

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HELENA TARGA DIAS ANASTACIO

**EFEITO DOS PESTICIDAS CARBARIL E GLIFOSATO EM LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS RAW 264.7**

CURITIBA

2016

HELENA TARGA DIAS ANASTACIO

**EFEITO DOS PESTICIDAS CARBARIL E GLIFOSATO EM LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS RAW 264.7**

Trabalho apresentado como requisito à obtenção do grau de Biomédico no curso de graduação de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2016

RESUMO

Pesticidas têm como finalidade controlar, repelir ou matar pragas, que são organismos vivos indesejados como insetos ou plantas, que podem gerar perdas econômicas ou propagar doenças. Todavia, essas substâncias químicas podem apresentar sérios efeitos tóxicos para os seres humanos. O glifosato é o herbicida mais utilizado no mundo, enquanto o inseticida carbaril já foi proibido na Europa, mas continua sendo extensamente utilizado em outros países. Existe uma relação entre a exposição aos pesticidas e alterações do sistema imunológico, mas a ação sobre a função dos macrófagos não foi completamente esclarecida. Os macrófagos são importantes células fagocíticas do sistema imunológico, responsáveis pela detecção e eliminação de agentes estranhos. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo analisar os efeitos dos pesticidas carbaril e glifosato sobre características vitais ao funcionamento do sistema imunológico utilizando a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram plaqueadas e cultivadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos. Após 24 h o meio foi substituído por novo meio contendo 2% de SFB e os pesticidas carbaril (0,015; 0,15 e 1,50 μM) e glifosato (0,25; 2,5 e 25 μM). Os veículos empregados para o preparo dos pesticidas (0,05% DMSO e 0,05% de água) foram utilizados como controle. Após 24 h de exposição, os ensaios azul de tripan e atividade fagocítica foram realizados, não sendo encontradas alterações em ambos os parâmetros. Esses resultados sugerem que as concentrações estipuladas pela ANVISA, nas quais as concentrações desse estudo foram baseadas, não apresentam efeitos prejudiciais ao funcionamento de macrófagos.

Palavras-chave: Sistema Imunológico. Imunotoxicidade. Atividade Fagocítica. Viabilidade Celular.

LISTA DE SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--------------------------------------|
| AMPA | - Ácido Aminometilfosfônico |
| ANVISA | - Agência de Vigilância Sanitária |
| ATP | - Trifosfato de Adenosina |
| CONAMA | - Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| DDT | - Diclorodifeniltricloroetano |
| DMEM | - Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | - Ácido Desoxirribonucleico |
| EPA | - Environmental Protection Agency |
| H ₂ O ₂ | - Peróxido de Hidrogênio |
| IDA | - Ingestão Diária Aceitável |
| IFN- γ | - Interferon- γ |
| IL-1 | - Interleucina-1 |
| IL-2 | - Interleucina-2 |
| IL-10 | - Interleucina-10 |
| IL-12 | - Interleucina-12 |
| LNH | - Linfoma Não-Hodgkin |
| LPS | - Lipopolissacarídeos |
| MHC | - Major Histocompatibility Complex |
| NBT | - Nitroblue Tetrazolium |
| NK | - Natural Killer |
| NO | - Óxido Nítrico |
| NO ₂ | - Dióxido de Nitrogênio |
| O ₂ ^{·-} | - Superóxido |
| ·OH | - Hidroxila |
| ONOO ⁻ | - Peroxinitrito |
| PBS | - Phosphate Buffered Saline |
| PDGF | - Platelet-Derived Growth Factor |
| POE-15 | - Polioxietilenamida |
| SFB | - Soro Fetal Bovino |
| SLS | - Lauril Sulfato de Sódio |
| TGF β | - Tumor Growth Factor β |
| TNF | - Fator de Necrose Tumoral |

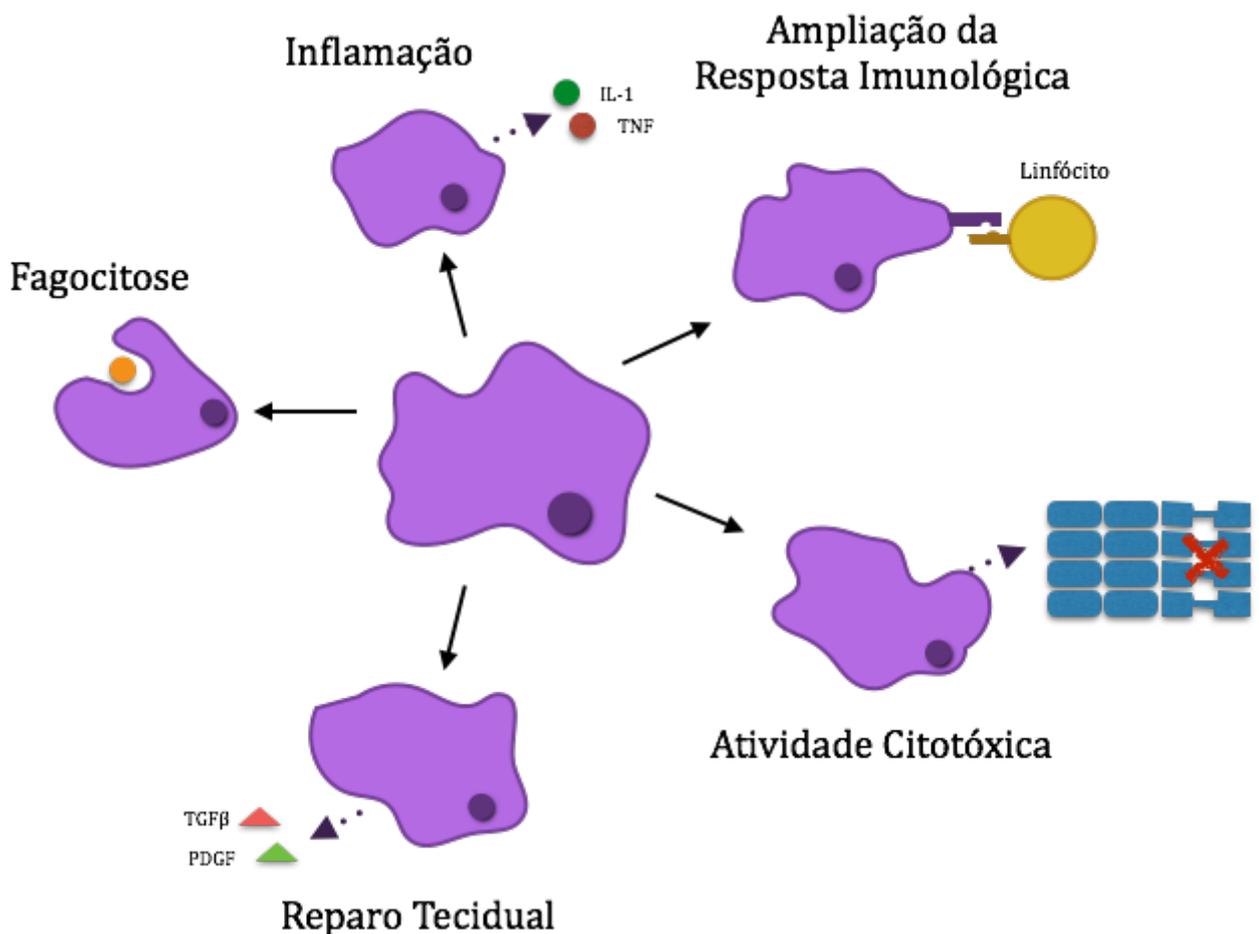
SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 OBJETIVOS | 7 |
| 2.1 Objetivo geral | 7 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 7 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 8 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 4.1 MACRÓFAGOS..... | 9 |
| 4.2 CARBARIL..... | 11 |
| 4.3 GLIFOSATO | 14 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 5.1 DESENHO EXPERIMENTAL | 17 |
| 5.2 AZUL DE TRIPAN | 18 |
| 5.3 ATIVIDADE FAGOCÍTICA..... | 19 |
| 5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 21 |
| 6 RESULTADOS | 22 |
| 7 DISCUSSÃO | 24 |
| 8 CONCLUSÃO | 28 |
| REFERÊNCIAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico tem como função detectar e eliminar moléculas estranhas do corpo humano, sendo capaz de diferenciar moléculas e células estranhas das normalmente presentes no organismo. Esse sistema é dividido em respostas inatas e adquiridas (ALBERTS et al., 2010). O macrófago é uma célula fagocítica do sistema imunológico inato que atua na destruição de agentes estranhos utilizando mecanismos como a produção de moléculas reativas, entre elas o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Outras funções incluem a atividade citotóxica contra células tumorais, inflamação, remodelação tecidual e ampliação da resposta imunológica adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) (FIGURA 1).

FIGURA 1 - FUNÇÕES EXERCIDAS POR MACRÓFAGOS



FONTE: O autor (2016).

