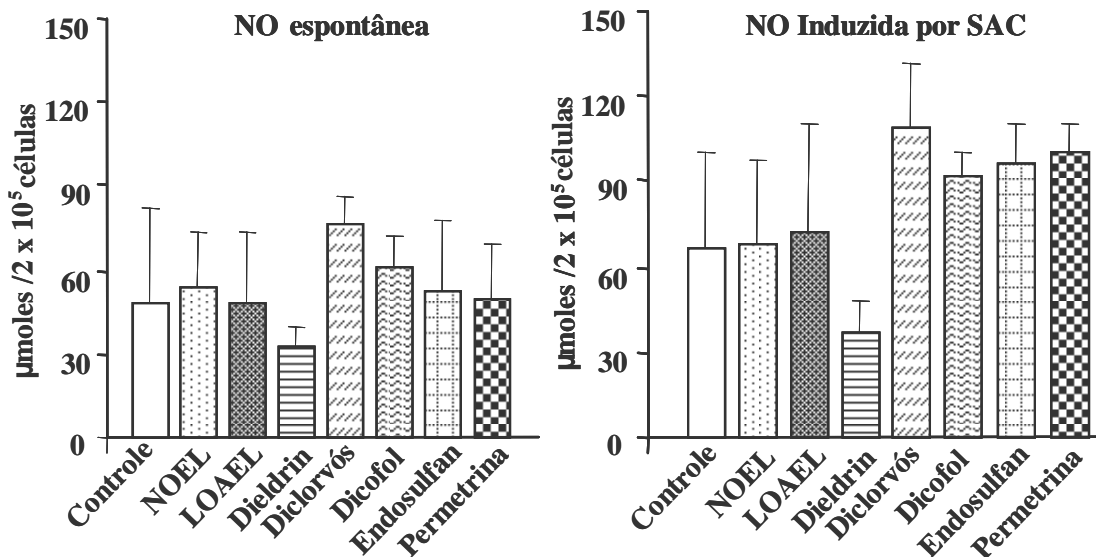


Figura 4. Efeitos da exposição a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias, sobre a produção de NO espontânea ou induzida por SAC.

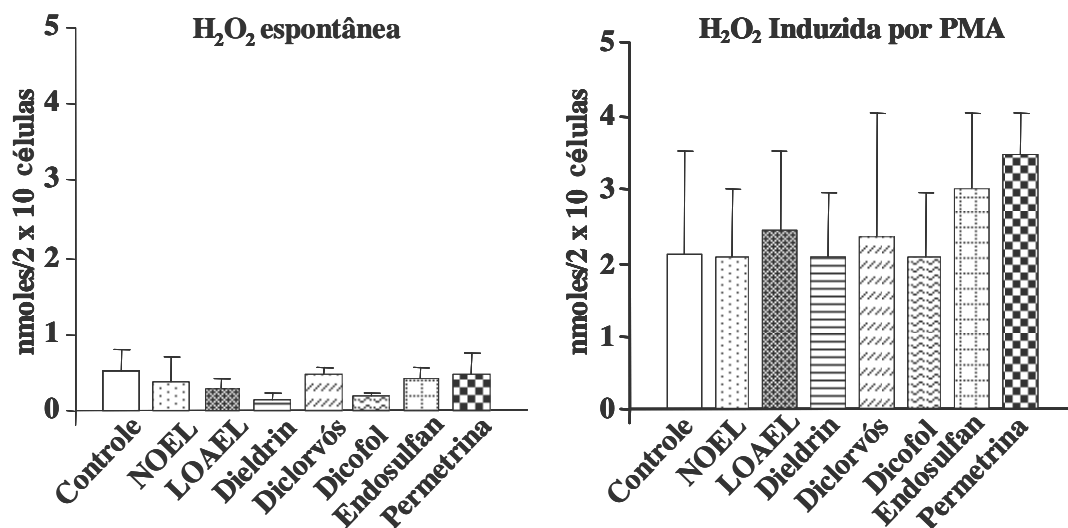


Figura 5. Efeitos da exposição a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias, sobre a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espontânea ou induzida por PMA.

### 3.5 Produção de TNF- $\alpha$

A Figura 6 mostra os resultados referentes a produção de TNF- $\alpha$  basal e sob estímulo *in vitro* com SAC, de macrófagos peritoneais de ratos expostos por 28 dias a

diferentes praguicidas em mistura ou isolados. Os praguicidas não exerceram efeitos sobre a liberação de TNF- $\alpha$  quando comparados ao controle ( $0,186 < p > 0,07$ ).

