

A Deus, por minha vida e todos os aspectos inerentes à mesma.
À minha esposa, Tânia,
e aos meus filhos, Luiza, Victor e Arthur:
por vocês tudo vale a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, pela orientação, oportunidades e incentivo na realização deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri, pela co-orientação, disponibilidade e apoio em momentos importantes desta caminhada.

Ao Prof. Dr. Hermênio Cavalcante Lima e à Fabíola, pela disponibilidade, auxílio e valiosas contribuições para as contagens de CD4 e CD8.

Aos Hemocentro de Santa Catarina, pela disponibilidade de equipamentos e estrutura física.

Ao HGuFI, pela disponibilidade dos equipamentos para o hemograma e para as medidas da atividade das enzimas e determinação da concentração de uréia.

À Dra. Maria Aparecida, Claudia, Marilene e Dorlene pela colaboração e ensinamentos imprescindíveis nas análises histológicas e pela amizade, boa vontade e paciência que sempre demonstraram.

Aos amigos do LNH, Prf^a Andréia, Marco, Ricardo, Evaldo, Marcos, Cláudia, Giordano, Carlos, Laudete e em especial aos bolsistas Ezequiel e Fabíola, pela colaboração, amizade, incentivo e bons momentos compartilhados durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e amigos do mestrado, pela amizade e bom convívio desfrutados.

Aos amigos do LAC–H GuFI pela compreensão e companheirismo constantes.

Aos meus Pais e irmãos pelo exemplo e pelo amor, sempre presentes na minha vida.

À minha esposa Tânia e aos meus filhos Luiza, Victor e Arthur, pelo imenso amor, carinho e compreensão que tanta felicidade proporcionam à minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRAT.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	05
2.1 OBJETIVO GERAL.....	06
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	06
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	08
3.1 AGROTÓXICOS.....	09
3.2 GLIFOSATO.....	13
3.2.1 Caracterização química e propriedades físico-químicas.....	13
3.2.2 Emprego e mecanismo de ação.....	14
3.2.3 Tóxicocinética.....	15
3.2.3.1 Absorção.....	15
3.2.3.2 Distribuição.....	16
3.2.3.3 Metabolização.....	16
3.2.3.4 Excreção.....	17
3.2.4 Periculosidade ambiental.....	17
3.2.5 Classificação toxicológica	18
3.3 EPIDEMIOLOGIA.....	18
3.4 EFEITOS SOBRE A SAÚDE.....	24
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA.....	33
4.2 ANIMAIS.....	33
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	34
4.4.1 Sangue total e soro.....	34

4.4.2 Fígado.....	34
4.4.3 Medula óssea.....	35
4.4.4 Linfócitos do sangue periférico.....	36
4.4.5 Linfócitos dos linfonodos.....	36
4.5 ENSAIO/ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	36
4.5.1 Hemograma.....	36
4.5.2 Determinação da concentração sérica da uréia.....	37
4.5.3 Avaliação da função hepática.....	37
4.5.4 Análises histológicas.....	38
4.5.5 Contagem e relação dos linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , do sangue periférico e linfonodo.....	38
4.5.6 Análise estatística.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 REDUÇÃO NO GANHO DE PESO.....	41
5.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA.....	42
5.2.1 Medida da atividade sérica da alanina aminotransferase.....	43
5.2.2 Medida da atividade sérica da aspartato aminotransferase.....	45
5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO.....	47
5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA	49
5.5 HEMOGRAMA.....	55
5.5.1 Contagem de eritrócitos.....	55
5.5.2 Determinação da concentração de hemoglobina.....	59
5.5.3 Volume corpuscular médio.....	61
5.5.4 Hematócrito.....	62
5.5.5 Hemoglobina corpuscular média.....	64
5.5.6 Concentração hemoglobínica corpuscular media.....	65
5.5.7 Coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos.....	66
5.5.8 Contagem de plaquetas.....	68
5.5.9 Contagem global dos leucócitos.....	70
5.5.10 Contagem de monócitos	72

5.5.11 Contagem de granulócitos.....	73
5.5.12 Contagem de linfócitos.....	75
5.6 CONTAGEM E RELAÇÃO DOS LINFÓCITOS CD4 ⁺ E CD8 ⁺ , NO SANGUE PERIFÉRICO E LINFONODO	77
5.6.1 Percentual e relação dos linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no sangue periférico	78
5.6.2 Percentual e relação dos linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no linfonodos	83
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS.....	88
6.1 CONCLUSÃO	89
6.2 PERSPECTIVAS PARA FUTUROS TRABALHOS.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
8. ANEXOS	104
8.1 REAGENTES	105
8.2 SOLUÇÕES	105
8.3 COLORAÇÕES	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL ₅₀ em ratos – MS	13
Tabela 2	Classificação dos agrotóxicos segundo a DL ₅₀ em ratos – WHO.....	13
Tabela 3	Distribuição tecidual do glifosato após dose oral única em ratos ..	16
Tabela 4	Dados referentes à medida da atividade sérica da ALT no grupo controle e nos grupos tratados com glifosato.....	44
Tabela 5	Dados referentes à medida da atividade sérica da AST no grupo controle e nos grupos tratados com glifosato.....	46
Tabela 6	Dados estatísticos referentes à contagem de eritrócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.....	58
Tabela 7	Dados referentes a determinação da concentração sérica de uréia dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato ...	59
Tabela 8	Dados referentes à determinação da concentração de hemoglobina dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	60
Tabela 9	Dados referentes à medida de VCM dos eritrócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	61
Tabela 10	Dados referentes aos valores do hematócrito dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	63
Tabela 11	Dados estatísticos da HCM dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.....	64
Tabela 12	Dados estatísticos da CHCM dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	65
Tabela 13	Dados estatísticos referentes ao RDW dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	67
Tabela 14	Dados referentes a da plaquetometria dos ratos do grupo controle e dos tratados com glifosato	70

Tabela 15	Dados referentes a leucometria global dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	71
Tabela 16	Dados referentes à contagem de monócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	72
Tabela 17	Dados referentes à contagem de granulócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	74
Tabela 18	Dados referentes à contagem de linfócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	76
Tabela 19	Dados dos valores percentuais dos linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e da relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no sangue periférico dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	79
Tabela 20	Dados referentes aos valores absolutos dos linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ no sangue periférico dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	79
Tabela 21	Dados referentes aos valores percentuais dos linfócitos CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e da relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no linfonodo dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	84
Tabela 22	Dados referentes ao peso dos linfonodos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Molécula do glifosato.....	14
Figura 2	Glifosato sal de isopropilamina.....	14
Figura 3	Ácido aminometilfosfônico.....	17
Figura 4	Ganho de peso dos animais.....	42
Figura 5	Atividade sérica da ALT.....	44
Figura 6	Atividade sérica da AST.....	46
Figura 7	Corte histológico de fígado de rato controle.....	50
Figura 8	Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato 1/10 da DL ₅₀ , sugestivo de aumento do número de células de Kupffer.....	50
Figura 9	Corte histológico de fígado de rato controle na região do espaço porta.....	51
Figura 10	Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato 1/10 da DL ₅₀ , na região do espaço porta, sugestivo de aumento do tecido conjuntivo.....	51
Figura 11	Corte histológico de fígado de rato controle (Coloração para reticulina).....	52
Figura 12	Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato 1/10 da DL ₅₀ , sugestivo de incremento no número espessura de fibras de reticulina (Coloração para reticulina).....	52
Figura 13	Corte histológico de medula óssea de rato controle.....	53
Figura 14	Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/1000 da DL ₅₀ , com padrão de normalidade	53
Figura 15	Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/100 da DL ₅₀ , com padrão de normalidade.....	54
Figura 16	Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/10 da DL ₅₀ , com padrão de normalidade.....	54
Figura 17	Contagem eritrócitos.....	58

Figura 18	Uréia sérica.....	59
Figura 19	Hemoglobinemia.....	60
Figura 20	VCM.....	62
Figura 21	Hematócrito.....	63
Figura 22	HCM.....	64
Figura 23	CHCM.....	66
Figura 24	RDW.....	67
Figura 25	Contagem plaquetas.....	70
Figura 26	Leucometria global.....	71
Figura 27	Contagem de monócitos.....	73
Figura 28	Contagem de granulócitos.....	75
Figura 29	Contagem de linfócitos.....	76
Figura 30	Linfócitos CD4 ⁺ no sangue periférico.....	81
Figura 31	Linfócitos CD8 ⁺ no sangue periférico.....	81
Figura 32	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no sangue periférico.....	82
Figura 33	Linfócitos CD4 ⁺ no linfonodo.....	84
Figura 34	Linfócitos CD8 ⁺ no linfonodo.....	85
Figura 35	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no linfonodo.....	85
Figura 36	Peso dos linfonodos.....	86
Figura 37	Imagem de linfonodos: grupo controle e tratado com diluição 1/10 DL ₅₀	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AchE	Acetil colinesterase
AcP	Fosfatase ácida
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AMPA	Acido amimometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCC	Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações
AST	Aspartato aminotransferase
AZT	Zidovudina
CHCM	Concentração hemoglobínica corpuscular média
CIT	Centro de Informações Toxicológicas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPM	Erro padrão da média
ERK	Sinalização extracelular de quinases
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
H/E	Hematoxilina e eosina
HCM	Hemoglobina corpular média
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICD	Isocitrato desidrogenase
IDA	Ingestão diária aceitável
IDTM	Ingestão diária teórica máxima
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer

LDH	Lactato desidrogenase
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MD	Malato desidrogenase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
OMS - WHO	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana para Saúde
PBS	Tampão fosfato
POEA	Polioxietilenoamina
RDW	Amplitude de distribuição dos eritrócitos
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa
SAB	Soroalbumina bovina
SIDA	Síndrome da imunodeficiência humana
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TNF	Fator de necrose tumoral
U/L	Unidades por litro
VCM	Volume corpuscular médio

RESUMO

A agricultura moderna tem se tornado cada vez mais dependente da mecanização e do uso de insumos como os agrotóxicos. A utilização destes produtos em larga escala, combinada às diferentes formas pelas quais o ser humano pode ser exposto aos mesmos, tem resultado em freqüentes contaminações humanas e ambientais. A literatura científica tem associado a exposição crônica aos agrotóxicos com conseqüências para a saúde humana, tais como alterações hematológicas, imunológicas e o desenvolvimento de neoplasias. O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo, derivado da glicina, amplamente utilizado no Brasil para o controle de cerca de 70 espécies de plantas daninhas perenes e 80 espécies de anuais e normalmente é comercializado na forma de sal de isopropilamina. Toxicologicamente é classificado como produto da Classe IV - Pouco Tóxico, sendo sua DL_{50} para ratos de 4.870 mg/kg de peso corporal. Quanto a periculosidade ambiental pertence a Classe III - Produto Perigoso. Dados da literatura referentes aos efeitos deste produto sobre a saúde humana são contraditórios e em alguns aspectos como o imunológico, escassos. Em consonância com o exposto o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da exposição crônica ao glifosato sobre o fígado, sangue periférico, medula óssea e sistema imunológico, em ratos. Para isso três grupos de animais receberam o agrotóxico por via oral em doses equivalentes a 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL_{50} do produto, em intervalos de 48 horas, por um período de 75 dias. No grupo controle foi administrado água. Ao término do período foram coletadas amostras de sangue, fígado, medula óssea e linfonodos. Foram realizadas as seguintes análises: controle do ganho de peso, hemograma; dosagem de uréia, medida da atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); análises histológicas do fígado e da medula óssea; contagem de células $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico e linfonodos. Os animais tratados apresentaram redução no ganho de peso, alterações no hemograma, aumento dos níveis séricos das enzimas e da uréia, aumento da reticulina e do número de células de Kupffer no fígado, redução de células $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico, redução de células $CD4^+$ e aumento de células $CD8^+$ no linfonodo e redução da relação $CD4^+/CD8^+$ neste último, o qual apresentou-se hipertrofiado. Os resultados demonstraram que a exposição ao glifosato compromete vários parâmetros do sangue periférico, a função hepática e o sistema imune.

Palavras-chave: glifosato, ratos, fígado, ALT, AST, hemograma, linfócitos $CD4^+$, linfócitos $CD8^+$.

ABSTRACT

Modern agriculture has become more and more dependent on the mechanization and on the use of agrochemicals as the pesticides. The utilization of these products in a large scale, combined to the different forms by which the human being can be exposed to them has resulted in frequent human and environmental contaminations. The scientific literature has associated chronic pesticides exposure to consequences for the human health, such as hematological, immunological alterations and cancer development. The glyphosate is a systemic, post-emergent and nonselective herbicide, derived from glycine, widely used in Brazil for the control of about 70 species of perennial weeds and 80 species of annuals and it is normally commercialized in the form of isopropylamine salt. Toxicologically it is classified as a Class IV product – Little Toxic – being its LD₅₀ 4870 mg/kg of body weight for rats. Regarding to environmental dangerousness, it belongs to Class III – Dangerous Products. Literature data referent to the effects of this product over human health are contradictory and in some aspects, as the immunological one, rare. In accordance with the exposed, the objective of this study was the evaluation of the effect of chronic exposure to glyphosate to the liver, peripheral blood, bone marrow and immunological system in rats. For this, three groups of animals were given the pesticide by gavage in doses equivalent to 1/1000, 1/100 and 1/10 of the glyphosate LD₅₀, in intervals of 48 hours, during a period of 75 days. In the control group water was given. By the end of the period, blood, liver, bone marrow and lymph nodes samples were collected. The following analyses were made: weight gain control, complete blood count (CBC); blood ureic nitrogen (BUN) measure, serum aspartate amino transferase and alanine amino transferase measure; histological analysis of liver and bone marrow; count of the CD4⁺ and CD8⁺ cells in the peripheral blood and lymph nodes. The treated animals presented a reduction of the body weight gain, alterations in the CBC, increase of the serum levels of the enzymes and of BUN, increase of the reticulin fibers and number of Kupffer cells in the liver, decrease of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the peripheral blood; decrease of CD4⁺ cells, increase of CD8⁺ cells and decrease of the CD4⁺/CD8⁺ ratio in the lymph node, which was hypertrophied. The results demonstrated that the exposure to glyphosate compromises various parameters of the peripheral blood, hepatic function and immune system.

Key words: glyphosate, rats, liver, ALT, AST, complete blood count, CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional gera maior demanda de alimentos exigindo incremento da produção agrícola. A população mundial que em 1960 era de 3,04 bilhões de habitantes passou para 6,079 bilhões no ano 2000, um crescimento de 99,97% no período e as estimativas para o ano 2015 são de 7,172 bilhões (U.S. CENSUS BUREAU, 2002). Por sua vez a produção de cereais cresceu de 1,076 para 1,913 bilhões de toneladas entre 1966 e 1990 no mundo (incremento de 77,79%, AGCAOILI; ROSEGRANT, 1994). No Brasil, o crescimento populacional no período de 1960 a 2000 foi de 142,3%, passando de 70,07 milhões para 169,78 milhões de habitantes (IBGE, 2002), enquanto que a produção de cereais passou de 16,237 milhões de toneladas em 1960 (IBGE, 1963) para 96,495 milhões de toneladas em 2000 (IBGE, 2001a), um crescimento de 494%.

A emigração da população rural para centros urbanos, fruto da transição da cultura agrária para a industrializada, que vem ocorrendo nos países em desenvolvimento, traz como consequência a evasão da força de trabalho rural a qual tem demonstrado índices de crescimento bem inferiores aos evidenciados para a produção agrícola e número total de habitantes, nestes países (ECOBICHON, 2001). Segundo dados do IBGE (IBGE, 2002), paradoxalmente ao crescimento populacional e da produção de cereais ocorrido no Brasil, a população rural no ano de 1960, em números absolutos, era superior a de 2000 (38,7 e 31,8 milhões, respectivamente). Estes fatos tem tornado a agricultura cada vez mais dependente da mecanização e do uso de insumos como os agrotóxicos.

Os agrotóxicos têm sido utilizados principalmente para minimizar a ação danosa de insetos, doenças ou vegetais que possam ocasionar qualquer perda na produção agrícola, mas também são empregados em ambientes domésticos, urbanos ou rurais, industriais e em saúde pública, entre outros (ECOBICHOM, 2000).