Tanto a imunossupressão quanto a imunoestimulação podem gerar graves consequências para a saúde humana. Um sistema imunológico incapaz de

responder adequadamente a um patógeno acarreta numa maior probabilidade de desenvolvimento de doenças infecciosas. Agentes imunoestimulantes são geralmente utilizados no tratamento contra o câncer, visto que um sistema imunológico deficiente pode resultar no aumento da incidência de tumores. A imunossupressão está mais comumente associada às leucemias e linfomas, principalmente ao linfoma não-Hodgkin (LNH). Uma resposta exacerbada desse sistema pode gerar reações alérgicas, como rinite, asma ou até mesmo choque. A inabilidade de diferenciar moléculas próprias de estranhas ocasiona a autoimunidade, quando o sistema imunológico ataca componentes do próprio organismo (REPETTO; BALIGA, 1996; MISHRA; SOPORI, 2012).

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm sido realizados para estudar os efeitos de diversos pesticidas na saúde humana. Um grande problema ocorre pelo fato de que os testes de segurança exigidos para permitir o registro de pesticidas não são realizados pelas agências regulamentadoras, havendo então um conflito de interesses durante a investigação científica (EPA, 2015).

O carbaril é classificado como um possível carcinógeno por induzir tumores em ratos e tem sido associado ao melanoma e ao LNH (HAMADA, 1993a, não publicado). Esse pesticida está atualmente proibido em países da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2007). O glifosato é o pesticida mais utilizado no mundo e apresenta efeitos teratogênicos, tumorigênicos e hepatotóxicos (MESNAGE et al., 2015).

O presente estudo analisou o efeito dos pesticidas carbaril e glifosato sobre a viabilidade e a atividade fagocítica de macrófagos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Investigar o efeito dos pesticidas carbaril e glifosato sobre características importantes para a função dos macrófagos utilizando a linhagem celular RAW 264.7.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito dos pesticidas sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7;
- Determinar o efeito dos pesticidas sobre a atividade fagocítica de macrófagos da linhagem RAW 264.7.

3. JUSTIFICATIVA

Pesticidas são substâncias utilizadas principalmente na agricultura para eliminar pragas, podendo agir como inseticidas, herbicidas, fungicidas, entre outros (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS), 2015).

A exposição aos pesticidas pode ocorrer pela ingestão de alimentos cultivados na presença desses compostos, como frutas e verduras, ou de animais expostos como peixes; pelo contato com a pele, no caso de pesticidas de uso residencial; através da contaminação do solo, das águas para consumo ou recreação humana ou até mesmo do ar, no caso de pesticidas voláteis. Dessa forma, os humanos encontram-se altamente expostos, através de diferentes vias, a essas substâncias que podem apresentar sérios efeitos adversos.

Diversos pesticidas extensamente utilizados já foram proibidos em razão da sua alta toxicidade. Dentre eles o diclorodifeniltricloroetano (DDT), um dos mais conhecidos, foi proibido nos EUA em 1972 por atuar como um desregulador endócrino e provável carcinógeno. Antes de seu banimento, esteve disponível para uso por aproximadamente 30 anos, sendo ainda possível detectá-lo em amostras de sangue humano (JAGA; DHARMANI, 2003). Esses dados demonstram a importância da realização de estudos que avaliem a toxicidade dos pesticidas atualmente utilizados.

Dentre os diversos efeitos que um pesticida pode apresentar está a imunotoxicidade. O sistema imunológico protege o organismo contra patógenos e moléculas nocivas. Tendo em vista essa função, sua desregulação pode acarretar no aparecimento de graves doenças como o câncer. Dessa forma, é importante estudar o efeito desses agentes em um dos integrantes celulares desse sistema, os macrófagos, de forma a entender como os pesticidas podem gerar imunotoxicidade.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. MACRÓFAGOS

O sistema imunológico é responsável pela proteção contra agentes nocivos e, para exercer sua função, detém diversos componentes químicos, proteicos e celulares. A resposta imunológica adaptativa consegue distinguir substâncias similares e adquirir memória para uma próxima infecção, ao contrário da resposta inata, que não gera memória e não é específica para um determinado patógeno, ela somente reconhece estruturas comuns a vários microrganismos (ALBERTS et al., 2010).

Dentre as células do sistema imunológico inato ou natural estão as células *Natural Killer* (NK) e os fagócitos, os quais têm a função de identificar, fagocitar e destruir microrganismos. Os fagócitos podem ser células dendríticas, neutrófilos e fagócitos mononucleares. Os últimos têm origem na medula óssea e ao atingir o sangue periférico são chamados monócitos. Assim que os monócitos chegam aos tecidos eles sofrem maturação e passam a ser denominados macrófagos. Macrófagos de cada tecido recebem nomes específicos, como as células de Kupffer e osteoclastos, macrófagos do fígado e dos ossos, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os macrófagos presentes no tecido são chamados residentes e funcionam como vigilantes no caso de aparecimento de microrganismos invasores. Outro grupo de macrófagos, chamados macrófagos recrutados, provém de monócitos circulantes que se tornam macrófagos ao atingirem os tecidos. Eles podem ser recrutados em estado de infecção ou mesmo na ausência desse e servem para reabastecer os tecidos com macrófagos (BOWDISH; GORDON, 2007).

Os macrófagos têm importante papel homeostático, participando da “limpeza” do ambiente tecidual através da fagocitose de agregados proteicos, moléculas desnaturadas e células apoptóticas e da destruição de células tumorais (BOWDISH; GORDON, 2007). O processo de fagocitose realizado pelas células fagocíticas compreende o englobamento de grandes partículas ($>0.5 \mu\text{m}$). Ele é iniciado pela ligação de receptores presentes nos macrófagos a opsoninas, como anticorpos e moléculas do complemento ou a moléculas conservadas nos patógenos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias. O macrófago então emite projeções de

membrana ao redor da partícula reconhecida até englobá-la completamente e formar um fagossomo que se funde com lisossomos, formando um fagolisossomo, onde ocorre a eliminação dos microrganismos (RABINOVITCH, 1995; SWANSON; BAER, 1995; ALLEN; ADEREM, 1996; ADEREM; UNDERHILL, 1999). Após a internalização do patógeno, há a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e uma redução do valor de pH que ativa proteases necessárias para a destruição do patógeno (BOWDISH; GORDON, 2007, 2009). Elevada quantidade de oxigênio é utilizada para a produção de superóxido (O_2^-), catalisada pelo complexo NADPH oxidase, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), catalisada pela superóxido dismutase, num processo conhecido como *burst* respiratório. Entretanto O_2^- e H_2O_2 são apenas produtos intermediários nesse processo, que deve formar potentes agentes microbicidas, como o radical $\cdot OH$ (UNDERHILL; OZINSKY, 2002; BABIOR, 1984). Óxido nítrico (NO) também é produzido pela enzima óxido nítrico sintase. Este radical gasoso, solúvel em lipídeos e água, interage com oxigênio e outras espécies reativas para formar outros radicais como dióxido de nitrogênio (NO_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). O meio ácido resultante também permite a apresentação de antígenos através do MHC de classe II para o reconhecimento por linfócitos T, amplificando a resposta imunológica adaptativa (BOWDISH; GORDON, 2009). Outra resposta dos macrófagos frente à infecção ou dano tecidual é a ativação da resposta inflamatória, secretando mediadores pró-inflamatórios como as citocinas IL-1, IL-10, IL-12 e TNF (MURRAY; WYNN, 2011).

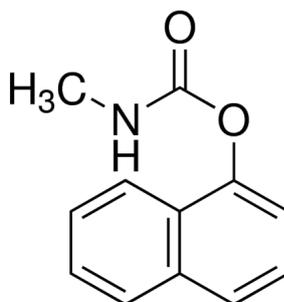
Em contraste com a função pró-inflamatória, alguns macrófagos exercem atividade anti-inflamatória, importante para a regeneração e reparo de dano tecidual. Para isso, os macrófagos produzem fatores de crescimento que estimulam células epiteliais e fibroblastos, como PDGF e TGF β ; e citocinas, como IL-10 (MURRAY; WYNN, 2011).

Além disso, os macrófagos ativados podem apresentar atividade citotóxica contra células tumorais, através da inibição da atividade mitocondrial, da síntese do DNA etc (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987).

4.2. CARBARIL

O carbaril (1-naftil metilcarbamato) é um inseticida pertencente à família dos carbamatos, utilizado para o controle de pestes como mosquitos, formigas, baratas, traças, besouros e carrapatos (NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (NPIC), 2003) (FIGURA 2). É utilizado na agricultura, jardinagem e em animais de estimação para a eliminação de carrapatos. Seu mecanismo de ação consiste na inibição reversível da enzima acetilcolinesterase, sendo capaz de causar morte por parada respiratória em humanos em exposições muito altas (SARGIN; CIRAK; GURCAY, 1992).