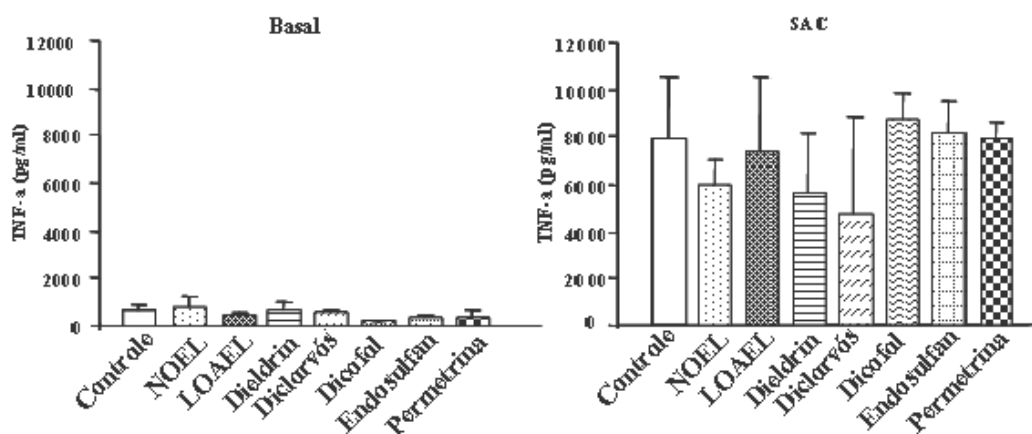


Figura 6. Efeitos da exposição a diferentes praguicidas em mistura ou isolados, por 28 dias, sobre a produção de TNF- $\alpha$  basal ou estimulada por SAC.

#### 4. Discussão

Avaliar a mistura de praguicidas em baixas doses parece ser pertinente para o momento em que vivemos, onde encontramos diversas irregularidades nas culturas agrícolas de nosso país (ANVISA, 2005 e 2008). A combinação de compostos químicos com órgãos alvo pode causar efeitos aditivos, sinérgicos ou até mesmo de antagonismo (Carpy, 2000; Boobis, 2008). No entanto, não existem muitos estudos que esclareçam bem estas possíveis interações e suas reações no sistema imunológico (Chapin, 2004; Reffstrup, 2009).

Estando diretamente ligado a imunidade inata e indiretamente a imunidade adaptativa, os macrófagos têm sido reconhecidos como um componente crítico do sistema imunológico, podendo regular desde a resposta deste sistema contra um microorganismo, até o desenvolvimento de um tumor sólido (Gordon, 2005). Desta forma, a produção de

---

---

NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$  assim como a capacidade de ativação e fagocitose dos macrófagos se torna ferramenta importante para o estudo da imunotoxicologia, uma vez que esta é uma das principais células no desencadeamento de reações inflamatórias.

No presente estudo, os praguicidas administrados em mistura ou isolados em baixas doses, não modificam a produção de NO e não interferem na liberação espontânea ou induzida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da mesma forma, não afetam os índices de espreiamento e de fagocitose.

O espreiamento de macrófagos é um processo ativo que representa se uma célula se torna ativada e pronta para a fagocitose de partículas (Fiedler, 1989). Embora seu papel possa ser controverso na fagocitose, vários estudos têm mostrado diferenças no espreiamento após várias manipulações. Righi & Palermo-Neto (2005), mostraram que a cialotrina, um piretróide do tipo II, administrada a ratos Wistar machos, por gavagem, nas doses de 1,0 e 3,0 mg/kg pc, por 7 dias, diminui os índices de espreiamento e de fagocitose. Ao contrário, em nosso estudo, os praguicidas administrados em mistura ou isolados, em baixas doses, não modificaram o espreiamento ou a fagocitose de macrófagos peritoneais após 28 dias de exposição.

Um importante mecanismo de defesa inata é a fagocitose, onde a capacidade dos macrófagos em ingerir macromoléculas extracelulares é avaliada. Em estudo de misturas com organoclorados pode ser observado um efeito antagônico sobre a resposta imune humoral à hemácia de carneiro (SRBC, sigla do inglês) e a atividade fagocitária de macrófagos, sendo inibitório sobre a atividade fagocítica (Flipo et al., 1992). O mesmo foi observado em estudo realizado com substância similar ao piretróide (Quinteiro Filho, 2009). Já com neutrófilos na presença de dieldrin na concentração de 0.1% (v/v) álcool etílico, tanto a função fagocítica quanto o espreiamento não foram alterados, ao que parece, os neutrófilos possuem um mecanismo de desintoxicação celular, responsável pela não



---

---

resposta a esse praguicida indicando que os neutrófilos podem responder diferentemente aos vários produtos químicos (Pelletier et al., 2001). Em nossos estudos, também não observamos diferenças significativas no índice de fagocitose e nem na porcentagem de espraiamento de macrófagos quando comparados ao controle sugerindo que a mistura de praguicidas em baixas doses não interfere na ativação nem na capacidade fagocítica dos macrófagos, seja por plasticidade macrofágica ou por uma possível capacidade de detoxificação.