Em função dessa diversidade de aplicação, estes produtos são amplamente utilizados no mundo. O total de vendas de agrotóxicos no mercado mundial, durante o ano de 1995, foi de US\$ 30,3 bilhões (AGROCHEMICAL, 1996). Os herbicidas, inseticidas e fungicidas constituem as classes de agrotóxicos mais utilizadas no mundo, correspondendo a 40%, 30% e 20%, respectivamente (WHO, 1992). No Brasil, segundo a Secretaria de Política Agrícola do Ministério da

Agricultura Abastecimento e Pecuária (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2003), o volume de vendas desses produtos, durante o ano de 2000, foi de US\$ 2,5 bilhões, dos quais US\$ 1,3 bilhão somente em herbicidas.

Entretanto, se por um lado, o abandono ou redução no uso de agrotóxicos poderia causar queda na produção de alimentos, aumento do custo de produção e elevação dos preços dos mesmos, resultando em fome e altos níveis de desnutrição (KNUTSON, 1999), por outro, tem crescido a preocupação quanto à segurança na utilização dos mesmos (MARONI; ANTONELA; COLOSIO, 1999; MAGE *et al.*, 2000; EDLESTON *et al.* 2002).

A utilização dos agrotóxicos em larga escala, combinada às diferentes formas pelas quais o ser humano pode ser exposto aos mesmos, tem resultado em freqüentes contaminações humanas e ambientais (ECOBICHON, 2001). Além disso, a literatura científica tem associado a exposição crônica aos agrotóxicos com conseqüências para a saúde humana, tais como alterações hematológicas, imunológicas, aborto, malformações, alterações hormonais e neurocomportamentais, e o desenvolvimento de neoplasias.

Todavia, os resultados das pesquisas sobre os riscos oferecidos por alguns agrotóxicos amplamente utilizados como o glifosato, tem gerado polêmicas na população em geral e no meio científico (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Em termos de Brasil não foram encontrados dados relativos às quantidades consumidas deste agrotóxico ou qualquer outro individualmente, seja do princípio ativo ou da formulação comercial. O único levantamento encontrado, realizado no estado do Paraná, sobre o emprego de agrotóxicos por princípio ativo (IBGE, 2001b), demonstrou que o glifosato foi o herbicida mais utilizado, 5.183 toneladas na safra 98/99, empregado principalmente no cultivo da soja. Como a soja é amplamente cultivada no Brasil pode-se supor que este agrotóxico seja empregado em larga escala. Outro aspecto a favor desta suposição é a diversidade de emprego deste herbicida, não apenas no âmbito agrícola mas também em áreas residenciais, industriais e vias de transporte (ANDREI, 1999). Em conseqüência o glifosato se constitui em um produto que oferece grandes possibilidades para a exposição humana ao mesmo.

Por outro lado, além da discordância existente na literatura a cerca dos efeitos do glifosato sobre a saúde, como os trabalhos de BOLOGNESI e colaboradores (1997) e KIER e colaboradores (1997), envolvendo aspectos de genotoxicidade, recentemente este agrotóxico tem sido associado com efeitos, até então não descritos, sobre a saúde humana como parkinsonismo, (BARBOSA *et al.*, 2001) e o aborto (ARBUCKLE; LIN; MERY 2001). Adicionalmente, outros dados oriundos de modelos experimentais com animais, como as malformações em ratos demonstradas por DALLEGRAVE *et al.* (2003), e de modelos *in vitro* como a inibição da esteroidogênese (WALSH, *et al.*, 2000) e a interferência no ciclo celular verificada por MARC e colaboradores (2002) têm questionado a segurança da sua utilização.

Diante destas abordagens e do amplo emprego deste agrotóxico verifica-se que os riscos para a saúde relacionados com a exposição ao mesmo precisam ser continuamente explorados e até reavaliados à luz de novos conhecimentos e metodologias.

Em consonância com essas colocações, este trabalho teve como propósito avaliar aspectos da função hepática, hematológicos e imunológicos.

Cabe salientar que não foram encontrados estudos abordando os efeitos do glifosato sobre a imunidade pela contagem e relação das sub-populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Portanto, neste trabalho, a abordagem desse aspecto pode ser considerada inédita.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do agrotóxico glifosato sobre o sangue periférico, fígado, sistema imunológico e medula óssea em um modelo animal de rato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso dos animais expostos ao glifosato;
- Avaliar o efeito do agrotóxico glifosato, em nível de sangue periférico, por intermédio da análise dos parâmetros do hemograma;
- Avaliar o efeito do agrotóxico glifosato sobre a função hepática por meio da medida da atividade sérica das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST);
- Avaliar o efeito do agrotóxico glifosato sobre as características histológicas do tecido hepático e hematopoiético pela análise de cortes histológicos corados;
- Verificar se há correlação entre os resultados da análise histológica do fígado e os parâmetros da atividade sérica da ALT e AST;
- Verificar se há alguma correlação entre os resultados da análise histológica da medula óssea e os parâmetros hematológicos do sangue periférico;
- Avaliar o efeito do agrotóxico glifosato sobre o sistema imunológico por meio da contagem dos linfócitos CD4+ e CD8+ obtidos do sangue periférico e linfonodos e da razão CD4+/CD8+;

- Verificar se existem diferenças entre as contagens e relação dos linfócitos CD4+ e CD8+ no sangue periférico e linfonodos, oriundas de possíveis efeitos da exposição ao agrotóxico glifosato.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AGROTÓXICOS

Desde a alvorada da civilização o homem vem se empenhando continuamente para melhorar suas condições de vida. Um dos grandes propósitos deste empenho refere-se à produção adequada de alimentos. Entretanto, na contraposição deste intuito tem enfrentado devastações causadas por insetos e doenças além da interferência negativa de ervas daninhas. Theophrastus (300 a.C.), o pai da botânica, descreveu doenças de plantas hoje conhecidas como ferrugem, podridão e gorgulho. O Antigo Testamento faz referência às pragas do Egito nas quais os gafanhotos eram os principais responsáveis e até os nossos dias continuam causando perdas importantes na produção agrícola (CREMLYN , 1991).

O emprego de produtos químicos para o controle de pragas remonta à época da Grécia e Roma antigas. O conhecimento de que o enxofre evitava doenças e combatia insetos antecede a 1000 a.C., assim como o emprego do mesmo como fumegante foi mencionado por Homero. O uso do arsênio como inseticida foi recomendado por Plínio (23 - 79 d.C.) e, posteriormente, pelos chineses no século XVI. No século XVII a nicotina, na forma de um extrato do tabaco, foi o primeiro inseticida de ocorrência natural a ser utilizado. Entretanto, as primeiras recomendações de uso destes produtos careciam de qualquer embasamento científico e somente no século XIX iniciaram-se os primeiros estudos sistemáticos sobre o emprego de produtos químicos para o controle de pragas na agricultura. Isso levou à introdução, por volta de 1850, dos pesticidas naturais rotenóides (rotenona) e piretróides (piretrum) e do verde de Paris (arsenito de cobre) em 1867. Em 1896 teve-se as primeiras observações sobre o emprego de produtos químicos (calda bordolês – mistura de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio) no combate às ervas daninhas. Em 1900, o uso do arsenito de cobre era tão amplo que suscitou a criação de uma legislação, possivelmente a primeira do mundo, para regulamentar o uso de pesticidas (CREMLYN, 1991; OMS/PNUMA, 1992).

Nas décadas de 30 e 40 foram patenteados diversos pesticidas como o dinitro-orto-cresol na França, tiram nos EUA, difenil tricloroetano (DDT) na Suíça,

fenoxiacéticos na Inglaterra e o Clordano na Alemanha, assim como compostos triazínicos, amins quaternárias e derivados da uréia nas duas décadas subseqüentes (HENAO; COREY, 1991).

A partir de 1970, embasado em conhecimentos mais aprofundados dos mecanismos biológicos e bioquímicos e da interação hospedeiro-parasita, surgiram inúmeros agrotóxicos mais eficazes como as sulfoniluréias, os piretróides sintéticos e o glifosato, assim como novas estratégias de formulação e novos métodos de aplicação (OMS/PNUMA, 1992).

No Brasil, o primeiro uso de agrotóxico ocorreu na cidade de Caçador, estado de Santa Catarina, em dezembro de 1946, onde foi empregado o hexaclorocicloexano no extermínio de gafanhotos (ZANIN *et al.*, 1992).

Atualmente estima-se que cerca de 1.500 substâncias com ação pesticida sejam utilizadas como ingredientes ativos em todo o mundo. No entanto, o número de formulações é bem superior, pois a partir desses ingredientes ativos são preparadas diversas misturas dos mesmos ou destes com outras substâncias empregadas como solventes, emulsificantes e surfactantes, as quais variam geográfica e cronologicamente (BRASIL, REPRESENTAÇÃO OPAS/OMS, 1996). No Brasil, os agrotóxicos incluem uma diversidade de cerca de 300 princípios ativos e 2000 formulações comerciais (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE/CONSELHO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 1998).

Conforme o Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, no seu artigo primeiro, inciso IV, entende-se agrotóxicos e afins como: “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos

empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA, CASA CIVIL, SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS, 2002).

Na literatura é freqüente o emprego do termo pesticida. Para CASARETT e colaboradores (1996) pesticida refere-se a qualquer substância ou mistura de substâncias produzidas especificamente para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer peste. Os mesmos autores também consideram pesticidas como qualquer agente físico, químico ou biológico que destrua qualquer planta ou animal indesejável, neste caso considerado peste.

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

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto ao seu uso, grupo químico a que pertencem, periculosidade ambiental e classe toxicológica. Quanto ao uso podem ser distribuídos em diversos grupos, sendo que entre os utilizados em maior escala a nível mundial encontram-se os herbicidas, inseticidas e fungicidas, enquanto que outros como os acaricidas, rodenticidas, nematicidas, molusquicidas, reguladores do crescimento de plantas, desfolhantes e

dessecantes, representam grupos de emprego em menor escala (FARQUHARSON, 1976).

No que tange aos grupos químicos podem ser citados os organofosforados, organoclorados, piretróides, carbamatos, etileno-bis-ditiocarbamatos, bupiridilos, ftalimidias, ftalonitrilas, fenóxiacéticos, triazóis e glicinas como grupos amplamente utilizados (AZEVEDO, 1995).

A Portaria nº 84/96, de 15 de outubro de 1996, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), estabelece em seu art. 3º a classificação dos agrotóxicos quanto ao potencial de periculosidade ambiental em quatro classes: Classe I – Produto altamente perigoso; Classe II – Produto muito perigoso; Classe III – Produto perigoso e; Classe IV – Produto pouco perigoso. O mesmo artigo discrimina os parâmetros (bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade para diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico) nos quais baseia-se a classificação (IBAMA, 1996).

A classificação toxicológica para os agrotóxicos no Brasil é função do Ministério da Saúde. Este deve classificar os produtos em quatro classes, devendo inclusive, cada produto apresentar uma faixa colorida no rótulo, indicativa de sua classe toxicológica, conforme quadro 2.1 e tabela 2.1 (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE - ANVISA, 1992).

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

Quadro 1. Classificação toxicológica e cor da faixa no rótulo de produto agrotóxico. Fonte: BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA, 1992.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos segundo a DL₅₀ em ratos.

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

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

Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação quanto ao risco de um pesticida para a saúde humana está primariamente fundamentada na toxicidade aguda oral e dérmica (DL₅₀) do ingrediente ativo para o rato, uma vez que estas determinações são consideradas procedimentos padronizados em toxicologia. O pesticida é classificado sempre segundo o maior risco por qualquer das vias, oral ou dérmica, podendo ser considerados outros aspectos quando o risco para a saúde humana diferir do indicado pela avaliação isolada pela DL₅₀ (WHO, 2000).

Tabela 2. Classificação dos agrotóxicos segundo a DL₅₀ em ratos

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

Fonte: WHO, 2000.

3.2 GLIFOSATO

3.2.1 Caracterização química e propriedades físico-químicas

O glifosato é um ácido orgânico fraco constituído de uma molécula de glicina e uma de fosfometila, denominado N-(fosfometil)glicina (fig. 1). Na sua forma pura, o glifosato é um pó, branco, inodoro, com densidade específica de

1,704 g/cm³, a 20^o C, solubilidade em água de 11,6 g/L, a 25^o C e pH 2,5 em solução a 1%. Devido a sua alta polaridade é praticamente insolúvel em solventes orgânicos como etanol, acetona e benzeno (WHO, 1994).

Figura 1. Molécula do glifosato (C₃H₈NO₅P)

O Glifosato como produto comercial é disponibilizado em diferentes formulações e concentrações. Usualmente é formulado como um sal do ácido glifosato desprotonado e um cátion, a isopropilamina (sal de isopropilamina – fig 2), em solução aquosa, na concentração de 356 g/L do ácido livre ou 480 g/L do sal e tendo como surfactante a polioxietilenoamina (WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Figura 2. Glifosato na forma de sal de isopropilamina

3.2.2 Emprego e Mecanismo de ação

O glifosato é um herbicida sistêmico, pós-emergente e não seletivo, derivado da glicina, utilizado para o controle de plantas daninhas na agricultura e pecuária,

na implantação de espécies florestais (eucaliptus e pinus), em áreas industriais, estradas de ferro e de rodagem, áreas residenciais (pátios), linhas de alta tensão, canais drenados, ambientes urbanos como calçadas, ruas, terrenos baldios, jardins e parques. No Brasil é empregado no controle de cerca de 70 espécies de plantas daninhas perenes e 80 espécies de anuais (ANDREI, 1999).

O mecanismo de ação do glifosato em plantas fundamenta-se em interferir na biossíntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano. O mesmo inibe a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintetase, que é responsável pela biossíntese do corismato, um intermediário na síntese destes aminoácidos. Esta via enzimática não está presente no reino animal (CREMLYN, 1991; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

3.2.3 Toxicocinética

3.2.3.1 Absorção

Trabalho realizado com ratos demonstrou que após a administração oral de uma dose única de 10 mg/kg de peso corporal de glifosato ácido, marcado com ^{14}C e ^{12}C , a taxa de absorção ficou em torno de 35% a 40% (BREWSTER; WARREN; HOPKINS, 1991).

Estudo da absorção percutânea do glifosato na forma de sal de isopropilamina, realizado em macacos Rhesus, demonstrou uma taxa de absorção de 3,7% em dose baixa ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e de 5,5% em dose alta ($270 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), após um tempo de contato de 12 h (WESTER *et al.*, 1991). Experimentos realizados *in vitro* com pele humana revelaram uma taxa de absorção do glifosato em solução aquosa, de 1,42% da dose aplicada (WESTER; QUAN; MAIBACH, 1996).

3.2.3.2 Distribuição

A distribuição do glifosato no organismo (ratos machos e fêmeas) foi determinada pela medida da concentração em mg de glifosato marcado com ^{14}C /kg do tecido fresco, sete dias após uma dose oral única (10 ou 1.000 mg/kg de peso corporal). A distribuição foi ampla, embora a absorção tenha sido pequena. Diversos tecidos foram analisados e os resultados estão expressos na tabela 3 (WHO, 1994)

Tabela 3. Distribuição tecidual do glifosato após dose oral única em ratos

Dose de 10 mg /kg peso corporal		Dose 1000 mg/kg peso corporal	
Tecido	[] mg/kg tec. fresco	Tecido	[] mg/kg tec. fresco
Osso	0,55	Osso	30,6
Colon	0,034	Colon	11,0
Fígado	0,030	Fígado	1,9
Medula óssea	0,029	Medula óssea	4,1
Rim	0,022	Rim	1,9
Intestino delgado	0,022	Intestino delgado	1,9
Pulmão	0,015	Pulmão	1,5
Baço	0,012	Baço	2,6
Estômago	0,0080	Estômago	2,4
Mucosa nasal	0,0050	Mucosa nasal	1,7
Sangue	0,0045	Sangue	0,33
Tireóide	0,00080	Tireóide	1,5

Fonte: Adaptado de WHO, 1994

3. 2.3.3 Metabolização

O principal metabólito encontrado em estudos realizados em ratos foi o ácido aminometilfosfônico (AMPA), em concentração de 0,2% a 0,3% da dose administrada (WHO, 1994).