FIGURA 2 - FÓRMULA QUÍMICA DO CARBARIL



FONTE: SIGMA-ALDRICH, 2016a

Carpenter et al. (1961) detectaram que aproximadamente 31% da dose de carbaril administrada em ratos é excretada na forma de conjugados de 1-naftol e o resto como carbaril. Em baratas, o carbaril é eliminado como 1-naftol e conjugados de 1-naftol. Os metabólitos do carbaril identificados em coelhos foram N-hidroxi metilcarbaril, 4-hidroxi carbaril, 5-hidroxi carbaril, 5,6-diidro-5,6-diidroxi carbaril, 5,6-diidro-1,5,6-triidroxi naftaleno e 1-naftol. Os mesmos metabólitos foram identificados em fígado de ratos. Em galinhas, os metabólitos gerados foram 1-naftol, 1-naftil glicuronídeo, sulfato de naftil e sulfato de 4-hidroxicarbaril (KNAAK, 1971).

O CONAMA regulamenta os níveis de contaminação da água por pesticidas dependendo da classificação das águas. Águas doce de classe I são aquelas utilizadas para consumo humano após tratamento simplificado; recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas e irrigação de hortaliças e frutas. Águas doce de classe II são usadas para consumo humano após tratamento convencional; recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas;

irrigação de hortaliças, frutas, jardins e outras áreas de lazer e à aquicultura e pesca. As de classe III são destinadas ao consumo humano após tratamento convencional ou avançado. Águas doces podem ter até 0,02 µg/l de carbaril quando classificadas como classe I ou II e até 70 µg/l quando de classe III. Águas salinas e águas salobras podem ter até 0,32 µg/l desse inseticida (CONAMA, 2005).

A ANVISA estabelece o nível de ingestão diária aceitável (IDA) de carbaril em até 0,003 mg/kg de peso corporal (ANVISA, 2015). A agência ambiental americana, EPA (Environmental Protection Agency), não estipula um valor máximo de contaminação da água para o carbaril, porém regulamenta a IDA em até 0,096 mg/kg (EPA, 1984). A EPA classifica o carbaril como possivelmente carcinogênico baseado no estudo realizado por Hamada (1993a, não publicado) que analisou 80 ratos expostos a 100, 1000 e 8000 ppm de carbaril na ração durante 104 semanas. Todas as doses aumentaram a incidência de neoplasias vasculares em ratos machos, enquanto nas fêmeas esse resultado só foi obtido na maior dose. Nesse mesmo grupo de fêmeas também foi observado aumento de neoplasias hepáticas, entre eles adenomas, carcinomas e um hepatoblastoma. Outro estudo conduzido por Hamada (1993b, não publicado) expôs 90 ratos por 104 dias a 250, 1500 e 7500 ppm de carbaril. Na maior dose, as fêmeas apresentaram aumento da incidência de adenomas hepáticos.

Resultados contrários foram obtidos por Carpenter et al. (1961). Durante 2 anos, um total de 40 ratos foram alimentados com ração misturada com *Sevin*, produto comercial do carbaril, nas concentrações de 0,04; 0,02; 0,01 e 0,005%. A incidência de tumores foi analisada após 6, 9 e 12 meses e novamente após 732 e 736 dias. Não houve alteração significativa no número de animais que apresentaram tumores nem do número total de tumores encontrados.

Em 2007, este pesticida foi banido da União Europeia em razão das suas propriedades carcinogênicas e possíveis riscos para aves, mamíferos, artrópodes e organismos aquáticos (UNIÃO EUROPEIA, 2007).

Jorsaraei et al. (2014) estudaram os efeitos do carbaril no sistema imunológico após injeção intraperitoneal de 10 e 30 mg/kg de carbaril em ratos machos por 28 dias consecutivos. A maior concentração reduziu a massa dos órgãos linfoides baço e timo, e gerou redução da proliferação de linfócitos do baço após estimulação com concavalina-A, possivelmente pela inibição da produção de IL-2. Além disso, houve redução dos níveis da citocina IFN-γ, um ativador de

macrófagos.

Li, Kobayashi e Kawada (2015) verificaram que o carbaril induz apoptose de forma concentração e tempo-dependente em linfócitos T. Os autores expuseram a linhagem celular Junktat T às concentrações de 0 a 40 μ M de carbaril durante 4, 8, 16 e 24 h e observaram aumento de apoptose em todos os grupos testados. Linhagem de células de brânquias FG expostas a 0,1 a 150 mg/l por 24 h também apresentaram redução da viabilidade de forma concentração-dependente a partir de 10 mg/l (PANDEY; GUO, 2015).

Codornas (*Colinus virginianus*) são normalmente hospedeiras assintomáticas do protozoário *Histomonas meleagridis*, todavia a exposição desses animais ao *Sevin* foi capaz de torná-los suscetíveis à infecção por histomoníase. Um total de 22 codornas receberam 10 μ g de *Sevin* via oral um dia antes da administração oral de 100 a 5000 ovos infectados. Doses de 1000 ovos ou mais resultou no diagnóstico de histomoníase e mortalidade de 63% (ZEAKES; HANSEN; ROBEL, 1981).

Singh, Singhal e Chauhan (2007) estudaram diversos aspectos da imunotoxicidade induzida pelo carbaril em 16 galinhas com idade de 2 a 3 semanas. Os animais foram expostos a 20 ppm de carbaril na ração por 3 meses. A contagem total de linfócitos foi realizada a cada 10 dias, do dia 0 ao 90. A partir do dia 70 os autores observaram uma redução no número de linfócitos totais no grupo exposto. A capacidade de proliferação de ambos linfócitos B e T após estimulação com concavalina-A e LPS juntamente foi reduzida a partir do dia 50 até o final do terceiro mês. A função dos macrófagos foi testada pela capacidade dessas células de converterem o composto incolor *nitroblue tetrazolium* (NBT) em um composto azul, formazan. Do dia 60 até o final do experimento houve redução do número de células NBT positivas que chegou a quase 40% no dia 90.

Em contraste com esses resultados, Street e Sharma (1975) não encontraram alterações na contagem de leucócitos de ratos expostos a 4, 20, 45 e 150 ppm de carbaril na ração durante 4 semanas. Entretanto, 24 dias após a administração de hemácias de ovelha nos animais, houve uma queda na contagem de γ -globulinas no grupo de 4 ppm.

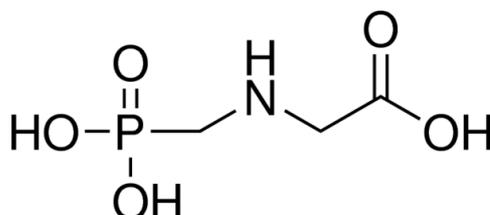
Estudos epidemiológicos mostram uma associação entre LNH e exposição ao carbaril. Mcduffie et al. (2001) analisaram informações de homens canadenses e encontraram aumento da incidência de LNH em homens expostos ao carbaril. O mesmo foi observado em uma pesquisa realizada com a população norte-

americana, na qual foi visto que a exposição aos carbamatos aumentou o risco de desenvolver LNH de 30 a 50% em relação aos não expostos (ZHENG et al., 2001). Além do LNH, Dennis et al. (2010) também acharam uma associação entre a exposição ao carbaril e o melanoma cutâneo. Um risco aumentado de melanoma também foi observado por Mahajan et al. (2007).

4.3. GLIFOSATO

O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um herbicida usado para eliminação de plantas infestantes na produção agrícola e também em margens de ferrovias e rodovias (ANVISA, 2015) (FIGURA 3). Atua inibindo uma enzima necessária para a síntese de aminoácidos essenciais para a planta, levando-as à morte por inanição (JABLONKAI, 2011).

FIGURA 3 - FÓRMULA QUÍMICA DO GLIFOSATO



FONTE: SIGMA-ALDRICH, 2016b

Em 1987 o glifosato era o 17º pesticida mais utilizado na agricultura nos EUA, com 2,72 a 3,62 milhões de kg sendo aplicados nesse setor. Duas décadas mais tarde, em 2007, ele já havia se tornado o pesticida mais consumido nos EUA, atingindo o consumo de 81,6 a 83,9 milhões de kg, totalizando mais que o dobro do segundo pesticida mais usado, a atrazina, com aproximadamente 34 milhões de kg (EPA, 1999, 2011). A EPA não divulgou novos dados de consumo de pesticidas desde 2007.

De acordo com o CONAMA águas doces de classe I ou II podem ter até 65 µg/l de glifosato e as de classe III podem ter até 280 µg/l (CONAMA, 2005). A EPA regulamenta o nível máximo de contaminação da água potável por glifosato em 0,7 mg/l e a IDA em 0,3 mg/kg. (EPA, 1994). Já a ANVISA estabelece o nível de IDA em 0,042 mg/kg (ANVISA, 2015).

Em ratos, cerca de 90% do pesticida é eliminado pela urina e fezes após 7 dias da exposição, sendo a maior parte excretada pelas fezes. O principal metabólito identificado é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), produto do metabolismo de bactérias (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991).