Os macrófagos quando estimulados, *in vivo* ou *in vitro*, respondem com elevada produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O NO é um mediador com ampla variedade de funções, incluindo inflamação, vasodilatação, neurotransmissão, inibição de agregação plaquetária e outros mecanismos homeostáticos (MacMicking, 1997). Em doses mais altas, organofosforados e organoclorados podem estimular a produção destes mediadores, além de favorecer a liberação da citocina TNF- $\alpha$ , pelos macrófagos contribuindo para o desencadeamento do processo inflamatório, desequilíbrio das citocinas e consequente alteração da homeostase do sistema imunológico, colaborando para efeitos imunossupressores (Han, 2007; Dutta, 2008; Zhao, 2009). Em nosso estudo, a exposição isolada ou em mistura dos praguicidas não modificou os níveis de TNF- $\alpha$ , NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, liberados de macrófagos peritoneais, estimulados ou não com SAC ou PMA, respectivamente. Correlações tem sido feitas entre o aumento de citocinas pró inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e doenças inflamatórias crônicas, por exemplo, incluindo asma, artrite reumatóide e alergias (Han, 2007; Dutta, 2008). O aumento do estresse oxidativo tem sido relacionado com um aumento da atividade da NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase) (Srivastava & Shivanandappa, 2009). Assim, em trabalho experimental publicado por Tuzmen e colaboradores (2008) foi demonstrado que o equilíbrio oxidante-antioxidante é mais afetado pelo tratamento de piretróide que por organoclorado quando avaliados

---

---

individualmente, sugerindo que na condição de misturas em baixas doses os macrófagos não sofrem interferências de xenobióticos e conseqüentemente permitem o normal desencadeamento das atividades inflamatórias quando avaliado o estresse oxidativo.

A avaliação do peso corpóreo, do peso relativo dos órgãos dos animais e da análise histológica são ferramentas fundamentais em estudos de toxicologia. A alteração no peso dos órgãos geralmente é associada a efeitos diretos ou indiretos de tratamentos, sugerindo toxicidade (Black, 2002; Wooley, 2003). Neste contexto, em nosso estudo, não foram observadas alterações significativas no ganho de peso corpóreo, bem como no consumo de ração, o que denota ausência de toxicidade sistêmica. Além disso, não foram observadas alterações no peso relativo do fígado, bem como bioquímicas (ALT, albumina e proteína total) e histológicas, a ponto de interferir na função deste órgão. Entretanto, nos rins, embora não tenham sido observadas alterações no peso relativo, foi observado aumento nos níveis séricos de uréia e presença de hidronefrose bilateral ou unilateral em cerca de 80 % dos animais expostos ou não aos praguicidas. Provavelmente, esta alta incidência de hidronefrose não está associada a efeito de tratamento, uma vez que todos os grupos foram acometidos. Em muitas linhagens de ratos de laboratório e, frequentemente em ratos albinos a hidronefrose congênita ocorre ocasionalmente (Hard et al., 1999). Esta lesão é freqüentemente unilateral, afetando mais o lado direito em muitas linhagens de ratos, conforme o observado em nosso estudo. A hidronefrose é caracterizada pela dilatação da pelve e cálices renais em diferentes graus e é normalmente progressiva. Por outro lado, esta lesão pode ser adquirida como uma complicação secundária da obstrução do escoamento do trato urinário, por exemplo, como resultado de uma inflamação crônica do trato urinário inferior (Hard et al., 1999). Desta forma, a alta incidência de hidronefrose nos diferentes grupos experimentais pode ser advinda das características genéticas da linhagem utilizada.

---

---

A análise dos órgãos linfohematopoiéticos sugere que as alterações estruturais focais encontradas especialmente no timo e na medula, não são consideradas relevantes, uma vez que foram também encontradas no grupo controle. Isto mostra ausência de efeito de exposição aos praguicidas isolados ou em mistura, nas doses e período de exposição avaliados. Na verdade, estudos adicionais avaliando testes funcionais podem ser úteis para precisar as alterações estruturais focais relatadas neste estudo.

Uma variedade de fatores e condições resulta na alteração da densidade e composição celular do timo. A lesão mais comumente encontrada é a diminuição do número de linfócitos, acompanhada de aumento do número de macrófagos em aspecto de céu estrelado (corpos apoptóticos) resultante de influências fisiológicas e efeitos imunossupressores de xenobióticos (Pearse, 2006). Embora, em nosso estudo o grupo NOEL tenha apresentado uma porcentagem maior de animais com aumento de macrófagos em aspecto de céu estrelado, outras alterações associadas, como diminuição da área cortical e relação córtex-medula não foram observadas, assim como no grupo controle.