Figura 3. Ácido aminometilfosfônico

3.2.3.4 Excreção

Após administração de dose oral única (10 ou 1.000 mg/kg de peso corporal) a excreção nas fezes foi de 62 a 70 % em ambas as doses, enquanto que a excreção urinária foi de 14 a 18% e de 22 a 29% para as doses de 1000 e 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente, e menos do que 0,2% foi eliminado via expiração (WHO, 1994). CHAN e MAHLER (1992), obtiveram valores para excreção fecal e urinária em ratos, 72 horas após dose oral de 5,6 ou 56 mg/kg de peso corporal, de 70 a 80% e de 20 a 30%, respectivamente, permanecendo cerca de 1% no organismo. O mesmo estudo verificou que a excreção fecal correspondia ao glifosato não absorvido, enquanto que a excreção urinária correspondia à quantidade de glifosato absorvida. Esta conclusão foi possível após a administração do glifosato por via intraperitoneal e endovenosa.

3.2.4 Periculosidade ambiental

No que tange ao potencial de periculosidade ambiental, o IBAMA classifica os produtos a base de glifosato como “Produto perigoso”- Classe III embora existam algumas formulações enquadradas na Classe II- “Produto muito perigoso” (BRASIL-MAPA-ANVISA-IBAMA, sd).

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

3.2.5 Classificação toxicológica

A DL_{50} para o glifosato em ratos na forma do ácido de N-(fosfometil)glicina é 4.230 mg/kg de peso corporal para o estado sólido e de mais de 5.000 mg/kg de peso corporal para o estado líquido, sendo classificado, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) como um produto que seria improvável de causar risco agudo em uso normal continuado (WHO, 1994; WHO, 2000). Segundo LARINI (1999) a DL_{50} do glifosato é de 4.870 e 1.570 mg/kg de peso corporal para ratos e camundongos, respectivamente. No Brasil, as formulações contendo glifosato, na sua maioria encontram-se na forma de sal de isopropilamina e são classificadas pelo Ministério da Saúde, quanto à toxicidade, como produto da Classe IV - pouco tóxico. No entanto, existem produtos que foram enquadrados como Classe III - medianamente tóxico, como alguns na forma de sal de potássio (BRASIL-MAPA-ANVISA-IBAMA, sd).

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Em relação às possibilidades de gerar contaminação, os agrotóxicos ocupam uma posição especial entre os muitos produtos químicos aos quais o ser humano pode ser exposto. Pode-se salientar a exposição ocupacional primária, a que estão sujeitos os trabalhadores da agricultura diretamente envolvidos no manuseio dos agrotóxicos e outros dedicados aos demais afazeres rurais, os trabalhadores das indústrias de pesticidas, os implicados no transporte e armazenamento e os que se ocupam da aplicação de alguns destes produtos, sobretudo os inseticidas, em saúde pública. Secundariamente os agrotóxicos

podem contaminar a população em geral, por meio do consumo de água e alimentos contaminados e a população que reside nas proximidades de áreas agrícolas. Pode ainda ocorrer contaminação pelo uso doméstico em áreas rurais ou urbanas (MARONI *et al.*, 2000).

Quanto à duração da exposição aos agrotóxicos podem ser encontrados termos como exposição aguda, aguda-única, aguda-repetida, sub-crônica, crônica e aguda sobre crônica. KEMPLE (2001), refere-se à exposição aguda como aquela que ocorre uma ou duas vezes num período de tempo de uma semana ou menos. A exposição crônica é aquela que ocorre por espaço de tempo superior a 10% do tempo médio de vida considerado para aquela espécie. Por sua vez, a exposição sub-crônica compreenderia aquela que ocorresse por um período de mais de sete dias e menos de 10% da vida média.

O Ministério da Saúde com a Fundação Oswaldo Cruz recomendam aos centros de Assistência Toxicológica classificar as exposições como: Aguda-única: aquela ocorrida na forma de exposição única; Aguda-repetida: quando ocorreu mais de uma exposição em um período inferior a 15 dias; Crônica: a exposição que ocorra por mais de quinze dias, e; Aguda sobre crônica: aquela em que ocorra uma exposição aguda em indivíduos cronicamente expostos a mesma substância ou produto (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/FIOCRUZ, 2001).

Em face da importância epidemiológica para a saúde pública, a presença de resíduos de agrotóxicos na água e alimentos deve ser investigada. No entanto, justamente nos países onde a vigilância sobre a qualidade e o uso dos agrotóxicos é menos rigorosa e, portanto, com maior possibilidade de contaminação com tais resíduos, há carência de centros com tecnologia para um amplo acompanhamento dos níveis destes contaminantes (DINHAM, 2003).

A pesquisa de agrotóxicos como contaminantes da água geralmente tem focalizado o ingrediente ativo do produto, entretanto, esta conduta pode levar a distorções na interpretação do potencial de risco oferecido para a saúde humana. Uma pesquisa com o objetivo de quantificar os produtos de degradação dos

herbicidas na água de poços em Iowa – USA, demonstrou que estes encontravam-se em frequência e quantidades superiores aos seus compostos de origem nas mesmas amostras analisadas. Além disso, os produtos de degradação dos herbicidas representaram 8 dos 10 compostos mais frequentes e, embora as concentrações individuais dos analitos não tenham ultrapassado os limites permitidos pelas autoridades locais, deve-se considerar que para mais da metade dos compostos analisados ainda não haviam sido estabelecidos limites máximos aceitáveis. Outro aspecto é o critério para os limites destes produtos na água para consumo humano, que leva em conta somente o composto individualmente, não considerando o efeito da soma de todos os compostos presentes naquela amostra (KOLPIN; THURMAN; LINHART, 1999). Outros trabalhos demonstraram a contaminação de águas de superfície e do sub-solo por pesticidas em diversos locais do mundo. TAPPE, GROENEWEG e JANTSCH (2002) demonstraram a presença de atrazina (herbicida, triazínico) em aquíferos na Alemanha. Na África do Sul, DALVIE e colaboradores (2003) encontraram endossulfan (inseticida e acaricida, organoclorado), deltametrina (inseticida, piretróide sintético), clorpirifós (inseticida, organofosforado), iprodine (fungicida, hidantoínas), fenarimol (fungicida, pirimidinas) em águas de superfície e do sub-solo.

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

A presença de agrotóxicos em alimentos é outra fonte de preocupação em vista dos riscos que tais produtos podem representar para a saúde humana.

VALENZUELA, PICO e FONT (2001) detectaram resíduos de acaricidas e inseticidas em 25,4% das 150 amostras de laranja examinadas na cidade de Valencia – Espanha, e em 2,7% das amostras, dois dos inseticidas analisados encontravam-se em valores acima dos limites máximos permitidos. Pesquisa realizada em amostras de uva na Itália, nos anos de 1996 (481 amostras), 1998 (1.195 amostras) e 1999 (1.949 amostras) demonstrou que 7,9%, 6,5% e 2,5%, respectivamente, estavam contaminadas com um dos 16 pesticidas analisados (CABRAS; CONTE, 2001). Resíduos de organoclorados suplantando os limites permitidos foram detectados em carne de cordeiro na Iugoslávia (SPIRIC; SACIC, 1998) e em hortaliças na Índia (BAKORE; JOHN; BHATNAGAR, 2002).

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

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

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

Na Dinamarca o glifosato é o agrotóxico mais utilizado. A pesquisa do mesmo e do seu metabólito AMPA em cereais destinados ao consumo humano, obtidos das safras de 1998 (49 amostras) e 1999 (46 amostras), revelou-se positiva em 60% das amostras analisadas, com valores médios de 0,08 e 0,11 mg/kg de cereal e máximos de 1,25 e 1,62 mg/kg, respectivamente. Cálculos realizados a partir das concentrações nos cereais e do consumo humano destes forneceram a estimativa de uma ingestão de 7 µg/dia (GRANBY; VAHL, 2001).

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

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

No Brasil, os dados estatísticos relacionados com a exposição a estes produtos são incompletos. A nível nacional os registros quanto ao agente tóxico não são efetuados por agrotóxico, sendo as intoxicações reportadas apenas como agrotóxicos/uso agrícola, agrotóxicos uso doméstico e raticidas. Durante o ano de 2000 foram registrados no Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) 11.543 casos de intoxicações por agrotóxicos, incluídos os raticidas, com 208 óbitos. A intoxicação por estes agentes representou 15,86% de um total de 72.786 casos, correspondendo a segunda maior causa de intoxicações no país, sendo menor apenas para as ocasionadas por medicamentos, que foi de 30,39%. Porém, quanto à letalidade é a primeira, com uma taxa de 1,8% e representando 55,17% do total de 377 óbitos ocorridos. As três principais circunstâncias nas quais ocorreram as intoxicações por agrotóxicos foram: tentativa de suicídio (41,6%), acidente individual (37,35%) e ocupacional (13,3%). A notificação de casos de intoxicação por agrotóxicos não é compulsória e não existem Centros de Informações Toxicológicas (CITs) em todos os estados. Além disso, o envio dos dados registrados por estes centros ao SINITOX também não é compulsório, de forma que as estatísticas dos casos registrados estão subestimadas (SINITOX).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990) para cada caso notificado de intoxicação ter-se-ia 50 outros não notificados, o que corresponderia, estimativamente, a 577.150 casos de intoxicação por agrotóxicos no Brasil, durante o ano de 2000. Esses dados caracterizam o evento intoxicação por agrotóxicos e as doenças dele decorrentes como um problema de saúde pública. No âmbito financeiro, considerando que o Sistema de Saúde despense cerca de R\$ 150,00 para cada caso de intoxicação (BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE/CONSELHO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA, 1998), o custo total estimado para o tratamento das intoxicações por agrotóxicos atingiria a cifra de R\$ 86.572.500.

Dados específicos para um agrotóxico são difíceis de se obter. O relatório anual da Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações (APCC), referente ao ano de 2001, registrou 2.267.979 casos oriundos dos 64 centros

participantes, dos quais 90.010 (4% do total) foram devidos a pesticidas. O glifosato foi o agente tóxico responsável por 4.426 casos, correspondendo a 0,195% de todas as intoxicações e a 4,92% das referentes aos pesticidas (LITOVITZ, 2002).

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

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

3.4 EFEITOS SOBRE A SAÚDE

Na literatura mundial existem inúmeras referências associando a exposição aos pesticidas com várias patologias ou alterações em parâmetros do organismo humano (STILLER-WINKLER *et al.*, 1999; BUCKLEY *et al.*, 2000; ARBUCKLE; LIN; MERY, 2001; BEARD *et al.*, 2003, FARAHATT *et al.*, 2003).

Alterações neurocomportamentais foram demonstradas em homens após a exposição ocupacional a agrotóxicos organofosforados aplicados nas plantações de algodão, no Egito. Os indivíduos expostos apresentaram performance significativamente mais baixa em testes que avaliavam a abstração verbal, memória, atenção, solução de problemas e resposta visual motora, quando

comparados com um grupo controle da mesma faixa etária, condições socioeconômicas e nível educacional (FARAHAT *et al*, 2003).

Em pesquisa realizada em agricultores (791 indivíduos) do Colorado-EUA, entre 1992 e 1997, concluiu que havia forte associação entre sintomas de depressão e a exposição aos organofosforados (STALONE; BESELER, 2002a). Outro estudo realizado pelos mesmos autores verificou que a dificuldade de concentração, necessidade de anotação para lembrar de tarefas, dificuldade no entendimento de notícias de jornais e revistas, irritação, palpitação, cefaléia e necessidade de dormir mais que o habitual foram sintomas associados significativamente com a exposição aos organofosforados (STALONE; BESELER, 2002b).

A MEKONNEN e AGANOFIR (2002) avaliaram o efeito dos pesticidas sobre a função respiratória de trabalhadores rurais não fumantes da Etiópia e constataram que a mesma era consideravelmente inferior ao grupo controle, também de não fumantes.

Estudo realizado por BENER e colaboradores (2002) nos Emirados Árabes Unidos, demonstrou que os agricultores expostos aos pesticidas apresentavam alta prevalência de sinais e sintomas respiratórios e dérmicos quando comparados com o grupo controle. Tosse, faringite, bronquite, asma, insuficiência respiratória, pneumonia, sinusite, dermatite de contato, irritação nasal e cutânea foram os sinais e patologias com diferenças estatisticamente significantes, além da redução significativa nos parâmetros de espirometria como um todo e elevação dos níveis da IgE sérica total.

A nível ósseo também foi constatado comprometimento. COMPSTON e colaboradores (1999) verificaram que agricultores cronicamente expostos aos organofosforados apresentavam deficiente formação óssea tanto a nível tecidual quanto celular.

Estudo de coorte realizado por BEARD e colaboradores (2003) sobre trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos no período de 1935 a 1996, revelou uma taxa de mortalidade significativamente alta para diabetes e asma, quando considerado o período total analisado, em comparação com a população australiana em geral. Este estudo também evidenciou elevada mortalidade para outro grupo de patologias freqüentemente associadas à exposição aos pesticidas, as neoplasias.

Atualmente vários trabalhos têm relacionado a exposição crônica de agricultores e trabalhadores industriais aos pesticidas de diversos grupos químicos com o desenvolvimento de câncer (GOLDSMITH, 1998; FLEMING *et al.*, 1999; MATHUR *et al.*, 2002). Esta patologia ocupa a segunda posição como causa de morte nos países desenvolvidos. No Brasil a estimativa da incidência de câncer para o ano de 2003, indica que deverão ser registrados 402.190 novos casos. Os dados para mortalidade prevêm a ocorrência de 126.960 óbitos, estabelecendo o câncer como a terceira principal causa de morte (12,32% do total de óbitos) no país, superada apenas pelas doenças cardiovasculares e pelas causas externas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2003).

O câncer pode ser definido como uma classe de doenças que se caracteriza por um crescimento descontrolado de células funcional e morfológicamente anormais, as quais possuem capacidade de invadir tecidos e órgãos contíguos ou distantes, através do sangue, linfa e cavidades serosas, caracterizando as metástases (SIMONE, 2000). No entanto, a oncogênese não é um evento que ocorre de forma aguda, mas constitui-se em um processo de múltiplos passos conduzidos pelo acúmulo de alterações genéticas, usualmente por um período de vários anos da vida, culminando com a perda dos controles celulares normais sobre a divisão, proliferação e diferenciação da célula (CORTNER; VANDE WOUDE; VANDE WOUDE, 1997). A nível celular, para o desenvolvimento do câncer devem ocorrer três alterações:

- Imortalização: é a capacidade de crescimento indefinido pela célula, porém, esta ainda mantém características como a dependência de adesão

a uma superfície sólida, a dependência do soro (fatores de crescimento), a inibição dependente do contato e a organização do citoesqueleto;

- Transformação celular: representa a independência da célula em relação aos mecanismos de controle do crescimento;
- Metástase: constitui-se na capacidade de invadir tecidos normais formando novas colônias em outros sítios do organismo.

As múltiplas alterações que ocorrem no material genético da célula para torná-la cancerosa são denominadas mutações. Quando essas mutações ocorrem na classe dos genes supressores de tumor ou na classe dos genes ditos oncogenes, levam à transformação celular e estão associadas com a formação de tumores (LEWIN, 1997). Entretanto, as causas que determinam as alterações no material genético da célula culminando no câncer ainda não estão bem definidas, mas há evidências de que a maioria dos casos esteja associada a fatores externos ao organismo, como o estilo de vida e o meio ambiente. Nestes, podemos incluir o tabagismo, a exposição a radiações (ultravioleta e ionizantes), alguns vírus, a dieta, e a exposição a produtos químicos entre os quais se encontram os pesticidas (OMENN, 2000).

No estudo realizado por BEARD e colaboradores (2003), com trabalhadores rurais expostos aos agrotóxicos no período de 1935 a 1996, o câncer de pâncreas apresentou elevada incidência de mortalidade para o período classificado como período do DDT (1955 a 1962), enquanto que as leucemias, especialmente a mielóide aguda, a mortalidade foi significativa no período dos químicos modernos (1962 a 1996).