Um estudo recente realizado na Alemanha analisou resíduos de glifosato e AMPA em amostras de urina de 182 voluntários de 18 países europeus. A média encontrada para o glifosato foi de 0,21 µg/l e para AMPA 0,18 µg/l. Esses valores mostram a exposição ao glifosato provavelmente através de alimentos e água contaminados (HOPPE, 2013).

Análise de águas superficiais da microbacia hidrográfica Arroio Passo do Pilão, em Pelotas, RS, revelaram presença do herbicida em aproximadamente 50% das amostras analisadas. Foram realizadas coletas de 15 áreas 30 e 60 dias após a aplicação de glifosato. A maior parte das áreas teve concentrações de 20 a 30 ppb, detectadas na coleta pós 30 dias. Concentrações acima de 100 ppb foram detectadas em áreas mais próximas do cultivo (SILVA; PERALBA; MATTOS, 2003). Bohm et al. (2008) analisaram resíduos de glifosato em grãos de soja e encontraram 19 mg/kg de glifosato após uma aplicação do herbicida e 38 mg/kg após duas aplicações. Ambas concentrações estão acima do limite estabelecido pela ANVISA para a soja, de 10 mg/kg (ANVISA, 2015).

El-Gendy, Aly e El-Sebae (1998) estudaram o efeito do glifosato em componentes celulares e humorais do sistema imunológico. A exposição de peixes da espécie *Tilapia nilotica* à concentração de glifosato 1000 vezes menor que a recomendada para campo durante 96 h reduziu em mais de 50% a proliferação de linfócitos T frente aos mitógenos concavalina-A e fitohemaglutinina separadamente. Linfócitos B estimulados com LPS também sofreram redução de proliferação de 46% 4 semanas após o término da exposição. A concentração de anticorpos formados após imunização com hemácias de ovelha diminuiu no grupo exposto ao carbaril.

Siroski et al. (2016) encontraram uma redução na atividade das proteínas do complemento de jacarés expostos à formulação comercial do carbaril, *Roundup*. Jacarés (*Caiman latirostris*) foram inicialmente expostos a 21 mg/l do produto. A água foi trocada a cada 2 dias com concentrações decrescentes de glifosato para mimetizar a degradação natural do composto em água. Ao final do experimento, após 70 dias, a concentração em água era de 5 mg/l. A atividade das proteínas, medida após incubação do plasma dos animais com hemácias de ovelha, sofreu

uma redução de aproximadamente 20%. Um estudo similar realizado por Latorre et al. (2013) também relatou redução na contagem de leucócitos e no crescimento de *Caiman latirostris* expostos às mesmas concentrações utilizadas por Siroski et al. (2016) durante 2 meses.

Ma e Li (2015) verificaram alterações nos níveis de citocinas de carpas (*Cyprinus carpio*) expostas a 52,08 mg/l e 104,15 mg/l de glifosato por 24, 72 e 168 h. Os níveis da citocina TNF- α foram elevados no fígado, rins e baço de todos os grupos, à exceção dos rins na menor concentração após 168 h, em que ocorreu uma redução. Os níveis da citocina IFN- γ aumentaram nos rins e reduziram no baço e fígado, exceto no grupo de 104,15 mg/l e 168 h, que sofreu um aumento. Já os níveis de IL-1 β cresceram no fígado e diminuíram no baço.

Kwiatkowska et al. (2016) analisaram o efeito de 0,01 a 10 mM de glifosato em células sanguíneas periféricas de humanos após exposição por 4 e 24 h. A concentração de 10 mM a 24 h diminuiu a viabilidade das células. Também na exposição mais longa, glifosato a partir de 5 mM levou à redução nos níveis de ATP, fator geralmente associado à necrose.

A exposição ao glifosato tem sido associada a um maior risco de desenvolvimento de LNH. Um dos primeiros estudos epidemiológicos a encontrar essa associação foi baseado em apenas quatro casos (HARDELL; ERIKSSON, 1999). Entretanto um estudo realizado no Canadá que analisou 51 casos de LNH observou que a exposição ao glifosato por mais do que 2 dias ao ano está relacionada a um maior risco de desenvolver este tipo de câncer (MCDUFFIE et al., 2001). De Roos et al. (2003) também encontraram maior incidência de LNH em homens expostos ao glifosato nos EUA. Apesar desses dados, um estudo prospectivo mais recente não encontrou associação entre glifosato e LNH, porém observou um risco de mieloma múltiplo quase três vezes maior em indivíduos expostos ao glifosato em relação aos não expostos (DE ROOS et al., 2005).

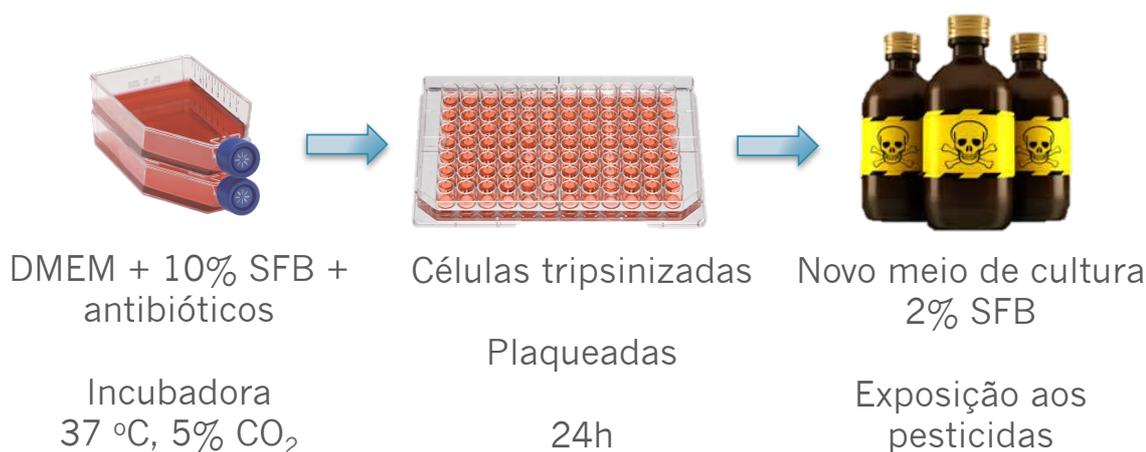
5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Células RAW 264.7 foram cultivadas em meio DMEM, pH 7.4, contendo 10% de SFB, 10 U/ml penicilina e 1 µg/ml de estreptomicina, e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias.

Células confluentes foram tripsinizadas (0,25% tripsina, 0,02% de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético)), plaqueadas em placas de 24 ou 96 poços e cultivadas por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por novo meio contendo 2% de SFB, os antibióticos e os pesticidas, totalizando 6 grupos expostos: 0,015; 0,15 e 1,50 µM de carbaril; 0,25; 2,5 e 25 µM de glifosato (FIGURA 4). As concentrações foram baseadas na IDA estabelecida pela ANVISA para esses pesticidas (ANVISA, 2015). As células foram expostas por 24 h aos pesticidas. Água e DMSO a 0.05% foram utilizados em dois grupos controle, visto que o glifosato foi preparado em água e o carbaril; em DMSO.

FIGURA 4 - DESENHO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2016).

5.2. AZUL DE TRIPAN

O ensaio de azul de tripan indica a viabilidade das células de acordo com a permeabilidade da membrana plasmática. O corante azul de tripan se liga a proteínas intracelulares ao atravessar a membrana de células não viáveis, corando-as de azul. As células viáveis não permitem a incorporação do corante, visto que mantêm a integridade da membrana plasmática (PHILLIPS, 1973).

Para este ensaio foram plaqueadas 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços (FIGURA 5). Após a exposição, o meio de cultura foi retirado e 30 μ l da solução de azul de tripan (0,04%, Sigma®) foram adicionados em cada poço. Os poços foram lavados com PBS em temperatura ambiente e imagens de cada poço foram capturadas pelo microscópio invertido, totalizando 18 imagens por grupo em cada replicata e 54 nos três experimentos realizados (GLINSKI et al., 2016) (FIGURA 6).