Na medula óssea a presença de focos de tecido adiposo unilocular não apresenta relevância, uma vez que foram também observados no grupo controle. Além disso, não foi observado aumento de hematopoiese extramedular nos diferentes grupos, o que seria indicativo de depleção de células na medula óssea (Travlos, 2006).

A exposição aos praguicidas dieldrin, diclorvós, dicofol, endosulfan e permetrina administrados de forma isolada ou em mistura, em baixas doses, não afeta a atividade de macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos após 28 dias de tratamento, fator que favorece a homeostase macrofágica nessas condições. Este resultado sugere que a exposição do homem a resíduos destes praguicidas em baixas doses pode fornecer níveis de segurança quando consideramos organismos saudáveis.

---

---

### *Agradecimentos*

A realização deste estudo foi possível pelo Auxílio Financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Proc. no. 52035 e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Proc. no.06/60506-1 e pela Bolsa de Estudo do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) Proc. no. 130467/2008-1 concedida a Marcela Rodrigues de Camargo. E, pelo auxílio da Dra. Ana Paula Bordon-Graciane no processamento e análises de parâmetros de atividade macrofágica.

---

---

## 5. Referências Bibliográficas

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Controlando agrotóxicos nos alimentos: O trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, ES, GO, MG, MS, PA, PE, PR, RJ, RS, SC, SP, TO, a FIOCRUZ/INCQS e os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED, LACEN/PR e ITEP/PE. Relatório de atividades 2004. Brasília, DF, 2005. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 30 set 2009.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA). Nota Técnica sobre o risco de consumo de frutas e hortaliças cultivadas com agrotóxicos, 2008. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) (acesso em 30 set 2009).

Black, H. Preparation of the report for a toxicology/pathology study. In Handbook of Toxicologic Pathology (W.M. Haschek, C. G. Rousseaux, and M.A. Wallig, eds), 2002, vol.1, pp 419-33. Academic Press, San Diego, CA.

Boobis AR et al. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. Toxicology Letters. 2008; 180: 137–150.

Carpy, SA. Health risk of low-dose pesticides mixtures: a review of the 1985-1998 literature on combination toxicology and health risk assessment. J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 2000; 3(1):1-25.

Chapin RE. Nature Is Complex: Our Orchestra Seats at the Most Wonderful Show on Earth. Toxicological Sciences. 2004; 80: 1–2.

Colosio C. Low level exposure to chemicals and immune system. Toxicology and Applied Pharmacology. 2005; 207: S320 – S328.

Descotes J, et al. Responses of the immune system to injury. Toxicol. Pathol. 2000; 28: 479-481.

---

---

Descotes J. Methods of evaluating immunotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2: 249-59.

Dutta R. Immunomodulatory effect of DDT (bis[4-chlorophenyl]-1,1,1-trichloroethane) on complement system and macrophages. *Toxicology*; 2008.

Ecobichon D.J. Toxic effects of pesticides. IN: Casarett and Doull's Toxicology, the basic science of poisons. Editor C. D. Klaassen, McGraw-Hill, New York, 6<sup>th</sup> ed. 2001; 22: 763-810.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex maximum limits for pesticide residues. 2nd ed. Rome: FAO/WHO; 1986. v13.

Fiedler, I.J. Macrophage and metastasis – a biological approach to cancer therapy. *Cancer Res.* 1989; 45: 4714–4723.

Fonseca, ESM; Massoco, CO; Palermo-Neto, J. Effects of prenatal on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiology & Behavior.* 2002; 77: 205-215.

Flipo D, et al. Combined effects of selected insecticides on humoral immune response in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14: 747–752.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:953-64.

Green L.C.. Nitrite biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 18: 7764-7768.

Han EH. Inflammatory effect of endosulfan via NF- $\kappa$ B activation in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007; 355: 860-865.

Hard G C et al. Non-proliferative lesions of the kidney and lower urinary tract in rats. 1999. *Guides for toxicologic pathology, STP/ARP/AFIP, Washington, DC.*

---

---

International Agency for Research Cancer (IARC). WHO International Life Sciences Institute. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Human. 1991; 5, 612.

Kuper CF et al. Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2000; 28:454-66.

MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997;15: 323-50.

Olgun S, et al. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicol.* 2004; 196:181-195.

Pelletier R, et al. Activation of human neutrophils in vitro and dieldrin-induced neutrophilic inflammation in vivo. *Journal of Leukocyte Biology.* 2001; 70: 367-373.

Pearse G. Histopathology of the Thymus. *Toxicologic Pathology.* 2006; 34: 515-47.

Pick, A & Mizel, A. A rapid microassay of the measurements of superoxid and hydrogen peroxid production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol.* 1981; 46: 2111-2126.