HOAR e colaboradores (1986) realizaram um estudo epidemiológico no Estado do Kansas, no qual verificaram um aumento de 6 vezes para o risco de desenvolver linfoma não-Hodgkin (LNH), em agricultores expostos por mais de 20 dias/ano aos herbicidas do grupo dos fenoxiacéticos, quando comparados ao grupo controle da população em geral. Verificaram ainda que este risco

aumentava com o tempo de exposição. Outro estudo epidemiológico realizado em crianças e adolescentes americanos com menos de 20 anos de idade, demonstrou a associação entre o aumento da frequência no uso doméstico de pesticidas e LNH, sem relacioná-lo a um produto ou grupo específico (BUCKLEY *et al.*, 2000). BLAIR e ZAHM (1995) revisaram a frequência das diferentes causas de morte entre agricultores observando um aumento na mesma, para a morte por leucemias, LNH, câncer de próstata, cérebro, estômago e lábios, melanoma e sarcoma de tecidos moles, enquanto houve redução nas mortes por doença cardíaca, câncer de pulmão, bexiga, fígado, cólon, esôfago, reto e rins, quando comparada ao grupo controle. Uma pesquisa realizada na Suécia por HARDEL e ERICKSON (1999) demonstrou que a exposição a herbicidas, incluindo todos os grupos químicos, aumenta o risco para LNH. O mesmo foi verificado para os fungicidas, porém, o número de indivíduos expostos aos diferentes produtos era pequeno.

As conseqüências da exposição aos pesticidas durante a gestação também foram avaliadas. Estudo retrospectivo, realizado nas Filipinas por CRISOSTOMO e MOLINA (2002), comparou mulheres residentes em áreas agrícolas, onde o uso de pesticidas ocorreu de forma tradicional (pressupõe maior exposição aos pesticidas) com mulheres na mesma situação ocupacional, porém, localizadas em áreas onde foram empregadas práticas de manejo integrado de pragas (pressupõe uma exposição em níveis mais baixos). A frequência de aborto espontâneo foi significativamente maior nas mulheres de áreas onde os pesticidas foram empregados de forma tradicional, o mesmo ocorrendo para os dados referentes aos defeitos ao nascimento. Por sua vez, RECCIO e colaboradores (2001) observaram significativa associação entre a concentração de metabólitos de organofosforados na urina, especialmente o dietilfosfato, com a frequência de aneuploidias nos núcleos de espermatozóides de agricultores mexicanos.

Devido ao importante papel que o sistema imunológico desempenha no organismo como um todo e na prevenção da instalação e desenvolvimento de neoplasias, pesquisas têm sido realizadas abordando o efeito dos agrotóxicos sobre diferentes parâmetros da imunidade. STILLER-WINKLER e colaboradores

(1999) reportaram que trabalhadores rurais expostos aos pesticidas apresentaram redução da imunidade celular e humoral, que se correlacionava com a duração da exposição. COLOSIO e colaboradores (1999) relataram desde efeitos discretos até evidentes alterações dos parâmetros imunológicos relacionados com a exposição aos pesticidas, entretanto, ainda não está claro o significado dos mesmos para o desenvolvimento de doenças.

Os efeitos do glifosato sobre a saúde humana têm sido alvo de pesquisas, algumas com resultados controversos. CRISOLIA (2002) pesquisou a formação de micronúcleos em camundongos, após duas doses de até 200 mg/kg de peso corporal da sua formulação comercial - Roundup[®] - e não obteve resultados significativos. BOLOGNESI e colaboradores (1997) obtiveram resultado positivo para o ensaio de formação de micronúcleos na medula óssea de camundongos inoculados intraperitonealmente com doses de glifosato menores que as utilizadas por KIER e colaboradores (1997), 450 e 550 mg da formulação comercial/kg peso corporal, respectivamente. Entretanto, este último obteve resultado negativo no mesmo tipo de ensaio, com a mesma espécie e via de inoculação. LIOI e colaboradores (1998a) reportaram a formação de cromossomos aberrantes em linfócitos humanos expostos ao glifosato a partir da concentração de 8 μ M, em testes realizados *in vitro* (cultura), assim como aumento da atividade da enzima G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) nestas células. Este resultado fornece uma forte indicação da indução de um estado pró-oxidante como resposta inicial da exposição ao produto, visto que a G6PD catalisa um passo limitante no shunt da hexose monofosfato além de ser necessária para manter o pool intracelular da glutathiona reduzida. Estudos dos mesmos parâmetros em linfócitos bovinos apresentaram resultados semelhantes aos anteriores, acrescentando uma significativa redução no índice mitótico não observada com as células de origem humana (LIOI *et al*, 1998b). No entanto, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994) caracteriza este herbicida como não mutagênico, não teratogênico e não carcinogênico.

Uma análise exploratória, realizada por ARBUCKLE, LIN, e MERY (2001), colheu informações de 2.110 mulheres da população agrícola de Ontário-Canadá

para avaliar o efeito da exposição aos pesticidas sobre o risco de aborto espontâneo. Foram analisadas 3.936 gestações e 395 abortos espontâneos. O período da exposição ao agrotóxico (pré-concepção ou pós-concepção) bem como o período do aborto (precoce: menos de 12 semanas de gestação; tardio: 12 a 19 semanas de gestação) foram considerados e os resultados revelaram que: o risco de aborto precoce aumentava moderadamente com a exposição pré-concepção aos herbicidas do grupo dos fenoxiacéticos e das trizinas; o risco de aborto tardio aumentava fortemente com a exposição pré-concepção ao grupo dos ditiocarbamatos e para o glifosato. Outros aspectos foram o aumento do risco com a interação entre alguns pesticidas e com a exposição aos pesticidas em gestantes com mais idade, nesta condição, especialmente com o glifosato onde o aumento do risco triplicou.

DALLEGRAVE e colaboradores (2003) realizaram estudos de teratogenicidade em ratos Wistar com o glifosato na sua formulação comercial Roundup[®], em concentrações de 500, 750 e 1000 mg/kg de peso corporal dadas no sexto e décimo quinto dia da gestação. As alterações esqueléticas significantes, observadas nos fetos, foram ossificação incompleta do crânio como um todo, dos membros e do processo de fusão dos segmentos do esterno, ossos interparietais e supraocipitais bipartidos, ausência de vértebra caudal, não ossificação das falanges nas patas traseiras. Alterações esqueléticas ocorreram em 15.4, 33.1, 42.0 e 57.3% dos controles e tratados com 500, 750 e 1000 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

O efeito do glifosato sobre a atividade de enzimas foi avaliado em estudos *in vivo* e *in vitro*. DARUICH, ZURULMIK e GIMENEZ (2001) avaliaram a atividade da isocitrato desidrogenase (ICD), G6PD e malato desidrogenase (MD), enzimas com função na geração de NADPH. Os órgãos analisados foram o fígado, coração e cérebro das ratas prenhas e de seus fetos. Os resultados demonstraram várias alterações, desde inibições significantes até elevações significantes da atividade para as diferentes enzimas e para a mesma enzima, dependendo da dose e/ou do tecido analisado. EL-DEMERDASH, YOUSEF e ELAGAMY (2001) estudaram *in vitro* o efeito do glifosato sobre a atividade das

enzimas acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e fosfatase ácida (AcP) em amostras de soro obtido de doadores clinicamente saudáveis. Foram utilizadas dez concentrações numa faixa de 5 a 2000 mM do glifosato, o qual foi efetivo para todas as enzimas, exceto para a AcP, demonstrando a toxicidade do mesmo nas condições testadas. As concentrações que inibiram 50% da atividade enzimática após incubação de 1 h a 37 °C (IC_{50}) foram 714, 750, 54, 270, 71 mM para a AChE, LDH, AST, ALT e ALP, respectivamente.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* foram realizados para avaliar os efeitos da exposição ao glifosato sobre o sistema imune. EL-GENDY, ALY e EL-SEBAE (1998) expuseram peixes (*Tilapia nilótica*) ao glifosato numa concentração de 1/1000 da recomendada para uso em plantações, por um período de 1 a 96 h. As respostas imunes celular e humoral foram avaliadas e os resultados demonstraram reduções significantes em ambas. A resposta imune celular foi significativamente reduzida em todos os períodos de exposição e frente a todos os mitógenos testados, fitohemaglutinina, concanavalina A e lipopolissacarídeo, sendo que os maiores índices foram alcançados após 4 semanas. Entretanto, a produção de anticorpos por células esplênicas de camundongos expostos ao glifosato não apresentou diferenças significantes mesmo em doses até 75 vezes maiores do que as que poderiam ser encontradas em pastagens sob condições normais de aplicação (BLAKLEY, 1997).

O ciclo celular também tem sido objeto de pesquisa com o glifosato. MARC e colaboradores (2002) utilizaram um modelo universal de estudo da regulação do ciclo celular para pesquisar a interferência do glifosato (Roundup®). Os resultados obtidos demonstraram que este produto interfere no ciclo celular retardando a ativação do complexo regulador, o CDK1/ciclina B. Considerando a universalidade do complexo regulador CDK1/ciclina B entre as espécies, a segurança deste herbicida para a saúde humana é passível de questionamento.

4 METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA

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

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com idade entre dois e três meses, provenientes do biotério central da UFSC e mantidos, até o final dos experimentos, no biotério setorial do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, num ciclo claro/escuro de 12 h (das 6:00 as 18:00 h no horário solar), em ambiente climatizado com temperatura de $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Os animais tiveram livre acesso à água e alimentação.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram pesados antes do início do experimento e distribuídos em quatro grupos: controle, diluição 1/1000 (4,87 mg/Kg de peso corporal), 1/100 (48,7 mg/Kg de peso corporal) e 1/10 (487 mg/Kg de peso corporal) da DL₅₀ do glifosato (glifosato Biocarb, São José dos Pinhais-PR), por Kg de peso corporal. Segundo LARINI (1999), a DL₅₀ oral para o glifosato, em ratos, é de 4.870 mg/Kg de peso corporal. O produto em estudo foi diluído em água destilada imediatamente antes de cada inoculação, de forma a obter a concentração em mg por quilograma de peso corporal, equivalente à diluição da DL₅₀ do produto para cada grupo. O grupo controle foi inoculado com água destilada.

A inoculação foi realizada por via oral, utilizando-se uma seringa de insulina acoplada a uma cânula para inoculação oral. O volume inoculado foi de 0,5 mL e o intervalo entre as inoculações foi de 48 (quarenta e oito) horas, por um período de 75 (setenta e cinco) dias, com a finalidade de obter exposição crônica. No septuagésimo sexto dia foi realizada a pesagem dos animais e foram obtidas as amostras biológicas.

4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A coleta das amostras biológicas foi procedida no septuagésimo sexto dia após o início da inoculação e obtidas de pelo menos dois experimentos independentes, exceto as destinadas às análises histológicas. Cada experimento independente foi composto por um grupo controle e três experimentais conforme descrito no item 4.3.

4.4.1 Sangue total e soro

Os animais foram anestesiados com éter etílico, em câmara de eterização e a seguir foi realizada a punção cardíaca percutânea. O sangue coletado (7 – 10 mL) foi distribuído em tubos contendo EDTA tripotássico (etilenodiaminotetracetato de potássio) na concentração final de 1,8 mg/mL e tubos secos, para sangue total e soro, respectivamente. A alíquota de sangue total destinada ao hemograma foi mantida sob refrigeração (4 a 8^o C) até ser analisada. O soro foi obtido por centrifugação do sangue total, após coagulação (30 min a 37^o C), a 1000 x g por 10 minutos (HENRY, 1999) e armazenado em freezer a -20^o C até ser analisado.

4.4.2 Fígado

O fígado foi obtido após sacrifício dos animais, conforme item anterior (4.3.2). Para a análise histológica foi removida uma fatia de aproximadamente 0,5 cm de espessura, que foi imediatamente imersa em solução fixadora de formol tamponado

10%, pH 7,2, em um volume dez vezes superior ao da peça a fixar, por um período de 24 horas. Após a fixação, as peças foram transferidas para álcool 70⁰ GL e posteriormente desidratadas, diafanizadas e impregnadas com parafina em histotécnico marca Leica, modelo TP1020 e, então, inclusas em parafina em inclusor marca Leica, modelo EG1160. Posteriormente foram realizados cortes de 2 µm de espessura em micrótomo marca Leica, modelo RM2045 e corados pela hematoxilina e eosina (H/E) e impregnação com sais de prata para a reticulina (BEÇAK E PAULETE,1976, com modificações).

4.4.3 Medula óssea

Os animais anestesiados, após a coleta do sangue (item 4.31), foram sacrificados por decaptação e em seguida foi procedida a remoção de ambos os fêmures, para obtenção da medula óssea. Para as análises histológicas foi separada uma porção medial do fêmur medindo 0,5 cm a 1,0 cm de comprimento, que foi imediatamente imersa em solução fixadora de formol tamponado 10%, pH 7,2, em um volume dez vezes superior ao da peça a fixar, por um período de 18 horas. Após a fixação, as peças foram submetidas à descalcificação ácida (ácido clorídrico-EDTA) por 2,5 a 3 horas e lavadas em água corrente por 1 hora. Subseqüentemente as peças foram transferidas para álcool 70⁰ GL, desidratadas, diafanizadas e impregnadas com parafina em histotécnico marca Leica, modelo TP1020 e, então, inclusas em parafina em inclusor marca Leica, modelo EG1160. Posteriormente foram realizados cortes de 2 µm de espessura em micrótomo marca Leica, modelo RM2045 e corados pela hematoxilina e eosina (BEÇAK E PAULETE,1976, com modificações).

4.4.4 Linfócitos do sangue periférico

Os linfócitos, provenientes do sangue periférico obtido conforme descrito no item 4.4.1, foram separados em gradiente de concentração com produto “histopaque[®]-1077” (solução de polisucrose e diatrizoato de sódio com densidade de 1.077 ± 0.001 g/mL, SIGMA[®], ST Louis) seguindo as instruções contidas na bula do mesmo. Os linfócitos assim obtidos foram utilizados para marcação com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, produzidos em camundongo e conjugados com isotiocianato de fluoresceína (PharMingen, nº de catálogo 554843-anti-CD4 e nº 554856-anti-CD8) e posterior contagem dos mesmos em citômetro de fluxo marca Becton Dickinson, modelo FACS Calibur.

4.4.5 Linfócitos dos linfonodos

Após a coleta do sangue, como descrita anteriormente, os animais foram sacrificados por decapitação e em seguida foram procedidas a remoção cirúrgica bilateral dos linfonodos da região inguinal e a pesagem dos mesmos. Posteriormente o linfonodo foi macerado, individualmente, por atrito com pistilo em gral contendo 1 mL de solução de PBS 1X/EDTA , pH 7,2. A suspensão celular obtida foi lavada 3 vezes nesta solução, por centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos e o pellet obtido foi ressuspenso em PBS 1X/EDTA, pH 7,2 Estas células foram contadas em câmara de Neubauer e posteriormente utilizadas para as marcações com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8.

4.5 ENSAIO/ANÁLISE DAS AMOSTRAS

4.5.1 Hemograma

O hemograma foi realizado em equipamento automatizado marca SEAC, modelo H20 Genius, utilizando o princípio de impedância elétrica, num período não superior

a 8 horas após a coleta e fornecendo os seguintes dados: eritrócitos (número/ μL), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (fL), hemoglobina corpuscular média (pg), concentração hemoglobínica corpuscular média (%), amplitude de distribuição dos eritrócitos (%), leucócitos totais (número/ μL), contagem diferencial de leucócitos em três populações (linfócitos, monócitos e granulócitos) e plaquetas (número/ μL). Para a contagem diferencial de leucócitos as barras divisórias das três janelas de impedância para as populações foram ajustadas a fim de evitar erros na distribuição das diferentes populações.

4.5.2 Determinação da concentração sérica da uréia

A determinação da concentração sérica da uréia foi realizada com a finalidade de avaliar uma possível hemoconcentração que possa comprometer os dados obtidos do sangue periférico. As dosagens foram realizadas em duplicata, com equipamento automatizado, marca Ciba Corning, modelo Express Plus, por metodologia cinética UV utilizando-se conjuntos diagnósticos da marca Labtest Diagnóstica (Minas Gerais).