O índice de viabilidade foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IV = V \cdot 100 / (V + NV)$$

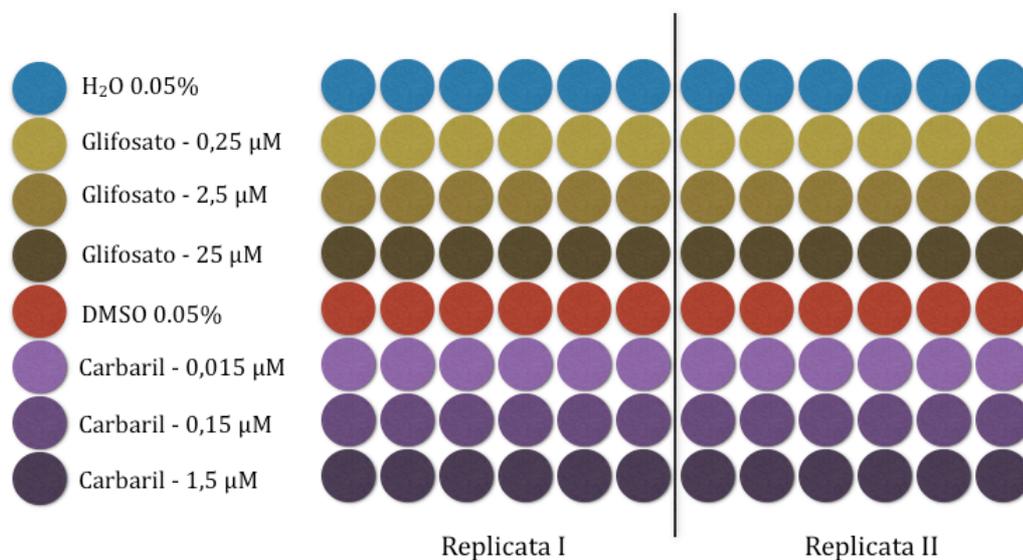
Sendo que:

IV = Índice de Viabilidade

V = nº de células viáveis/não coradas

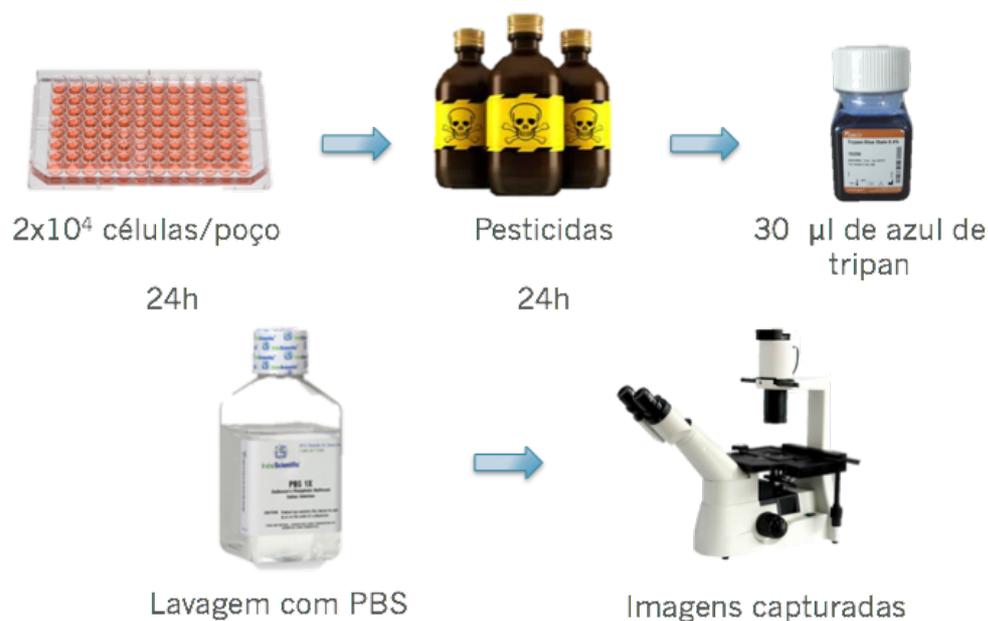
NV = nº de células não viáveis/coradas em azul

FIGURA 5 - AZUL DE TRIPAN - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 6 - METODOLOGIA DO ENSAIO DE AZUL DE TRIPAN



FONTE: O autor (2016).

5.3. ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Para o ensaio de atividade fagocítica foram plaqueadas 5×10^4 células/poço em lamínulas em placas de 24 poços (FIGURA 7). Dado o tempo de exposição, leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram adicionadas à placa em meio de cultura sem soro, numa proporção de 1:10 de células para leveduras. Após 2 h os poços foram lavados duas vezes com PBS em temperatura ambiente para remoção das leveduras não fagocitadas. Depois, foram fixadas em etanol 95%, coradas com Giemsa (Merck®) e analisadas sob microscópio de campo claro (FIGURA 8). O índice fagocítico foi calculado de acordo com a seguinte fórmula (BUCHI; DE SOUZA, 1992):

$$IF = (Mi/Ma) \cdot (Ma/Mt)$$

Sendo que:

IF = Índice Fagocítico

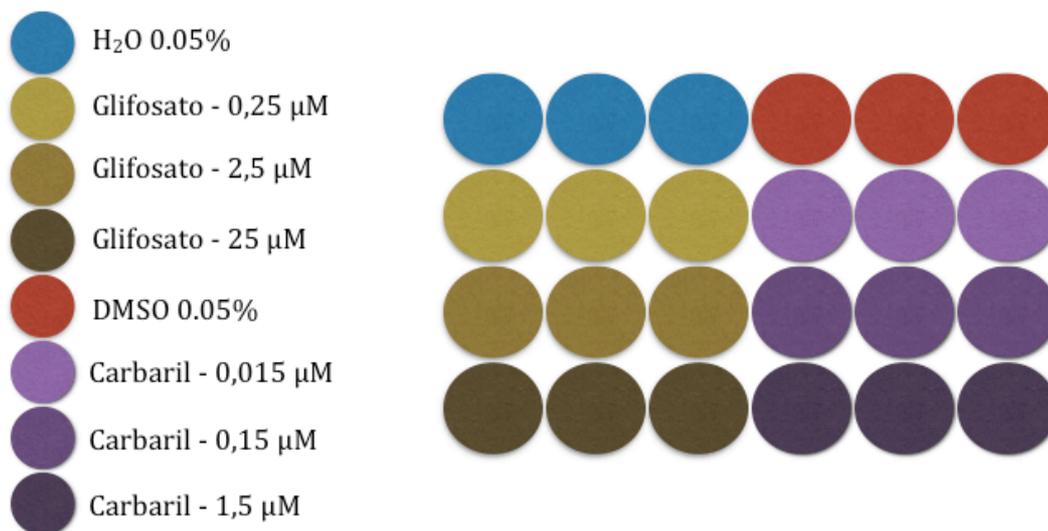
Mi = nº de microrganismos internalizados

Ma = nº de macrófagos com microrganismos

Mt = nº total de macrófagos

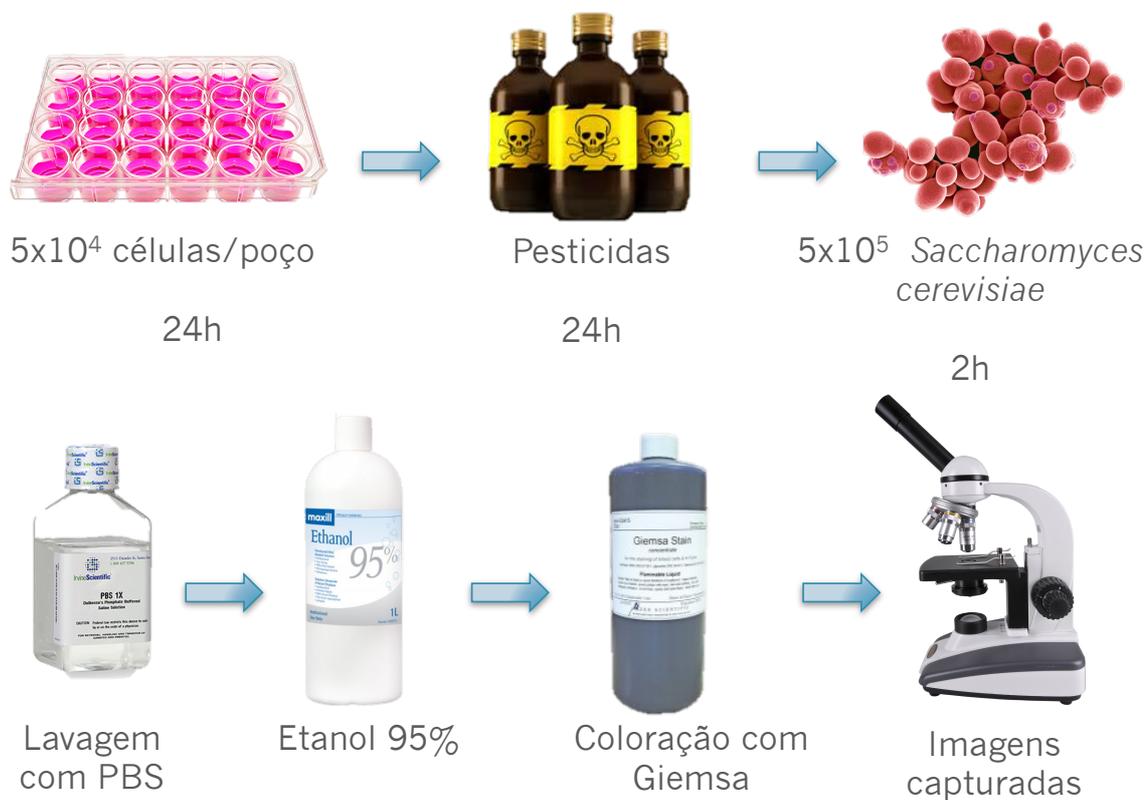
Além do índice fagocítico, somente o número de leveduras fagocitadas por macrófagos (Mi/Ma) em cada grupo também foi analisado.