Quinteiro-Filho WM, Righi DA, Palermo-Neto J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 912-917.

Righi DA & Palermo-Neto J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. *Toxicology* 2005; 212: 98–106.

Reffstrup TK. Risk Assessment of Mixtures of Pesticides. *Current Approaches and Future Strategies Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2009; doi: 10.1016/j.yrtph.

Sellers RS et al. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: organ weight recommendations for toxicologic studies. 2007; 751-755.

---

---

Srivastava A & Shivanandappa T. Stereospecificity in the cytotoxic action of hexachlorocyclohexane isomers. *Chem Biol Interact.* 2009; Oct 8.

Stout R D & Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology.* 2004; 76: 509-513.

Travlos G S. Histopathology of Bone Marrow. *Toxicologic Pathology.* 2006; 34:566–598  
Tuzmen N, Candan N, Kaya E, Demiryas N. Biochemical effects of chlorpyrifos and deltamethrin on altered antioxidative defense mechanisms and lipid peroxidation in rat liver. *Cell Biochem Funct.* 2008; 1:119-24.

Vial T et al. Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system. *Toxicology.* 2002; 174: 3-11.

Wooley, A. Determination-General and reproductive toxicology. In: *A Guide to Practical Toxicology Evaluation, Prediction and Risk.* Taylor and Francis, New York. 2003; 80-106.

WHO/FAO. Data sheets on pesticides. Dicofol, n.81. Geneva: WHO/FAO; 1996. p. 1-13. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acessado em 12/abr/2004.

WHO/FAO. Data sheets on pesticides. Endosulfan, n. 92. Geneva: WHO/FAO; 1989. p. 1-15. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acessado 12/abr/2004.

WHO/FAO.INCHEM. Evaluation of some pesticides residues in food. Dieldrin. WHO/Food ADD/71.42. Geneva:WHO/FAO; 1970. p.1-32. Disponível em [www.inchen.org/documents/](http://www.inchen.org/documents/). Acessado em 12/jun/2005.

WHO: Principles in governing consumer safety in relation to pesticides residues. WHO Tech. Rep. Ser. v. 240, 1962.

Zhao M. Induction of Macrophage Apoptosis by an Organochlorine Insecticide Acetofenate. *Chem. Res. Toxicol.* 2009; 22: 504–510.