4.5.3 Avaliação da função hepática

Com a finalidade de avaliar o comprometimento da função hepática (toxicidade dos produtos utilizados) foram medidas as atividades, a nível sérico, das enzimas AST (EC.2.6.1.1) e ALT (EC.2.6.1.2). As medidas foram realizadas em duplicata, com equipamento automatizado, marca Ciba Corning, modelo Express Plus, por metodologia cinética UV, utilizando-se conjuntos diagnósticos da marca Biotécnica.

4.5.4 Análises histológicas

As amostras hepáticas e de medula óssea, coletadas e processadas para avaliação histológica, como descrito anteriormente, foram analisadas por microscopia de luz, com o objetivo de se confrontar estes dados com os bioquímicos (enzimas hepáticas) e os hematológicos periféricos (hemograma). As imagens foram geradas em microscópio marca Nikon, modelo Labophot, e captadas com videocâmara marca Hitachi, modelo VK-C150 e software Image Pro Plus 4.0.

4.5.5 Contagem e relação dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, no sangue periférico e linfonodos

Para a contagem das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico e dos linfonodos, os linfócitos obtidos conforme descrito no item 4.4.4 e 4.4.5, foram marcados com anticorpos monoclonais anti-rato CD4 e CD8, conforme segue: as células (sangue periférico ou linfonodo) foram ressuspensas em solução PBS/EDTA/SBA/azida e ajustado o nº para 5×10^6 /mL. Para cada tubo (CD4 e CD8) foram transferidos 50 µL da suspensão de células acrescidos de 50 µL (0,35 µg) do anticorpo correspondente e incubados sob proteção da luz, a 4° C por 60 min. Após, foram lavadas 3 vezes (200 µL de PBS 1X + centrifugação a 350 x g por 8 min), ressuspensas em 500 µL de solução PBS/paraformaldeído (400 µL de PBS 1X + 100 µL de paraformaldeído 4%) e analisadas por um período de 30 s. Para cada anticorpo (CD4 ou CD8) e tipo de amostra (sangue ou linfonodo) foi incluído um controle negativo executado sob as mesmas condições, exceto a substituição do anticorpo por igual volume de PBS 1X. A quantidade de anticorpo (0,35 µg) foi previamente titulada utilizando-se uma série de diluições correspondentes a 0,25 µg, 0,35 µg, 0,50 µg, 0,75 µg e 1,0 µg do mesmo por tubo a ser analisado. Os valores de CD4⁺ e CD8⁺ por µL de sangue periférico foram calculados a partir do valor percentual das subpopulações na citometria de fluxo e dos valores absolutos dos linfócitos por µL, obtidos nos respectivos animais no sangue periférico. A razão CD4⁺/CD8⁺ foi calculada a partir dos valores percentuais obtidos para cada amostra.

Os resultados referentes às análises das subpopulações de CD4⁺ e CD8⁺ foram utilizados como parâmetro para avaliação da imunidade.

4.5.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se o programa GraphPad Prism 3. A significância dos mesmos foi verificada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney e a análise de variância de uma via de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 REDUÇÃO NO GANHO DE PESO

Os animais tratados com o glifosato e os controles foram submetidos às mesmas condições de confinamento e manipulação de forma a minimizar fatores tais como os níveis de estresse que pudessem interferir nos dados a serem obtidos.

Os grupos de animais tratados com o glifosato apresentaram uma redução no ganho de peso de 30,7 %, 50,2% e 53,3%, respectivamente para as diluições de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto, em comparação com o ganho de peso dos animais controles, durante o período de tratamento (Figura 4).

A inoculação via oral evitou a interferência direta do produto na palatabilidade da água ou alimentos, fato que poderia gerar redução no consumo destes com reflexos no ganho de peso.

DARUICH, ZURULMIK e GIMENEZ (2001) observaram redução no ganho de peso de 12,3% e 42,6% em ratas Wistar prenhas tratadas por 21 dias com solução na concentração final de 0,5 % e 1% na água, respectivamente, da formulação comercial Herbicygon. Os autores observaram redução significativa na ingestão de água e alimentos, sugerindo que a redução na ingestão de água pode ser devida a palatabilidade da mesma. Entretanto, os dados fornecidos no

trabalho não permitem estabelecer uma equivalência com a dose em mg/kg peso corporal. CHAN e MAHLER (1992) obtiveram redução de 6% e 18% no ganho de peso após tratamento por 13 semanas com 25.000 ppm e 50.000 ppm (equivalente a 1.583 e 3.166 mg/kg de peso, respectivamente) na dieta com glifosato puro, não observando redução na ingestão de alimentos.

Outros aspectos que podem estar relacionados à redução no ganho de peso de animais tratados com glifosato são as alterações na fosforilação oxidativa por desacoplamento na cadeia, assim como a redução na produção de energia dependente da reação da transhidrogenase a qual é necessária para a utilização do NADPH citoplasmático, ambas observadas em mitocôndrias intactas obtidas de fígado de rato (OLORUNSOGO, 1982). Diferenças no delineamento experimental como a idade dos animais, o sexo, o tratamento com glifosato tecnicamente puro ou com formulação comercial, dificultam comparações quantitativas no ganho de peso entre os trabalhos realizados. No que tange aos produtos utilizados nos tratamentos, as formulações comerciais podem incluir diversos outros ingredientes denominados de inertes, não descritos, como a substância surfactante polioxietilenoamina (POEA). Este surfactante tem sido implicado na redução do ganho de peso em trabalhos realizados pela própria empresa que patenteou o glifosato, porém os dados não foram publicados (STOUT, 1990, citado por WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

Portanto a redução no ganho de peso, quer com a formulação comercial ou com o glifosato puro sugerem que este produto pode induzir modificações no metabolismo oxidativo.

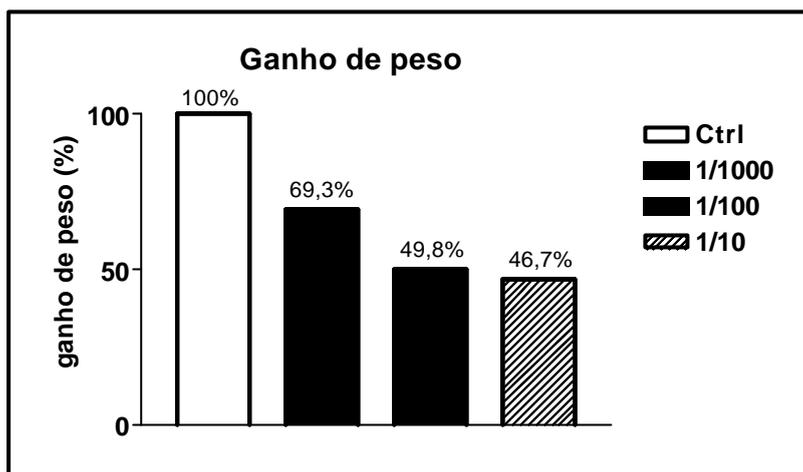
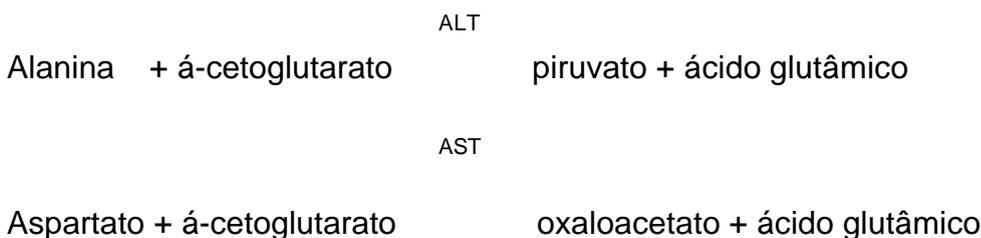


Figura 4. Ganho de peso dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados, por via oral, com doses da formulação comercial do glifosato Biocarb equivalentes a 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL_{50} do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. O ganho de peso dos animais controles foi arbitrado em 100%. O número de animais em cada grupo foi de 15 para o controle e diluições da DL_{50} do glifosato de 1/1000 e 1/100 e de 14 para a diluição 1/10, em três experimentos independentes.

5.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA

As enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase catalisam a transferência reversível do grupo amino do aminoácido para o á-cetoglutarato, formando ácido glutâmico e piruvato ou oxaloacetato.



Estas reações exercem papel central na síntese e degradação de aminoácidos além de atuarem como ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos (MOTTA, 2003).

A ALT encontra-se majoritariamente no tecido hepático embora quantidades significativas podem estar presentes no tecido renal. Sua localização no hepatócito é predominantemente citoplasmática. A distribuição da AST no

organismo é mais ampla encontrando-se em quantidades maiores no tecido cardíaco, muscular esquelético e hepático, e em pequenas quantidades no tecido renal, pancreático, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos. No hepatócito localiza-se predominantemente nas mitocôndrias. Agressões ao tecido hepático causadas por vírus, fármacos, produtos químicos e infiltrações neoplásicas podem ocasionar a liberação destas enzimas para a corrente sangüínea (PINCUS; SCHAFFNER, 1999).

5.2.1 Medida da atividade sérica da alanina aminotransferase

Os animais tratados com glifosato demonstraram elevação significativa dos níveis séricos da ALT em todas as concentrações utilizadas quando comparados aos controles (Tabela 4 e Figura 5). Não houve diferença significativa entre os valores médios da atividade enzimática quando comparados os grupos tratados entre si.

Aumentos significativos nos valores séricos da ALT e da ALP foram observados por CHAN e MAHLER (1992) em ratos que receberam glifosato tecnicamente puro na alimentação, por 13 semanas, em doses 12.500, 25.000 e 50.000 ppm. Os autores consideraram as alterações compatíveis com hepatotoxicidade leve.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição ao glifosato pode ter lesado a membrana citoplasmática ocasionando o extravasamento da ALT para o sangue, elevando seus níveis séricos. A elevação evidenciou um perfil crescente com o aumento da dose, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados.

Tabela 4. Dados referentes à medida da atividade sérica da ALT no grupo controle e nos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ± epm U/L	Mínimo U/L	Máximo U/L
Controle	16	28,5 ±1,81	20	45
1/1000	13	45,5 ±6,7*	18	98
1/100	14	47,9 ±6,1*	20	86
1/10	13	55 ±6,8**	20	96

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Newman-Keuls: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

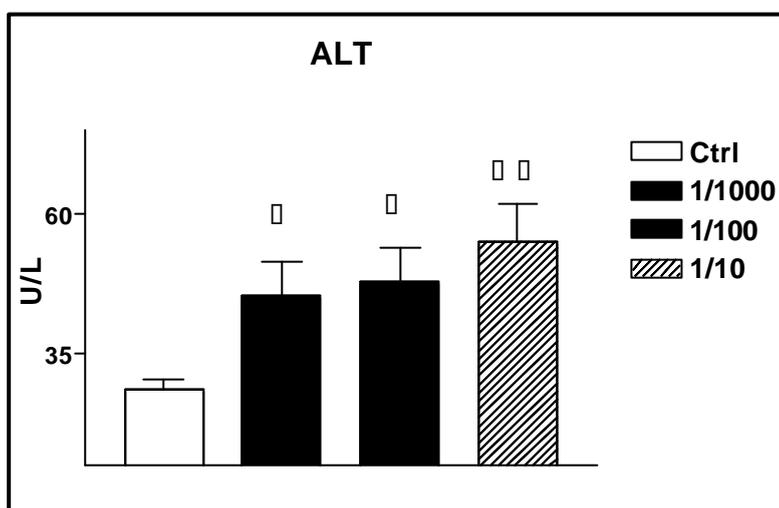


Figura 5. Atividade sérica da ALT no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Newman-Keuls: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

Foi demonstrado que o glifosato pode inibir a atividade da ALT e da AST, em experimentos *in vitro* (EL-DEMERDASH; YUSEF; ELAGAMY, 2001). Portanto, é possível que em nosso experimento, principalmente nas doses mais altas, o glifosato tenha exercido atividade inibitória subestimando os reais valores séricos da atividade da ALT. Porém, além de outros aspectos metodológicos, não foram determinadas as concentrações sanguíneas do glifosato nas amostras analisadas para a atividade enzimática, de forma que não podem ser estabelecidas inferências neste sentido.

5.2.2 Medida da atividade sérica da aspartato aminotransferase

Os valores médios séricos da atividade da AST foram significativamente maiores nos animais tratados com glifosato nas diluições 1/100 e 1/10 da DL₅₀, que nos animais controles (Tabela 5 e Figura 6). Não houve diferença significativa nos valores médios da atividade da AST entre o grupo tratado com diluição 1/1000 e o grupo controle.

O glifosato demonstrou potencial hepatotóxico na exposição com doses de 1/100 e 1/10 da DL₅₀. Os resultados obtidos para esta enzima sugerem a necessidade de uma dose maior ou por um período mais prolongado, para a liberação da mesma em quantidades significantes para o sangue quando comparada a ALT. Embora a concentração hepática da AST seja aproximadamente o dobro da concentração da ALT, tal condição pode estar relacionada ao fato de que, no hepatócito, 80% da AST está localizada nas mitocôndrias (MOTTA, 2003) necessitando o comprometimento da membrana desta organela, um dano mais profundo, para um extravasamento mais pronunciado da mesma para o sangue. Por outro lado o seu reduzido conteúdo citosólico também poderia requerer um dano, quando este estiver relacionado à membrana citoplasmática, a um número mais elevado de hepatócitos (dano mais extenso) para que houvesse elevação significativa na sua medida da atividade sérica. Pode-se então inferir que a ALT demonstrou ser um marcador mais sensível do que a AST para detectar um possível efeito hepatotóxico do glifosato. Este aspecto pode ser reforçado ao efetuar-se a relação AST/ALT. Esta relação demonstrou ser menor nos animais que receberam tratamento com o glifosato quando comparada com a relação obtida para o grupo controle, indicando que, proporcionalmente, a ALT demonstrou maior elevação sérica que a AST (Tabelas 4 e 5). As observações realizadas para a ALT, quanto a possibilidade teórica de subestimação dos valores séricos por inibição da atividade da enzima *in vitro* pelo glifosato, também podem ser aplicadas a AST.

Tabela 5. Dados referentes à medida da atividade sérica da AST no grupo controle e nos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ± epm U/L	Mínimo U/L	Máximo U/L
Controle	15	84,3 ±4,67	60	122
1/1000	14	101,8 ±6,77	70	143
1/100	14	112,9 ±10,7*	66	196
1/10	13	124,8 ±8,56**	69	174

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Newman-Keuls: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

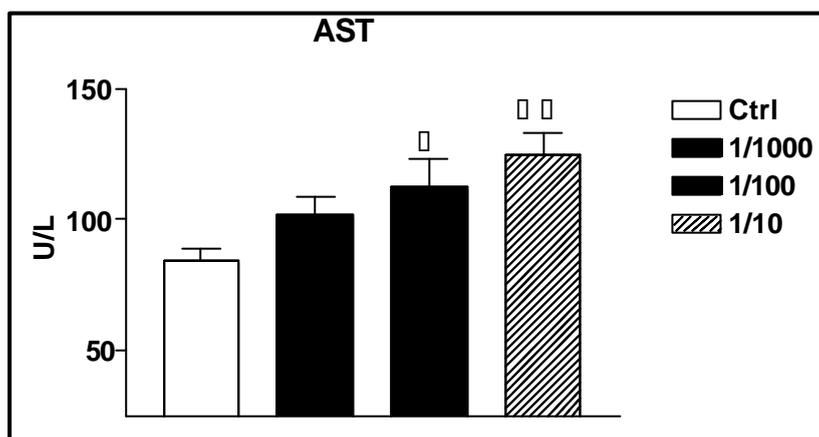


Figura 6. Atividade sérica da AST no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Newman-Keuls: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO FÍGADO

O fígado é o principal órgão do corpo humano no que tange ao metabolismo e a detoxicação de substâncias químicas de origem farmacêutica ou ambiental, estando sujeito a um dano potencial induzido pelas mesmas. Esta lesão pode resultar da toxicidade direta, da conversão hepática de um xenobiótico

em uma toxina ativa ou por mecanismos imunes relacionados à substância envolvida. A lesão hepática pode ocorrer imediatamente ou no transcorrer de semanas ou meses, assim como as suas manifestações podem surgir somente após a instalação de um dano grave ao órgão (GHANY; HOOFNAGLE, 2002).