FIGURA 7 - ATIVIDADE FAGOCÍTICA - DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS



FONTE: O autor (2016).

FIGURA 8 - METODOLOGIA DO ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA



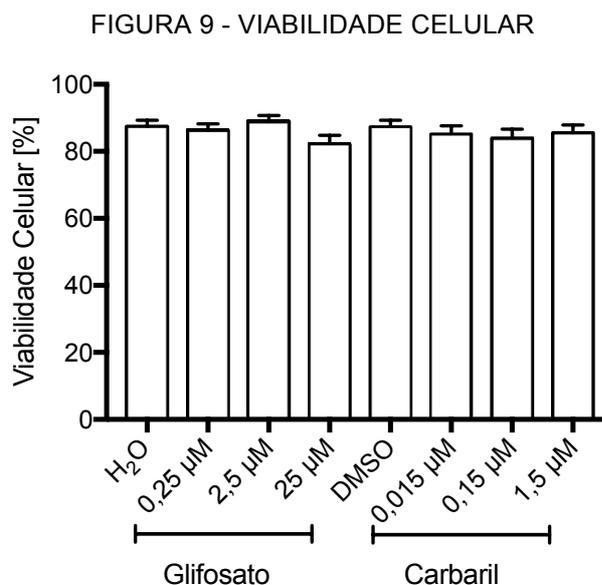
FONTE: O autor (2016).

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um total de três replicas utilizando três culturas celulares distintas foi realizado para cada ensaio. Os dados do ensaio da atividade fagocítica passaram pelo teste de normalidade e foram analisados por ANOVA de uma via, enquanto o ensaio de azul de tripan não passou pelo teste de normalidade e foi analisado pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis. O valor de $p < 0,05$ foi adotado como significativo. O programa GraphPad Prism foi utilizado para análise dos dados e composição dos gráficos.

6. RESULTADOS

Não houve diferença entre o controle H₂O e as concentrações de glifosato, e entre o controle DMSO e os grupos expostos ao carbaril para o teste de viabilidade celular com azul de tripan (FIGURA 9).



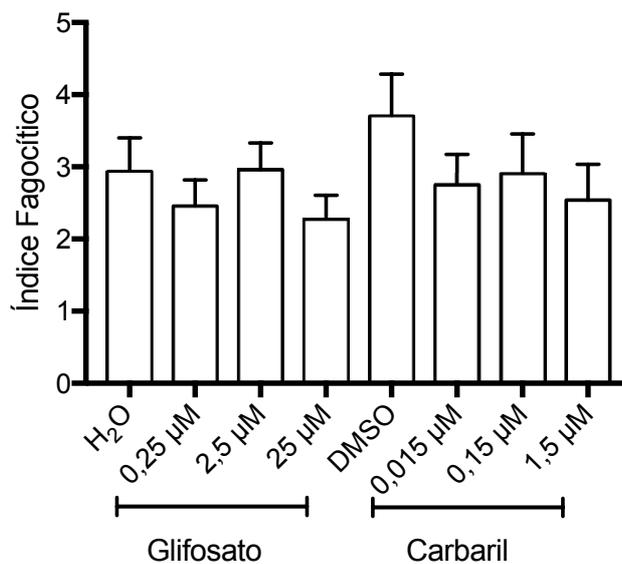
FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: Viabilidade celular realizada em linhagem de macrófagos não expostos (H₂O e DMSO a 0,05%) e expostos às concentrações de 0,015; 0,15 e 1,50 µM de carbaril e 0,25; 2,5 e 25 µM de glifosato.

O teste de atividade fagocítica não identificou alterações no índice fagocítico das células expostas aos pesticidas comparadas aos seus respectivos controles (FIGURAS 10; 11; 12).

O número de leveduras fagocitadas por macrófagos também não apresentou variação significativa.

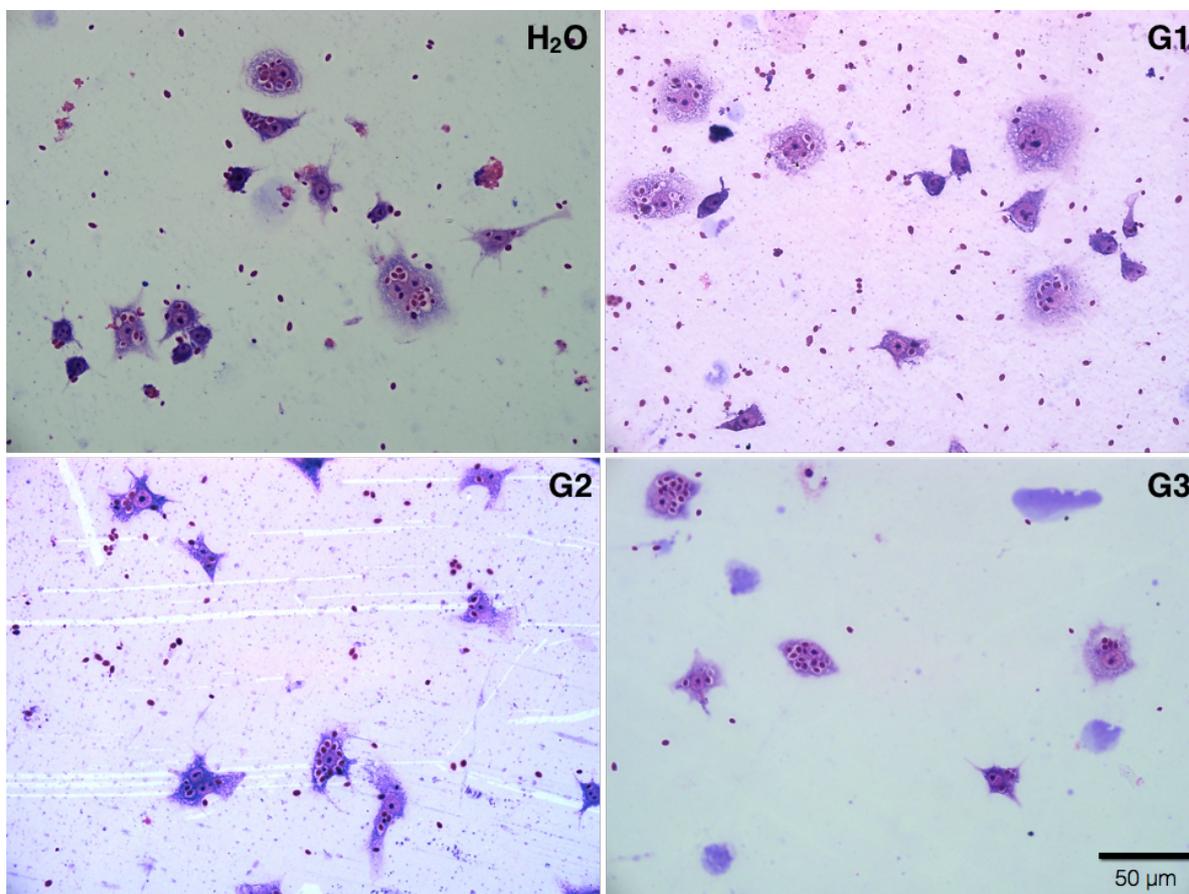
FIGURA 10 - ATIVIDADE FAGOCÍTICA



FONTE: O autor (2016).