*Anexo*

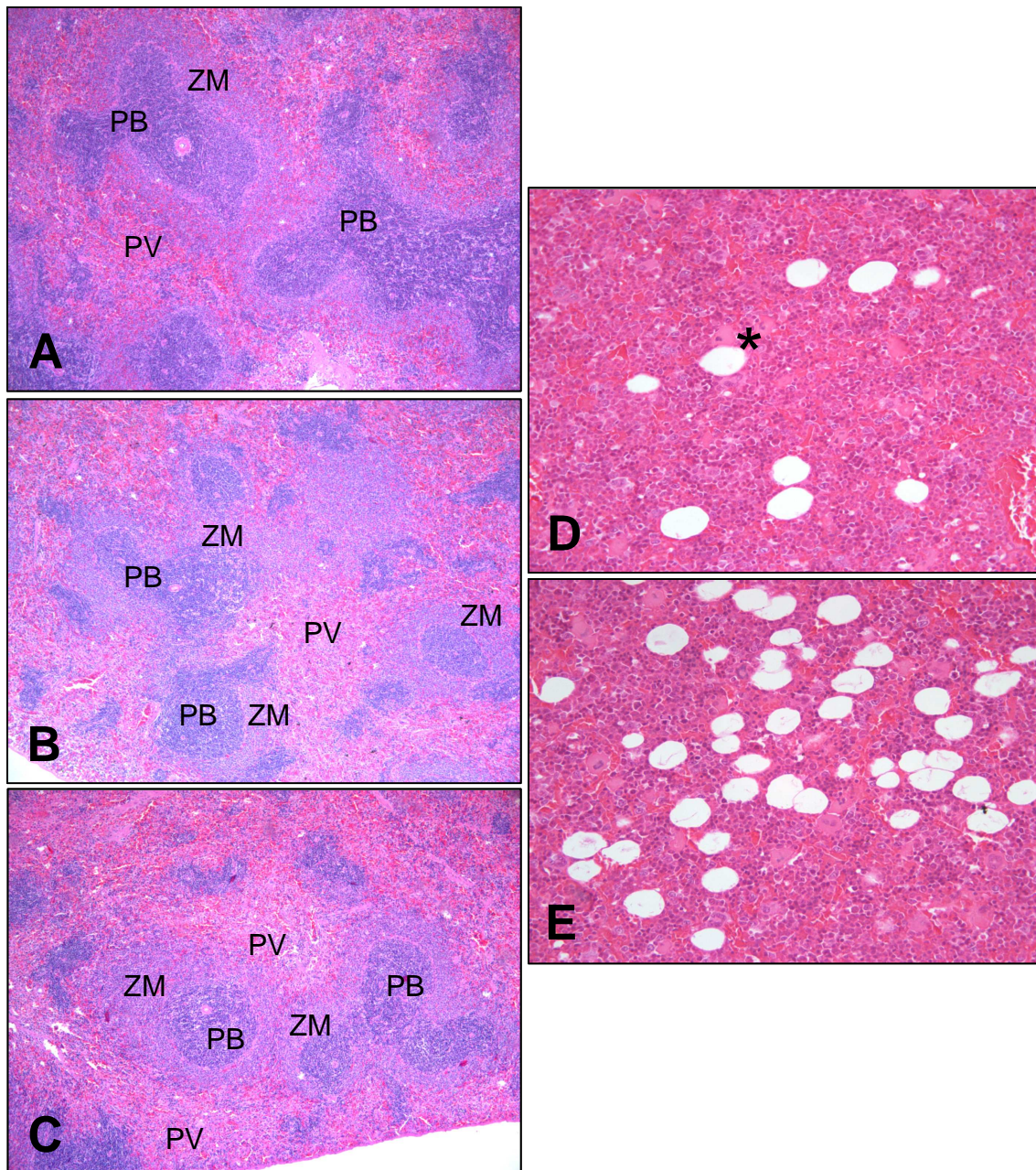


Figura 1- Cortes histológicas de baço (A-C) e medula óssea do fêmur (D-E) corados com HE. A-C) Animais dos grupos controle, NOEL e LOAEL, respectivamente; D-F) Animais dos grupos controle e NOEL, respectivamente. PB= polpa branca, PV= polpa vermelha, ZM= zona marginal, \*Adipócitos uniloculares.