Independente do tipo de agressão o fígado pode manifestar cinco reações gerais: degeneração; necrose; inflamação; regeneração e fibrose. A necrose pode ser causada por qualquer insulto significativo ao tecido hepático, normalmente antecedida pela degeneração do hepatócito. A inflamação pode ser secundária à necrose hepato-celular ou resultar do ataque de linfócitos à hepatócitos viáveis que expressem antígenos reconhecidos pelos mesmos. A regeneração ocorre após necrose hepato-celular e mesmo quando esta é maciça, se mantido intacto o arcabouço do tecido, a recuperação é praticamente completa. A formação de tecido fibroso (fibrose) ocorre em resposta à inflamação ou a uma agressão tóxica direta ao fígado (CRAWFORD, 1996).

Em condições fisiológicas a rede de colágeno entre os hepatócitos é constituída por delicados cordões de colágeno tipo IV enquanto os colágenos tipo I e III estão concentrados nos espaços porta. Durante um processo inflamatório, mediadores deste como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), TNF- β e IL-1 podem servir de estímulo para a transformação das células de Ito, que normalmente funcionam como depósitos de vitamina A, em células semelhantes aos fibroblastos, produtoras de colágeno tipo I e III, o qual se deposita em todas as porções do lóbulo hepático. Entretanto fatores liberados pelas células de Kupffer e principalmente estímulos tóxicos, também podem induzir esta transformação na ausência de atividade inflamatória e sem que seja necessária necrose hepatocelular (GAYOTTO; VIANNA, 1999).

A deposição excessiva de colágeno (fibrose) gera alterações no fluxo sangüíneo e na difusão de solutos entre os hepatócitos e o plasma. Há perda das fenestrações das células endoteliais dos capilares sinusóides o que afeta ainda mais o movimento de proteínas como a albumina, fatores de coagulação e lipoproteínas entre os hepatócitos e o plasma (CRAWFORD, 1996).

Estudo realizado pela empresa Monsanto (MONSANTO, 1987, dados não publicados, apud WHO, 1994) em ratos tratados com 1.000, 5.000 e 20.000 mg de glifosato puro por kg de alimento, durante 13 semanas, não demonstrou alterações no tecido hepático após estudos histopatológicos limitados.

Hipertrofia e necrose dos hepatócitos da região centrolobular foi observada em camundongos após tratamento com glifosato puro, por 24 meses na concentração de 30.000 mg/kg de alimentos (BIO/DYNAMICS INC., 1983, dados não publicados, apud WHO, 1994).

No presente estudo não foram observadas alterações morfológicas nos cortes de tecido hepático corados pela H/E que indicassem degeneração e/ou necrose dos hepatócitos (Figuras 7 e 8). Isto sugere que a medida sérica das enzimas ALT e AST foram marcadores mais precoces da agressão ao hepatócito pelo glifosato, antecedendo a demonstração de alterações morfológicas no mesmo por meio do estudo histológico de preparações coradas pela H/E. No entanto foi observado aumento aparente do tecido conjuntivo e no número de células de Kupffer nos animais tratados com o glifosato na diluição 1/10 da DL₅₀ (Figuras 9 e 10). Tal observação foi reforçada pela análise de cortes corados para reticulina pela técnica de impregnação com prata, os quais evidenciaram um incremento no número e espessura destas fibras. Sabe-se que as fibras de reticulina são constituídas, primariamente, por colágeno tipo III (FAKOYA, 2002), sugerindo que o fígado pode ter respondido com fibrose discreta ao tratamento com glifosato nesta concentração (Figuras 11 e 12).

Entretanto faz-se necessário um estudo mais específico com técnicas que possam quantificar estas observações como a marcação com lisozima para as células de Kupffer e posterior contagem das mesmas nos cortes do tecido.

Junto com a medida da atividade sérica da AST e ALT, os estudos histológicos indicam que a exposição crônica ao glifosato apresentou potencial hepatotóxico evidenciando fibrose discreta no grupo tratado com a diluição de 1/10 da DL₅₀.

5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA

A observação de cortes histológicos da medula óssea tem por finalidade principal avaliar semiquantitativamente a celularidade global e a arquitetura da mesma. Esta observação pode revelar hipoplasia, hiperplasia ou aplasia medular, lesões granulomatosas, fibrose, esclerose, necrose e infiltrações neoplásicas (FOUCAR, 2001). Embora esfregaços corados de aspirados medulares sejam mais adequados para avaliar detalhes morfológicos e a relação da celularidade entre as diferentes linhagens do tecido hematopoiético a observação microscópica de cortes histológicos também pode fornecer uma visão aproximada destas (ROTHSTEIN, 1998).

Na análise em microscopia de luz dos cortes de medula óssea corados pela H/E não foram observadas alterações representativas de comprometimento desta nos animais tratados com o glifosato para as concentrações utilizadas neste estudo (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Na literatura revisada não foram encontrados estudos abordando a exposição ao glifosato e aspectos histológicos da medula óssea.

A não observação de modificações no tecido hematopoiético que refletissem as alterações observadas no sangue periférico, descritas adiante, pode ser devido ao fato de que estas não sejam de magnitude que implicassem em alterações no órgão formador, detectáveis pela observação histológica de cortes do tecido corado pela H/E. No entanto o emprego de técnicas que permitam avaliações quantitativas como a marcação de linhagens celulares por imunohistoquímica e posterior contagem, quantificação de proteínas da matriz extracelular e de citocinas, cultivos primários do tecido hematopoiético e a expressão gênica por

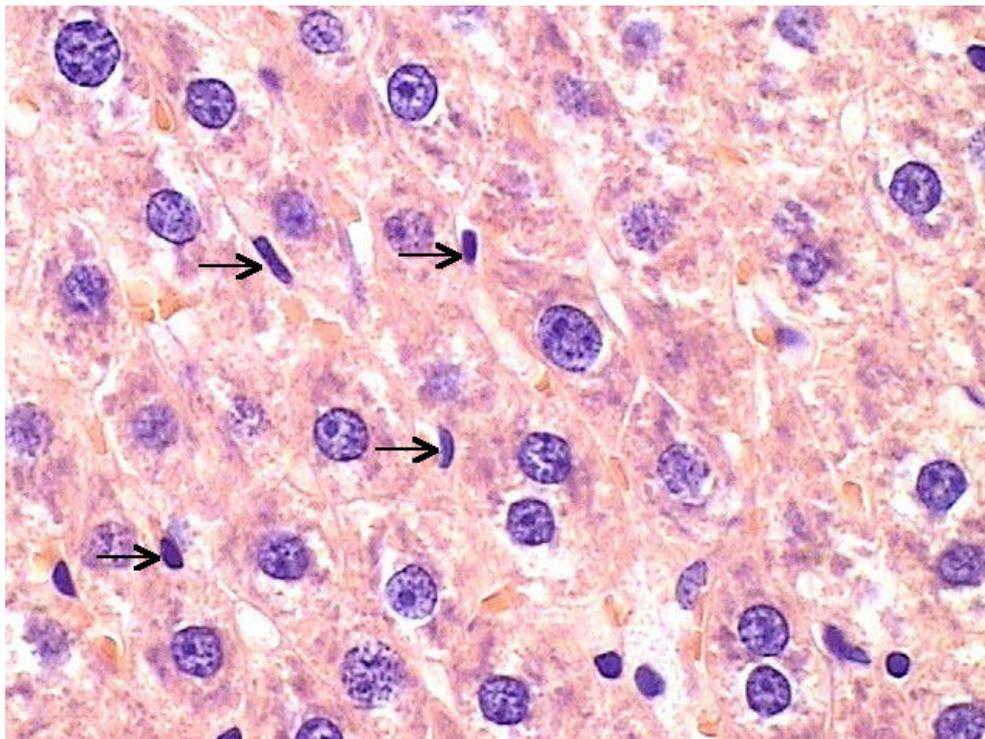


Figura 7. Corte histológico de fígado de rato controle. As setas indicam algumas células de Kupffer (H/E, aumento de 400x).

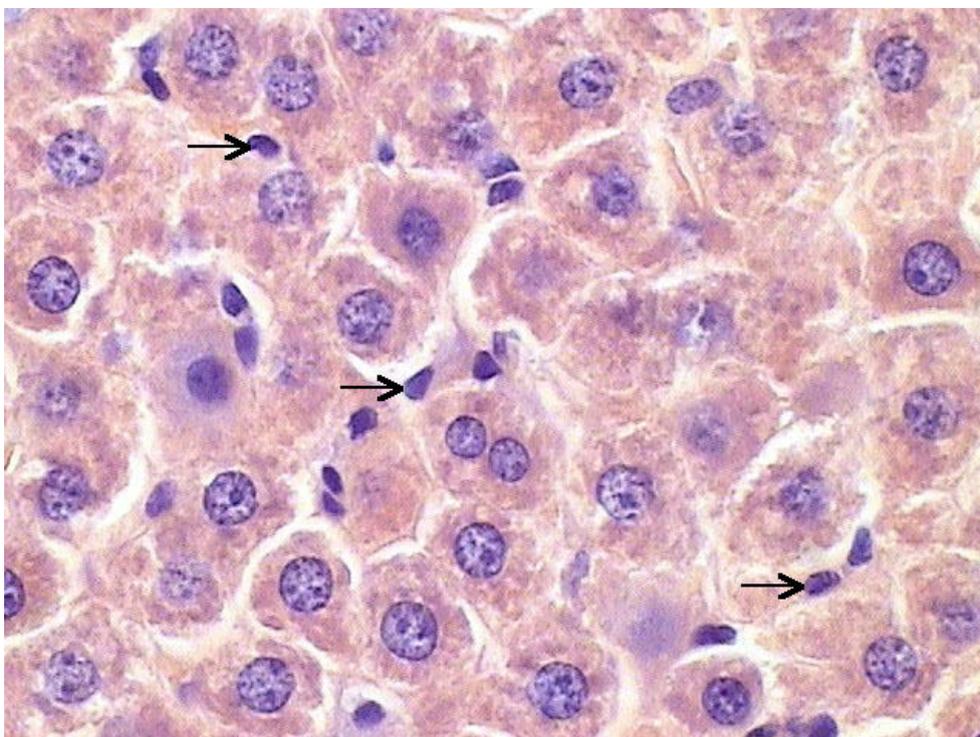


Figura 8. Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato 1/10 da DL₅₀, sugestivo de aumento do número de células de Kupffer. As setas indicam algumas células de Kupffer (H/E, aumento de 400x).

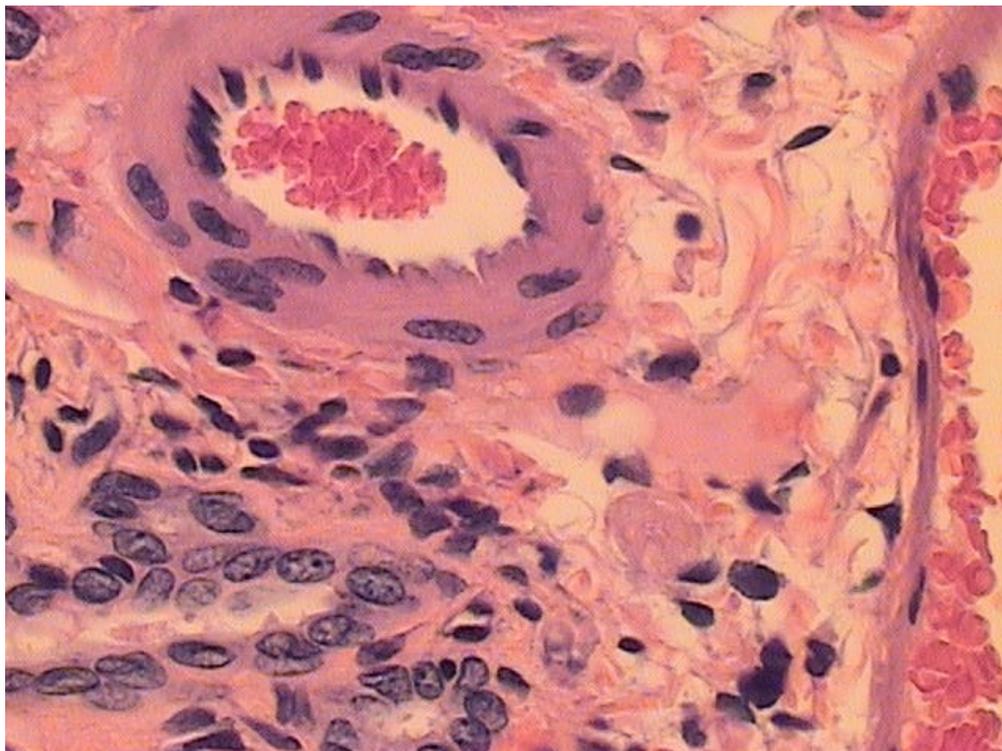


Figura 9. Corte histológico de fígado de rato controle na região do espaço porta (H/E, aumento de 400x).

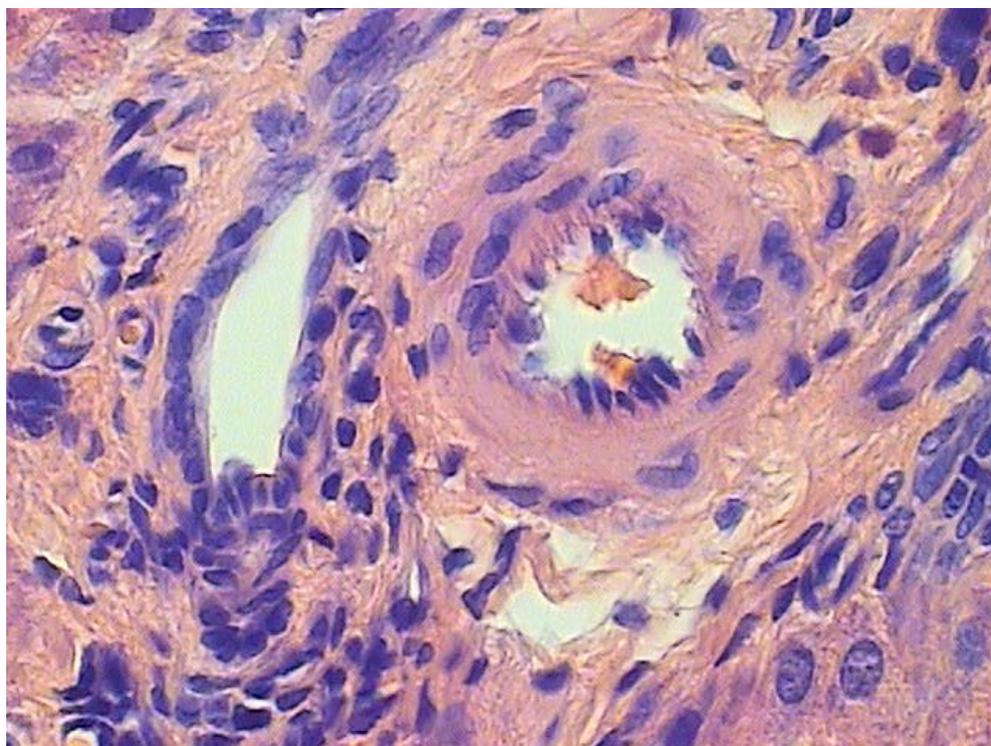


Figura 10. Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato com dose de 1/10 da DL_{50} , sugestivo de aumento do tecido conjuntivo na região do espaço porta (H/E, aumento de 400x).