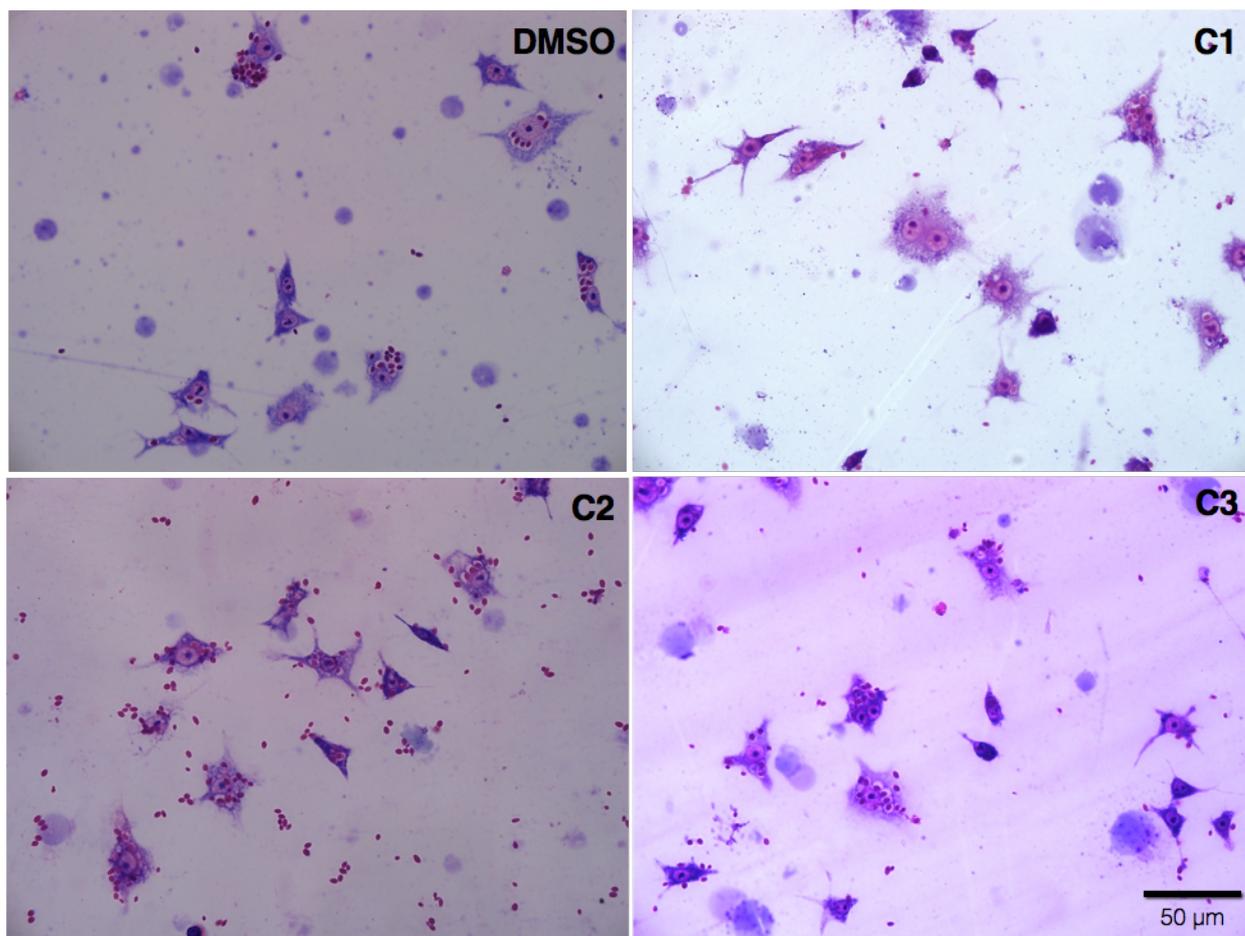
LEGENDA: Índice fagocítico medido em linhagem de macrófagos não expostos (H₂O e DMSO a 0,05%) e expostos às concentrações de 0,015; 0,15 e 1,50 µM de carbaril e 0,25; 2,5 e 25 µM de glifosato.

FIGURA 11 - ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA I



LEGENDA: Ensaio de atividade fagocítica. Grupo controle H₂O (0,05%) e grupos expostos ao glifosato G1 (0,25 µM); G2 (2,5 µM) e G3 (25 µM).

FIGURA 12 - ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA II



LEGENDA: Ensaio de atividade fagocítica. Grupo controle DMSO (0,05%) e grupos expostos ao carbaril C1 (0,015 µM); C2 (0,15 µM) e C3 (1,50 µM).

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo estudar os possíveis efeitos tóxicos promovidos pelos pesticidas carbaril e glifosato em macrófagos que poderiam levar a alterações do sistema imunológico. Para isso, foi utilizada a linhagem de macrófagos RAW 264.7, visto que os macrófagos são as primeiras células de defesa a responderem contra componentes estranhos (BABIOR, 2000).

O ensaio de viabilidade celular azul de tripan foi utilizado com o propósito de identificar alterações na viabilidade celular pela perda da integridade de membrana. Apesar de poder diferenciar células vivas das mortas, células viáveis podem sofrer alterações não detectáveis pelo teste de forma a alterar seu funcionamento adequado. Para verificar o efeito dos pesticidas na função de fagocitose exercida pelos macrófagos foi realizado o ensaio de atividade fagocítica. Em ambos testes, não houve variação significativa, indicando que o carbaril e o glifosato nas concentrações testadas não parecem exercer efeitos deletérios em linhagem de macrófagos. Esses resultados estão de acordo com o pressuposto estabelecido pela ANVISA de que a IDA é a quantidade máxima que pode ser ingerida durante a vida sem apresentar risco à saúde. Entretanto é importante ressaltar que apesar dessas concentrações aparentarem seguras, concentrações acima das aceitas pela ANVISA foram encontradas em água e alimentos, aumentando e dificultando a precisão da real exposição da população a esses compostos (SILVA; PERALBA; MATTOS, 2003; BOHM et al., 2008).

Pesticidas são uma formulação composta de adjuvantes e do princípio ativo. Os adjuvantes são geralmente mantidos sob confidencialidade e descritos como inertes pelas empresas. Têm a função de aumentar a eficiência do pesticida, atuando como tampão, emulsificante, protegendo da degradação, aumentando a solubilidade etc. O princípio ativo é o produto que exerce o efeito desejado no organismo alvo e é o único componente testado durante grande parte da avaliação toxicológica para a regulamentação do produto. É a partir dele que são calculados os níveis de ingestão diária aceitável e de concentração máxima aceitável em alimentos e na água (COX; SURGAN, 2006).

O glifosato é um exemplo de princípio ativo, porém algumas pesquisas mostram que isoladamente ele é menos tóxico que suas formulações comerciais. Mesnage et al. (2014) encontraram que a formulação *Roundup* foi mais de 10 vezes

mais tóxica que o princípio ativo sozinho. Os autores compararam a viabilidade celular de três linhagens celulares, HepG2, HEK293, e JEG3 após 24 h de exposição ao glifosato e à formulação *Roundup GT+* de 1 a 1000 ppm através do ensaio do MTT. Enquanto cerca de 1000 ppm foram necessários para reduzir a viabilidade das células expostas ao glifosato, somente 63 ppm de *Roundup* foi necessário para produzir o mesmo efeito. Utilizando essas mesmas linhagens celulares, Mesnage, Bernay e Séraline (2012), compararam 9 diferentes formulações de glifosato, dois adjuvantes e o glifosato. Os adjuvantes se mostraram os mais tóxicos, seguidos das formulações e do glifosato. O adjuvante POE-15 (polioxietilenamida) foi capaz de reduzir a viabilidade a partir de 3 ppm. Já o glifosato gerou o mesmo efeito com uma concentração 10000 vezes maior. Peixoto (2005) observou que concentrações a partir de 0,5 mM de *Roundup* causaram alteração da função mitocondrial, enquanto o glifosato foi incapaz de gerar o mesmo resultado.

Além de serem capazes de ampliar a toxicidade do produto final, os adjuvantes podem também modular a absorção do pesticida pela pele. Baynes e Riviere (1998) verificaram que o surfactante lauril sulfato de sódio (SLS) aumenta a absorção do carbaril quando aplicado em pele de porco. A formulação do pesticida também pode influenciar na sua acumulação no solo. A degradação do glifosato é realizada por bactérias presentes no solo. Diferentes formulações de glifosato aplicadas no solo produziram diferentes contagens de colônias de bactérias, indicando que o tempo de degradação do glifosato varia de acordo com o produto utilizado (SIHTMÄE et al., 2013).

Esses dados demonstram que durante a análise toxicológica exigida para a regulamentação de um pesticida pode haver uma subestimação dos reais efeitos promovidos pelos pesticidas, aumentando assim os riscos à saúde e ao ambiente promovidos pela exposição a tais compostos. Essa possibilidade torna evidente a necessidade de uma avaliação toxicológica da formulação do pesticida como um todo e não somente do princípio ativo.

Outro fator importante a ser considerado é a exposição a misturas de pesticidas, que podem ter efeitos aditivos, independentes ou sinérgicos. Em ambientes aquáticos é possível detectar uma combinação de pesticidas. Gilliom (2007) encontrou 2 ou mais pesticidas em mais de 90% das amostras de bacias hidrográficas nos EUA. A exposição ao carbaril e malathion juntamente aumenta o tempo de meia-vida do carbaril pela inibição de enzimas necessárias para o

metabolismo deste (HODGSON; ROSE, 2007). A mistura de 9 pesticidas resultou em imunossupressão em larvas de anfíbios, um efeito não observado na exposição aos pesticidas isolados. Ao mesmo tempo, a mistura exacerbou a inibição do crescimento vista na exposição de cada pesticida (HAYES et al., 2006).

Dessa forma, a análise de pesticidas isoladamente é indispensável para o entendimento do funcionamento de cada composto, porém é insuficiente para a compreensão do impacto da exposição diária à qual estão submetidos os seres humanos.

8. CONCLUSÃO

As concentrações de 0,015; 0,15 e 1,50 μM de carbaril e 0,25; 2,5 e 25 μM de glifosato não produziram modificação na viabilidade celular e atividade fagocítica de macrófagos. Isso indica que esses pesticidas não são nocivos às células da linhagem RAW 264.7 nas condições estabelecidas pela ANVISA. Apesar disso, é necessário que haja uma maior fiscalização do cumprimento dessas normas para evitar o uso indiscriminado desses pesticidas, que podem contaminar alimentos e água utilizada para consumo humano, acarretando na exposição da população a concentrações acima das aceitáveis.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 593-623, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Monografias autorizadas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>>. Acesso em: 12 nov. 2015.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Cancer. In: _____. **Biologia Molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 1539-1600.