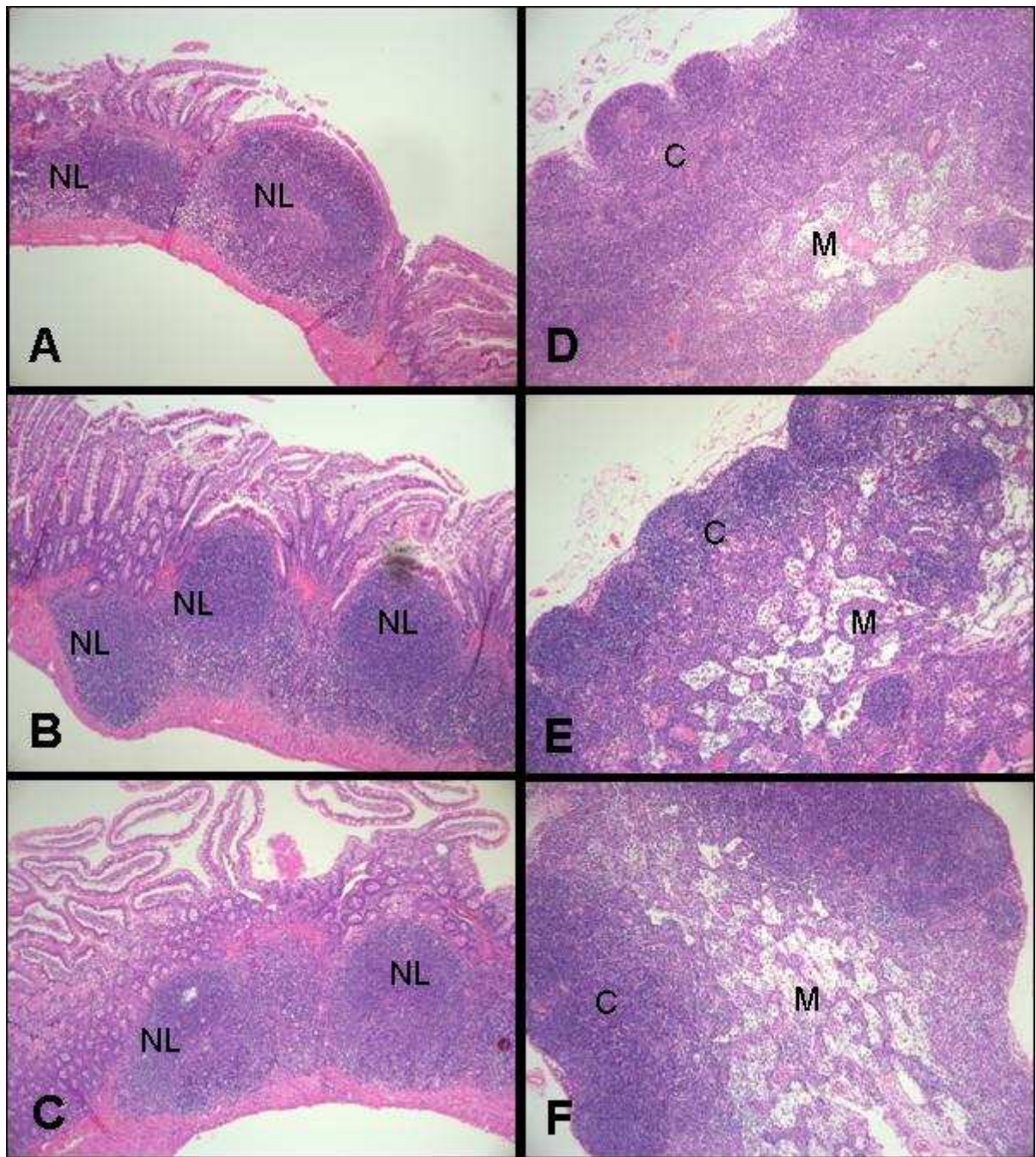


Figura 2- Cortes histológicos de intestino delgado com a placa de Payer (A-C) e de linfonodos mesentéricos (D-F) corados com HE. A-C) Animais dos grupos controle, NOEL e LOAEL, respectivamente, com nódulos linfóides ativos; D-F) Animais dos grupos controle, NOEL e LOAEL, respectivamente, com nódulos linfóides ativos. ND= nódulos linfóides, C= região cortical e M= região medular.