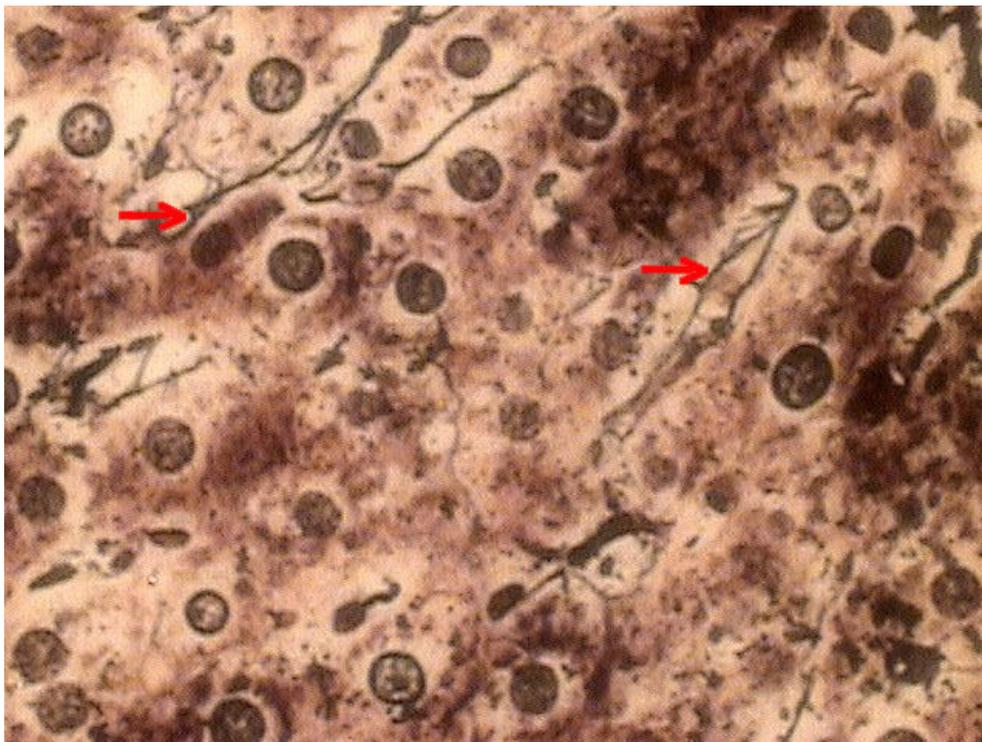


Figura 11. Corte histológico de fígado de rato controle. As setas indicam algumas fibras de reticulina (Coloração para reticulina, aumento de 400x).

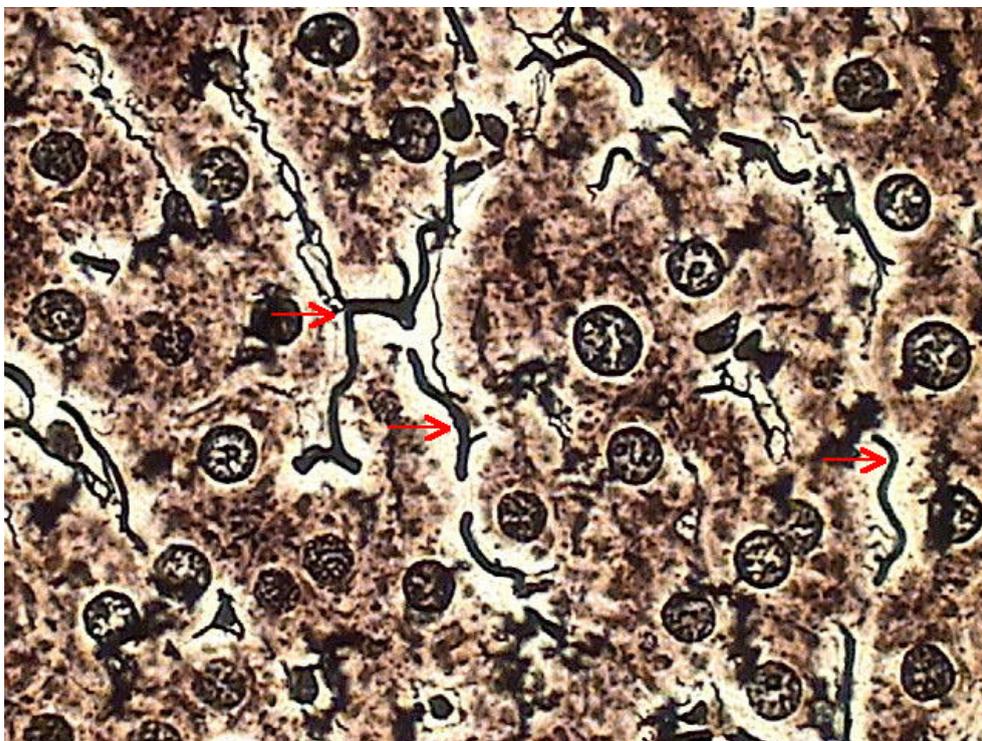


Figura 12. Corte histológico de fígado de rato tratado com glifosato 1/10 da DL₅₀, sugestivo de incremento no número e espessura de fibras de reticulina. As setas indicam algumas fibras de reticulina (Coloração para reticulina, aumento de 400x).

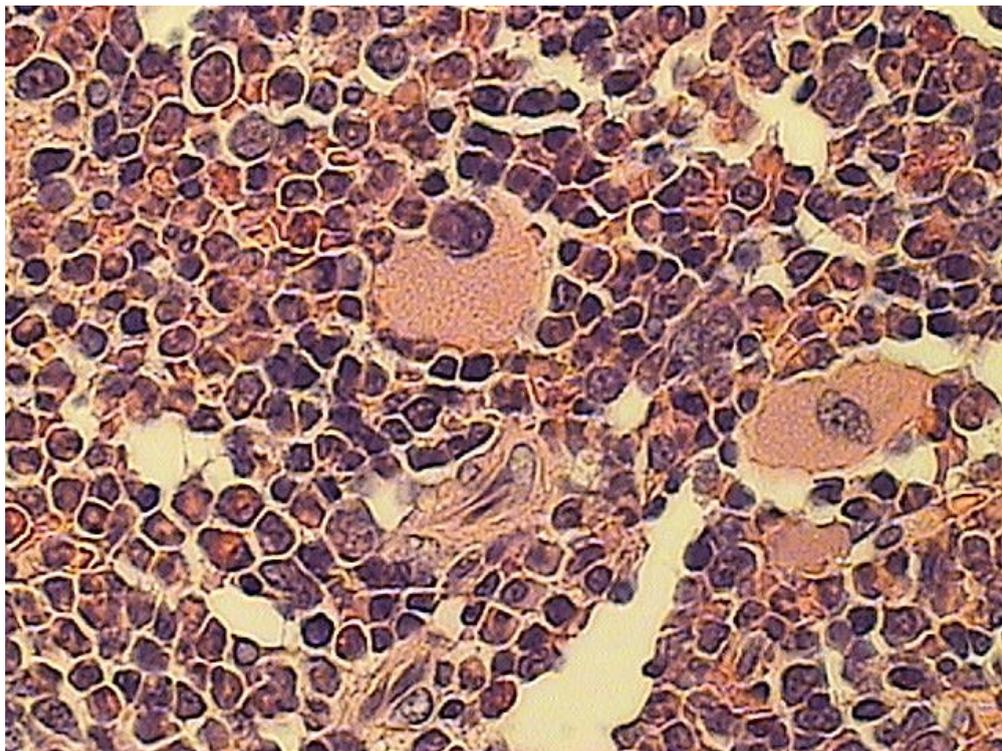


Figura 13. Corte histológico de medula óssea de rato controle (H/E, aumento de 400x).

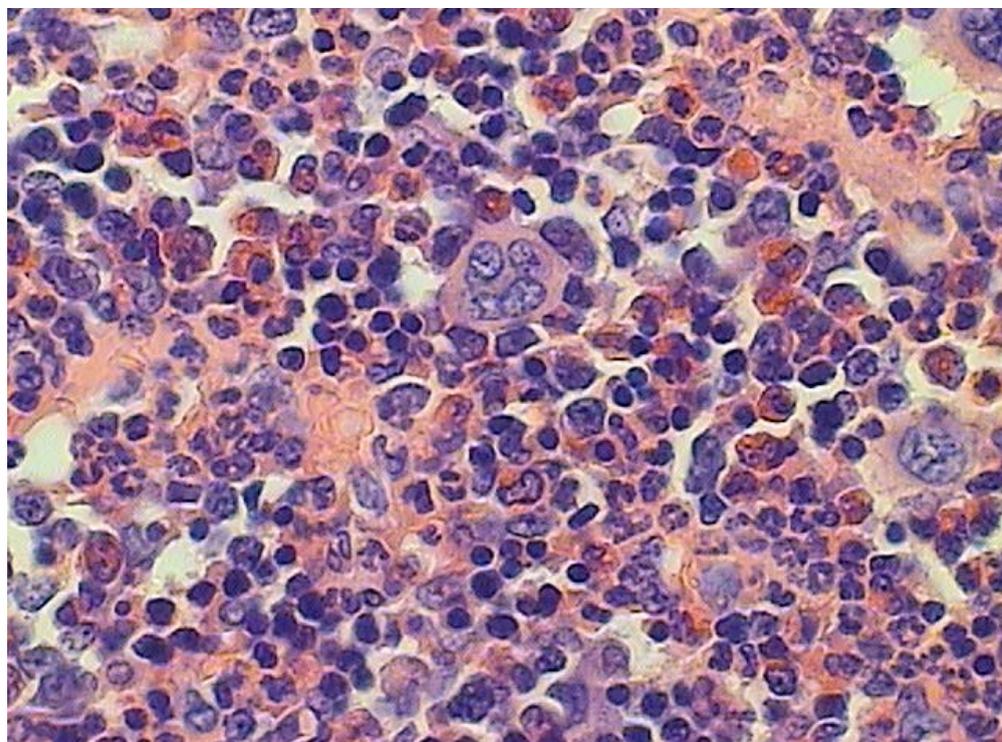


Figura 14. Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/1000 da DL_{50} , com padrão de normalidade (H/E, aumento de 400x).

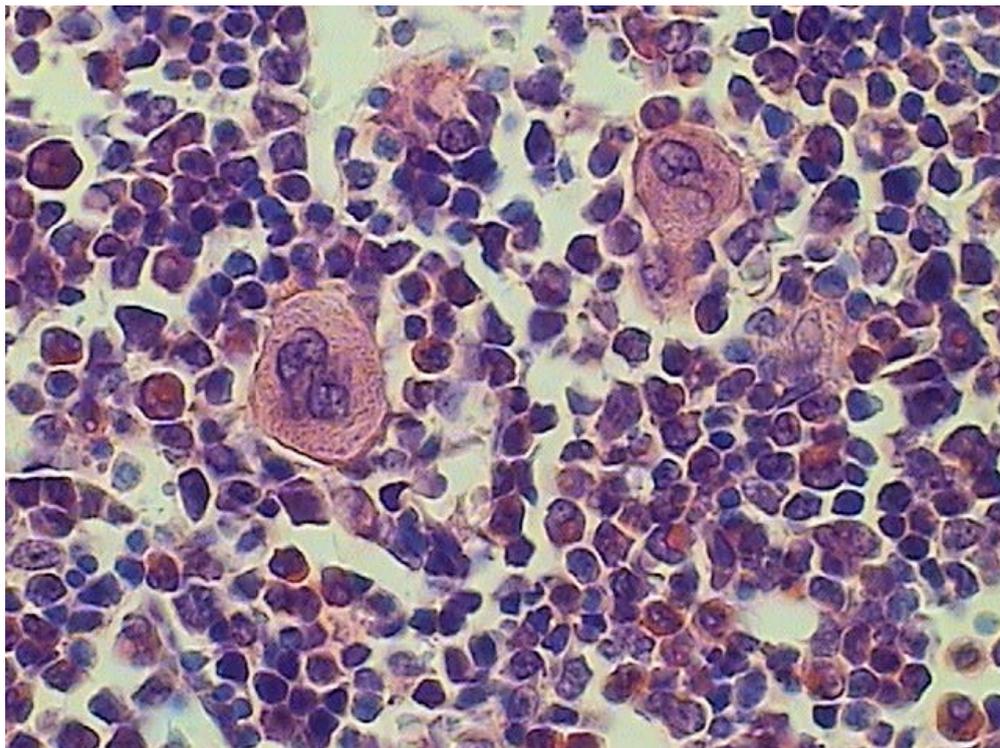


Figura 15. Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/100 da DL_{50} , com padrão de normalidade (H/E, aumento de 400x).

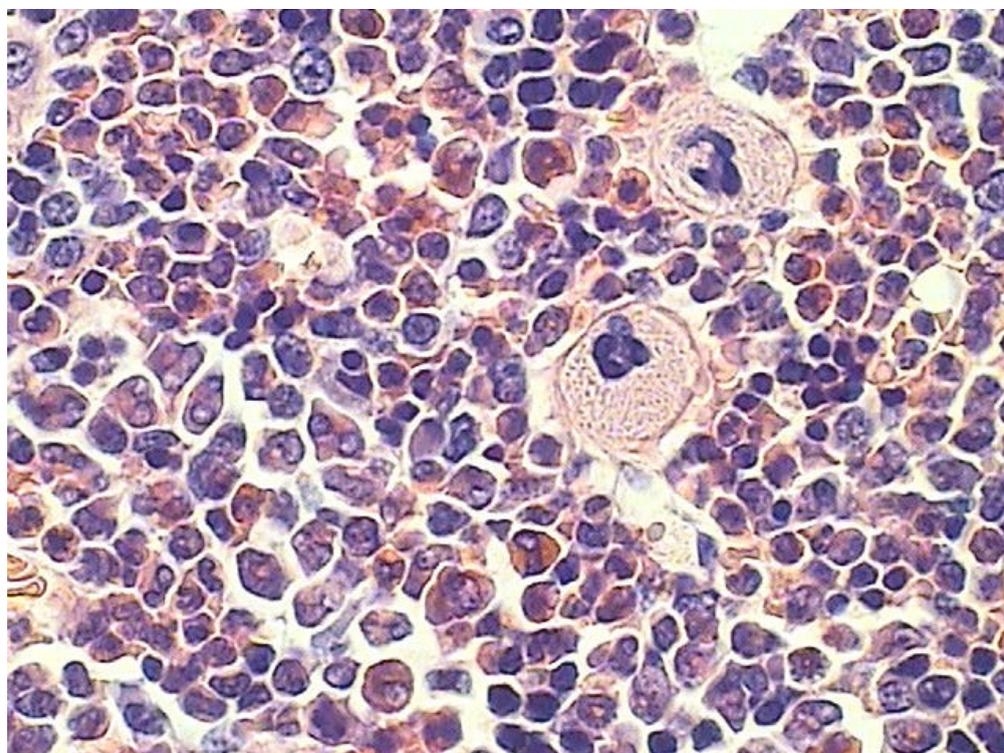


Figura 16. Corte histológico de medula óssea de rato tratado com glifosato 1/10 da DL_{50} , com padrão de normalidade (H/E, aumento de 400x).

técnicas de biologia molecular podem revelar modificações ocorridas em nível celular e/ou molecular não passíveis de demonstração pela técnica utilizada.

5.5 HEMOGRAMA

Em condições fisiológicas o equilíbrio qualitativo e quantitativo das células sanguíneas, com estreitas variações, é mantido pelo balanço entre a produção e a destruição das mesmas. Qualquer fator físico, químico ou biológico que interfira neste balanço, pode se refletir em alterações no sangue periférico.

O hemograma é o exame de rotina destinado a avaliar aspectos qualitativos, em termos morfológicos, e quantitativos das células do sangue periférico (FAILACE, 2003).

No rato os parâmetros hematológicos oscilam consideravelmente dependendo do sítio orgânico utilizado para obtenção do mesmo (HARKNESS; WAGNER, 1995). Neste estudo todas as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca percutânea.

5.5.1 Contagem de eritrócitos

O eritrócito é a unidade funcional do eritrônio, um tecido difuso constituído pelos eritroblastos na medula óssea e pela massa eritróide do organismo. A função primordial do eritrócito é mediar as trocas do oxigênio e do gás carbônico entre os pulmões e os tecidos, por meio da hemoglobina. A vida média do eritrócito humano é de 100 a 120 dias e a sua destruição ocorre com o surgimento de marcadores de senescência como a fosfatidilserina sendo realizada por

macrófagos no fígado, baço e medula óssea (BEUTLER, 2001). No rato a vida média do eritrócito é de 48 a 65 dias (HARKNESS; WAGNER, 1995).