ALLEN, L. A.; ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Curr Opin Immunol**, v. 8, n. 1, p. 36-40, Feb. 1996.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am J Med**, v. 109, n. 1, p. 33-44, Jul. 2000.

BAYNES, R. E.; RIVIERE, J. E. Influence of inert ingredients in pesticide formulations on dermal absorption of carbaryl. **Am J Vet Res**, v. 59, n. 2, p. 168-75, Feb. 1998.

BOHM, G. M. B. et al. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 28, p. 192-197, 2008.

BOWDISH, D. M. E.; GORDON, S. Introduction to macrophage biology. In: Denkers, E. Y.; Gazzinelli, R. **Protozoans in Macrophages**. Texas: Landes Biosciences. 2007. p. 1-15.

BOWDISH, D. M. E.; GORDON, S. Macrophage Function Disorders. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-12, mar. 2009.

BREWSTER, D. W.; WARREN, J.; HOPKINS, W. E. Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. **Fundam Appl Toxicol**, v. 17, n. 1, p. 43-51, Jul. 1991.

BUCHI, D.F., DE SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Journal of Submicroscopic**

Cytology and Pathology, v. 24, p. 135–141, 1992.

CARPENTER, C. P. et al. Insecticide Toxicology, Mammalian Toxicity of 1-Naphthyl-N-methylcarbamate (Sevin Insecticide). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 1961.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº 053, de 18 mar. 2005, p. 58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2015.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 12, p. 1803-6, Dec. 2006.

DE ROOS, A. J. et al. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 9, p. e11-e11, 2003.

DE ROOS, A. J. et al. Cancer Incidence among Glyphosate-Exposed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 1, p. 49-54, 2005.

DENNIS, L. K. et al. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 6, p. 812-7, Jun. 2010.

EL-GENDY, K. S.; ALY, N. M.; EL-SEBAE, A. H. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of boliti fish (*Tilapia nilotica*). **J Environ Sci Health B**, v. 33, n. 2, p. 135-49, Mar. 1998.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Health and Environmental Effects Profile for Carbaryl**. Washington, 1984.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Reregistration Eligibility Decision: Glyphosate**. Washington, 1994.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Pesticide Industry Sales and Usage: 1996 and 1997 Market Estimates**. Washington, 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Pesticide Industry Sales and Usage: 2007 Market Estimates**. Washington, 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **About Pesticide Registration**. Disponível em: <<http://www2.epa.gov/pesticide-registration/about-pesticide-registration#registration>>. Acesso em: 23 out. 2015.

GILLIOM, R. J. **Pesticides in U. S. streams and groundwater**. Environ. Sci. Technol., v. 41, p. 3408-13, 2007.

GLINSKI, A. et al. Toxicological interactions of silver nanoparticles and organochlorine pesticides in mouse peritoneal macrophages. **Toxicol Mech Methods**, v. 26, n. 4, p. 251-9, May 2016.

HAMADA, N. H. **Oncogenicity study with carbaryl technical in CD-1 mice**. Washington, 1993a. Não publicado.

HAMADA, N. H. **Combined chronic toxicity and oncogenicity study with carbaryl technical in Sprague-Dawley rats**. Washington, 1993b. Não publicado.

HARDELL, L.; ERIKSSON, M. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. **Cancer**, v. 85, n. 6, p. 1353-60, Mar. 1999.

HAYES, T. B. et al. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 1, p. 40-50, Apr 2006.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473-6, Jan. 1987.

HODGSON, E.; ROSE, R. L. Human metabolic interactions of environmental chemicals. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 21, n. 4, p. 182-6, 2007.

HOPPE, H. W. **Determination of Glyphosate residues in human urine samples from 18 European countries**. Bremen, 2013. Relatório.

JABLONKAI, I. Molecular Mechanism of Action of Herbicides In: HASANEEN, M. N. A. E. **Herbicides - Mechanisms and Mode of Action**. Rijeka: InTech, 2011. p. 1-24.

JAGA, K.; DHARMANI, C. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. **Int J Occup Med Environ Health**, v. 16, n. 1, p. 7-20, 2003.

JORSARAEI, S. G. A. et al. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n.3, p. 834-844, 2014.

KWIATKOWSKA, M. et al. The Impact of Glyphosate, Its Metabolites and Impurities on Viability, ATP Level and Morphological changes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. 1-13, 2016.

KNAAK, J. B. Biological and Nonbiological Modifications of Carbamates. **Bulletin of the World Health Organisation**. New York, v. 44, p. 121-131, 1971.

LATORRE, M. A. et al. Effects of in vivo exposure to Roundup (R) on immune system of Caiman latirostris. **J Immunotoxicol**, v. 10, n. 4, p. 349-54, Oct-Dec. 2013.

LI, Q.; KOBAYASHI, M.; KAWADA, T. Carbamate pesticide-induced apoptosis in human T lymphocytes. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 4, p. 3633-45, Apr. 2015.

MA, J.; LI, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, p. 293-298, 2015.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MAHAJAN, R. et al. Carbaryl exposure and incident cancer in the Agricultural Health Study. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1799-805, Oct. 2007.

MCDUFFIE, H. H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 11, p. 1155-63, Nov. 2001.

MESNAGE, R.; BERNAY, B.; SERALINI, G. E. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. **Toxicology**, v. 313, n. 2-3, p. 122-8, 2012.

MESNAGE, R. et al. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 179691, 2014.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food Chem Toxicol**, v. 84, p. 133-53, Oct 2015.

MISHRA, N. C.; SOPORI, M. L. **Immunotoxicity**. In: Gupta, R. C. 2nd Ed. Veterinary Toxicology. Boston: Academic Press, 2012. p. 364-380.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 723-37, Nov. 2011.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS). **Pesticides**. Disponível em: <<http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/index.cfm>> Acesso em: 23 out. 2015.

NATIONAL PESTICIDE INFORMATION CENTER (NPIC). **Carbaryl (General Fact Sheet)**. 2003. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/carbgen.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2015.

PANDEY, M. R.; GUO, H. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of insecticide carbaryl to flounder gill cells and its teratogenicity to zebrafish embryos. **J. Ocean Univ. China**, v. 14, n. 2, p 362-74, 2015.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, v. 61, n. 8, p. 1115-22, Dec 2005.

PHILLIPS, H. J.; **Dye exclusions tests for cell viability**: Methods and applications. Tissue Culture. In: KRUSE, J. R.; PATTERSON, J. R. M. K. A. P.: New York, Academic Press, 1973. p. 406-408.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 85-87, Mar. 1995.

REPETTO, R.; BALIGA, S. S. Pesticides and the immune system: the public health risks. Executive summary. **Cent Eur J Public Health**, v. 4, n. 4, p. 263-5, Dec .1996.

SARGIN, H.; CIRAK; S.; GURCAY, S. A case of porphyria due to carbaryl intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, v. 11, p. 373, 1992.

SIGMA-ALDRICH. **Guia de comparação do produto**: Carbaril. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/carbaryl201226325211?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 6 jul. 2016a.

SIGMA-ALDRICH. **Guia de comparação do produto**: Glifosato. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/glyphosate16907107183611?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 6 jul. 2016b.

SIHTMÄE, M. et al. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 215-224, 2013.

SILVA, M. D. da; PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação De Glifosato E Ácido Aminometilfosfônico Em Águas Superficiais Do Arroio Passo Do Pilão. Pesticidas: **R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 19-28, 2003.

SINGH, B. P.; SINGHAL, L.; CHAUHAN, R. S. Immunotoxicity of carbaryl in chicken. **Indian J Exp Biol**, v. 45, n. 10, p. 890-5, Oct. 2007.

SIROSKI, P. A. et al. Immunotoxicity of commercial-mixed glyphosate in broad snouted caiman (Caiman latirostris). **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 64-70, 2016.

STREET, J. C.; SHARMA, R. P. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, aroclor 1254, carbaryl, carbofuran, and methylparathion. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 32, n. 3, p. 587-602, Jun. 1975.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends Cell Biol**, v. 5, n. 3, p. 89-93, Mar. 1995.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.** v. 20, p. 825-52, 2002.

UNIÃO EUROPEIA. Commission of the European Communities. Commission decision of 21 May 2007 concerning the non-inclusion of carbaryl in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing that substance. **Official Journal of the European Union**,

Bruxelas, 21 maio de 2007.

ZEAKES, S. J.; HANSEN, H. F.; ROBEL, R. J. Increased susceptibility of bobwhites (*Colinus virginianus*) to *Histomonas meleagridis* after exposure. **Avian Dis**, v. 25, n. 4, p. 981-7, Oct-Dec 1981.

ZHENG, T. et al. Agricultural exposure to carbamate pesticides and risk of non-Hodgkin lymphoma. **J Occup Environ Med**, v. 43, n. 7, p. 641-9, Jul. 2001.