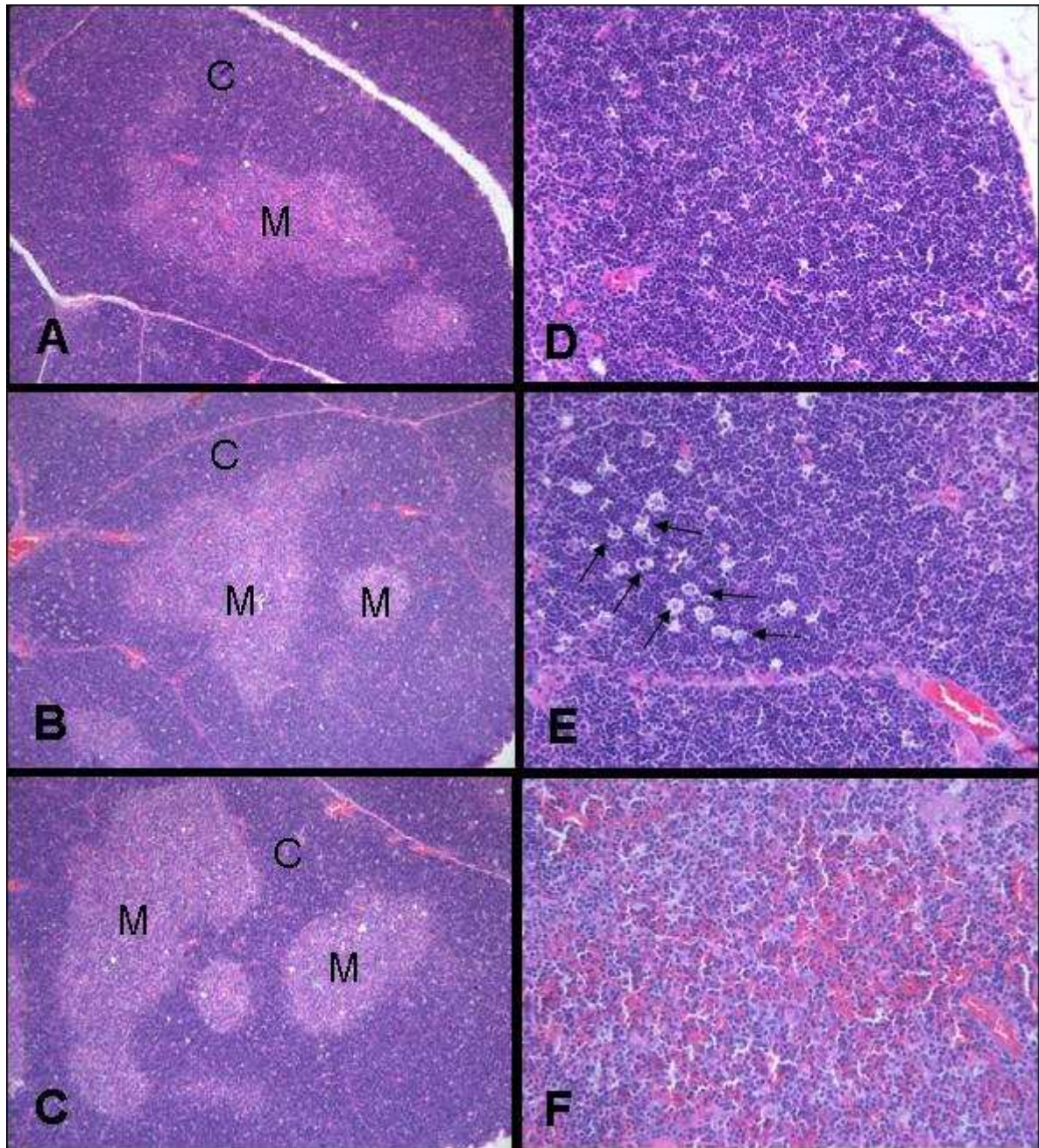


Figura 3- Cortes histológicos de timo corados com HE. A-C) Animais dos grupos controle, NOEL e LOAEL, respectivamente, com relação córtex/medular preservada; D-E) região cortical do lóbulo tímico de animal do grupo controle e NOAEL, respectivamente. Setas indicam macrófagos ativos na apoptose de timócitos; F) Hemorragia na medular do lóbulo tímico de um animal do grupo NOAEL. C= cortical, M=medular.

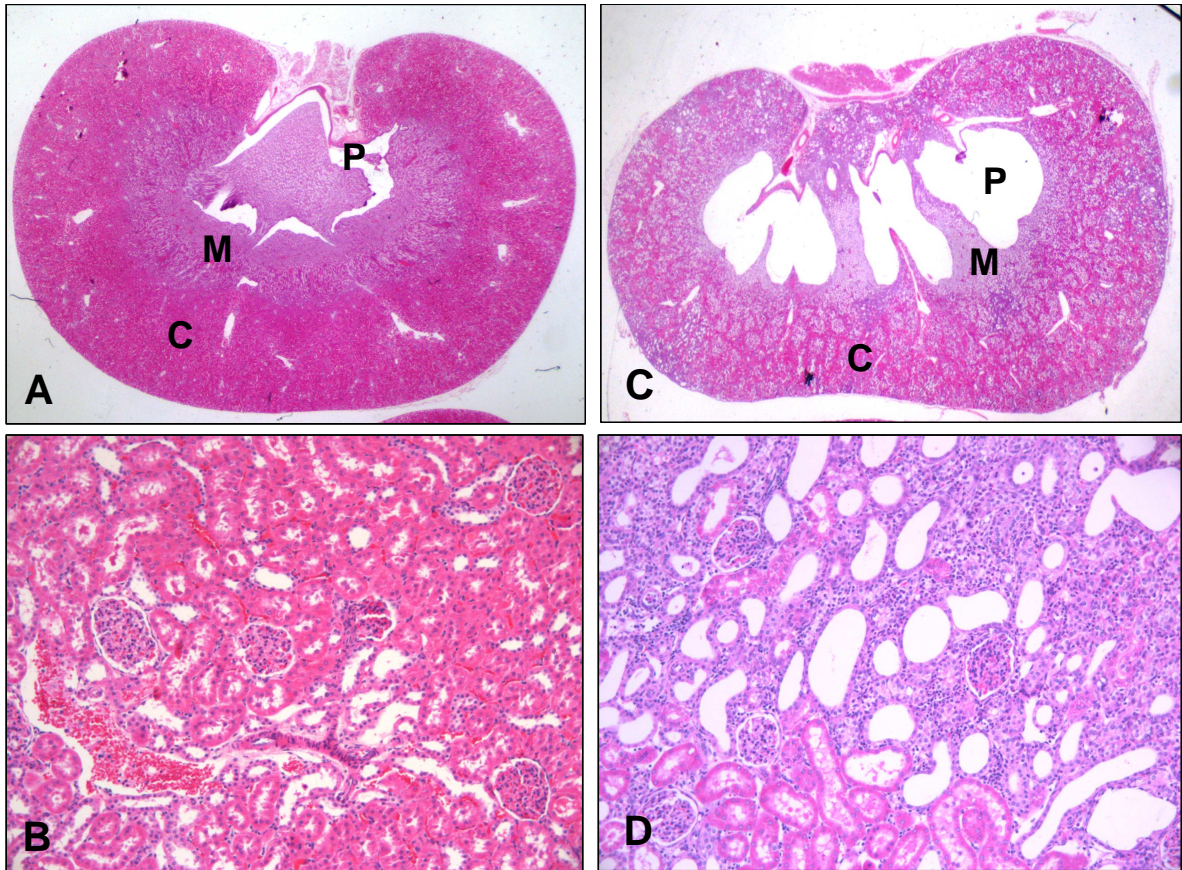


Figura 4- Cortes histológicas de rim corados com HE. A-B) Animal do grupo controle com rim de aspecto normal; B-C) Animal do grupo controle com hidronefrose apresentando dilatação tubular (em especial de túbulos contorcidos distais e coletores) e com reação estromal em decorrência da compressão do parênquima renal. C=cortical, M= medular e P= pelve renal.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)