Valores ligeiramente superiores aos controles para a contagem de eritrócitos e hematócrito foram observados em ratos tratados com glifosato por 13 semanas nas concentrações de 12.500, 25.000 e 50.000 ppm/kg de alimento e para a hemoglobina com 25.000 e 50.000 ppm (CHAN; MAHLER 1992). Estes aumentos foram considerados, pelos autores, como compatíveis com hemoconcentração uma vez que os animais apresentavam concentrações séricas elevadas da uréia, proteínas totais e albumina. Dependendo da magnitude da hemoconcentração ocorrida, esta pode, além de produzir valores falsamente elevados nos parâmetros do eritrograma, estar mascarando reduções verdadeiras que possam ter ocorrido em função do tratamento. A contagem dos eritrócitos neste estudo demonstrou redução estatisticamente significativa nos animais tratados com glifosato com as diluições 1/100 e 1/10 da DL_{50} . Na diluição 1/1000 da DL_{50} o valor médio deste parâmetro não foi estatisticamente diferente dos controles, embora ligeiramente menor (Tabela 6 e Figura 17).

No entanto, na diluição 1/10 os valores foram significativos, porém ligeiramente superiores aos observados para a diluição 1/100. Estes dados assim como os obtidos para a hemoglobina e hematócrito discutidos adiante são sugestivos de que mesmo com a administração do produto por meio de uma cânula poderia ter havido hemoconcentração. A administração com a cânula evita os efeitos indesejáveis referentes a palatabilidade da água e alimentos que ocorre quando o agrotóxico é adicionado nestes. Entretanto persiste a irritação que o mesmo pode provocar no trato gastrointestinal, principalmente em doses mais altas, e seus possíveis reflexos na ingestão da água e dos alimentos. Além disso, não podem ser descartados outros efeitos relacionados à exposição crônica ao produto que possam contribuir neste sentido.

Considerando a possibilidade de ter havido hemoconcentração foi determinada a concentração de uréia em amostras de soro armazenadas a 20^o C negativos. Os resultados demonstraram aumento na concentração da uréia em

todos os grupos que receberam o glifosato, porém foi significativo na diluição 1/10 da DL₅₀ quando comparada com os controles e com a diluição 1/1000 (Tabela 7 e figura 18). Estes resultados sugerem a possibilidade de hemoconcentração o que pode ter mascarado os efeitos do tratamento sobre os parâmetros do eritrograma. Portanto as reduções observadas na contagem de eritrócitos, na dosagem de hemoglobina e no hematócrito podem ter sido subestimadas.

O aumento significativo da uremia no grupo 1/10 sugere que a hemoconcentração foi mais pronunciada no mesmo, o que pode justificar o fato dos valores da contagem de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do hematócrito terem sido maiores neste grupo em comparação ao grupo da diluição 1/100.

Por outro lado não pode ser descartada a hipótese de que a elevação na concentração sérica da uréia tenha a contribuição de alterações da função renal, sendo necessário maiores investigações para verificar se há algum comprometimento da mesma decorrente da exposição ao glifosato.

Os resultados obtidos para a contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito, são compatíveis com os dados referentes à redução no ganho de peso. Visto que a eritropoiese é dependente de elementos tais como o ferro, vitaminas, aminoácidos e energia. O suprimento deficiente destes elementos pode comprometê-la em maior ou menor grau (LEE, 1998).

A menor ingestão e/ou absorção de alimentos que pode ter ocorrido em função de irritação no trato gastrointestinal e redução nos níveis de produção de energia por alterações na fosforilação, são fatores que poderiam comprometer a produção de eritrócitos e a síntese de hemoglobina.

A anemia das doenças crônicas constitui outro aspecto que pode contribuir para as alterações observadas em alguns parâmetros do eritrograma. A anemia de doença crônica pode ocorrer em infecções, colagenoses e doenças reumáticas, queimaduras, convalescença de cirurgia ou trauma, úlceras de

decúbito, neoplasias e doenças inflamatórias do trato digestivo. Nestas doenças, a ação sistêmica de citocinas como a IL-1, o TNF- α e a IL-6, aumentam a afinidade das proteínas citoplasmáticas reguladoras do ferro diminuindo o retorno para a reutilização da fração deste elemento oriunda da eritrocaterese. Além disso, a lactoferrina liberada pelos neutrófilos nestes processos, compete com a transferrina pelo ferro liberando-o no sistema retículoendotelial. Como consequência o ferro é deslocado para armazenamento nas células retículoendoteliais e mesmo que não exista carência deste elemento no organismo há redução da sua oferta aos receptores de transferrina do tecido eritroblástico comprometendo a eritropoiese (FAILACE, 2003).

Tabela 6. Dados estatísticos referentes à contagem de eritrócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato .

Grupo	n	X \pmepm x 10⁶/μL	Mínimo x 10⁶/μL	Máximo x 10⁶/μL
Controle	17	7,29 \pm 0,10	6,69	8,16
1/1000	10	7,05 \pm 0,09	6,71	7,56
1/100	10	6,83 \pm 0,11*	6,12	7,24
1/10	9	6,95 \pm 0,09*	6,58	7,50

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

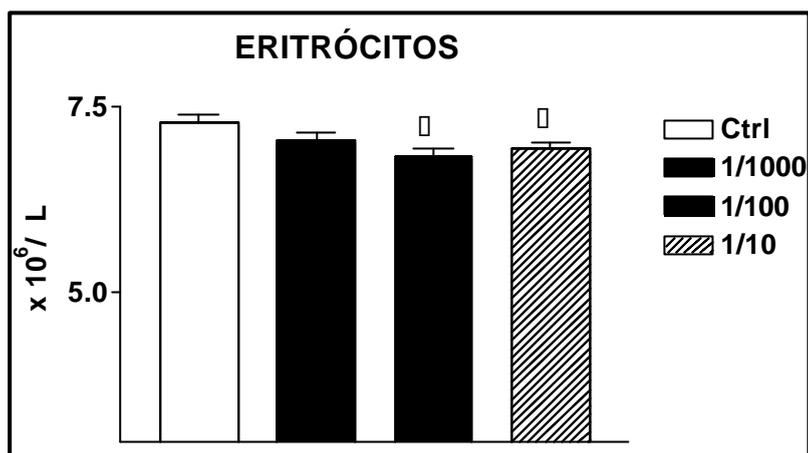


Figura 17. Contagem eritrócitos no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

Tabela 7. Dados referentes à determinação da concentração sérica de uréia dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm mg/dL	Mínimo mg/dL	Máximo mg/dL
Controle	13	52,0 ±0,95	44	56
1/1000	10	53,9 ±1,6	45	61,5
1/100	10	57,3 ±2,08	48	67
1/10	10	62,5 ±2,94**	44	72

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Newman-Keuls: **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

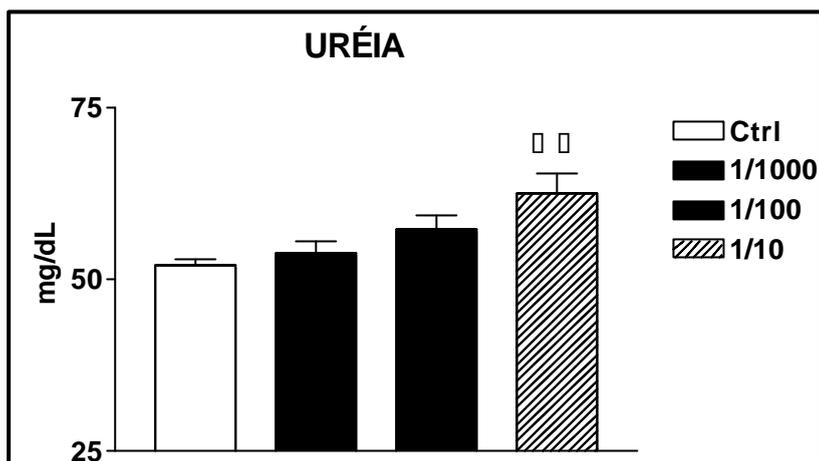


Figura 18. Concentração sérica de uréia no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL_{50} do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Newman-Keuls: $**p < 0,01$, em comparação com o grupo controle).

5.5.2 Determinação da concentração de hemoglobina

A deficiência do aporte de ferro para eritropoiese compromete a síntese de hemoglobina, reduz a sua concentração e pode gerar eritrócitos com um volume corpuscular médio reduzido (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001).

A hemoglobina é o dado central na avaliação funcional do eritrônio. No presente estudo todos os grupos de animais tratados com o glifosato demonstraram valores menores para a hemoglobinemia quando comparados aos controles sendo que a redução foi significativa na diluição 1/100 da DL_{50} (Tabela 8 e Figura 19). Relembrando o efeito da possível hemoconcentração verificada nos resultados, em especial no grupo que recebeu o glifosato na diluição 1/10, esta pode ter tornado a redução na concentração de hemoglobina não significativa neste grupo.

Tabela 8. Dados referentes à determinação da concentração de hemoglobina dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X \pm epm g/dL	Mínimo g/dL	Máximo g/dL
-------	---	------------------	-------------	-------------

Controle	17	14,2 ±0,14	12,9	15,2
1/1000	10	14,2 ±0,16	13,6	15,2
1/100	10	13,5 ±0,17**	12,7	14,3
1/10	9	14,0 ±0,11	13,5	14,6

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

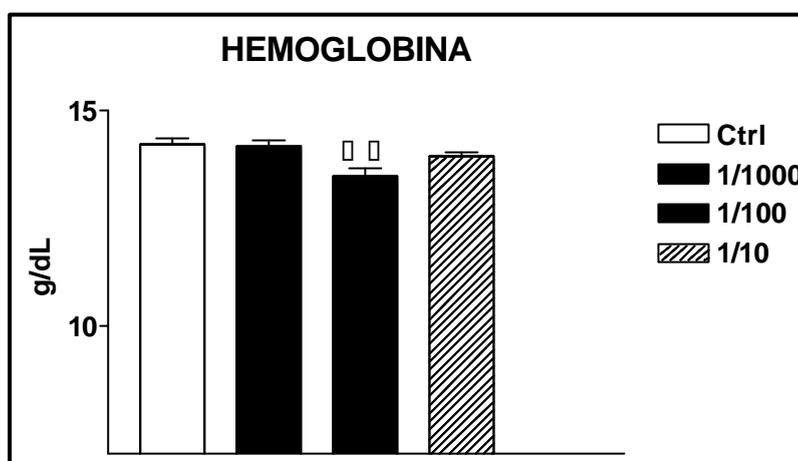


Figura 19. Concentração de hemoglobina no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

5.5.3 Volume corpuscular médio (VCM)

Com o advento da eletrônica e da automação na hematologia a medida do volume corpuscular médio tornou-se reprodutível na rotina e a sua interpretação passou a ser o dado laboratorial de maior utilidade para a classificação diferencial das anemias, permitindo distinguí-las em macrocíticas, normocíticas e

microcíticas. Anemias macrocíticas podem ser devidas a drogas como o álcool, fármacos tais como a zidovudina (AZT) e os protocolos de quimioterapia, hepatopatias, deficiência de vitaminas como a B12 e o ácido fólico e regeneração medular entre outras. As anemias normocíticas devem-se principalmente à deficiente síntese de eritropoietina, entretanto diversas condições que podem causar macrocitose ou microcitose também podem se manifestar como normocíticas embora com menor freqüência. Por sua vez as anemias microcíticas podem ter como causa hemoglobinopatias, defeitos estruturais como a esferocitose e a ovalocitose, doenças crônicas que geram deficiente aporte de ferro para a eritropoiese e a mais freqüente de todas, a carência de ferro no organismo. Entretanto não se pode deixar de considerar a possibilidade da coexistência de varias causas na gênese das anemias (FAILACE, 2003).

O VCM obtido neste estudo demonstrou valores significativamente menores nos grupos tratados com as diluições de 1/100 e 1/10 da DL₅₀ quando comparados com os valores do grupo controle. O valor médio do VCM do grupo tratado com a diluição 1/1000 embora menor que o do grupo controle, não foi estatisticamente diferente (Tabela 9 e Figura 20).

Tabela 9. Dados referentes à medida do VCM dos eritrócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm fL	Mínimo fL	Máximo fL
Controle	17	53,2 ±0,40	50,7	56,3
1/1000	10	52,0 ±0,30	50,1	53,3
1/100	10	51,8 ±0,51*	50,1	55,1
1/10	9	51,7 ±0,24*	50,4	52,3

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

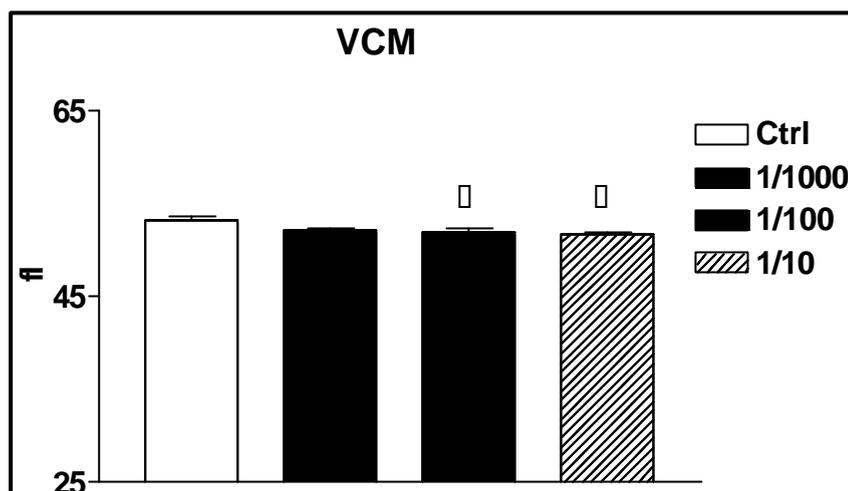


Figura 20: Volume corpuscular médio no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL_{50} do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: * $p < 0,05$, em comparação com o grupo controle).

A redução no VCM é um indicativo de que houve menor síntese de hemoglobina nestes eritrócitos resultando em células menores, o que reforça a possibilidade de uma deficiência de ferro para a eritropoiese como discutido anteriormente. Além disso os resultados deste parâmetro reforçam a hipótese de que a hemoglobinemia no grupo 1/10 foi mascarada por hemoconcentração. Todavia, a hemoconcentração não foi tão pronunciada a ponto de causar falsa elevação na concentração de hemoglobina quando comparada aos controles como ocorreu no estudo realizado por CHAN e MAHLER (1992). As diferenças entre os dois estudos podem ser devidas, principalmente, ao produto utilizado, formulação comercial num e glifosato puro no outro, assim como as concentrações e a forma de administração do produto para os animais.

5.5.4 Hematócrito

O hematócrito é a expressão em unidades percentuais do volume ocupado pela massa de eritrócitos em dado volume de uma amostra de sangue. O hematócrito fornecido por equipamentos não se origina da medida direta do

mesmo como na metodologia de empacotamento por centrifugação, mas do produto da contagem de eritrócitos pelo VCM. O aumento ou redução nestes parâmetros se reflete diretamente no hematócrito (RYAN, 2001).

No presente estudo os resultados do hematócrito demonstraram valores significativamente reduzidos em todos os grupos tratados quando comparados com o grupo controle (Tabela 10 e Figura 21). Os resultados da contagem de eritrócitos e do VCM, que foram menores em todos os grupos tratados quando comparados aos controles, resultaram num produto, o hematócrito, com valores estatisticamente ainda mais significativos. Estes resultados reforçam a hipótese de uma menor taxa de eritropoiese. Por outro lado, o hematócrito demonstrou ser maior no grupo tratado com a diluição 1/10 em comparação ao grupo tratado com a diluição 1/100, corroborando o raciocínio de hemoconcentração mais pronunciada neste grupo.

Tabela 10. Dados referentes aos valores do hematócrito dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm %	Mínimo %	Máximo %
Controle	17	38,7 ±0,14	35,3	42,8
1/1000	10	36,7 ±0,16*	34,1	39,6
1/100	10	35,3 ±0,17***	33,7	37,4
1/10	9	35,9 ±0,11***	34,5	37,8

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05 e ***p<0,001em comparação com o grupo controle).

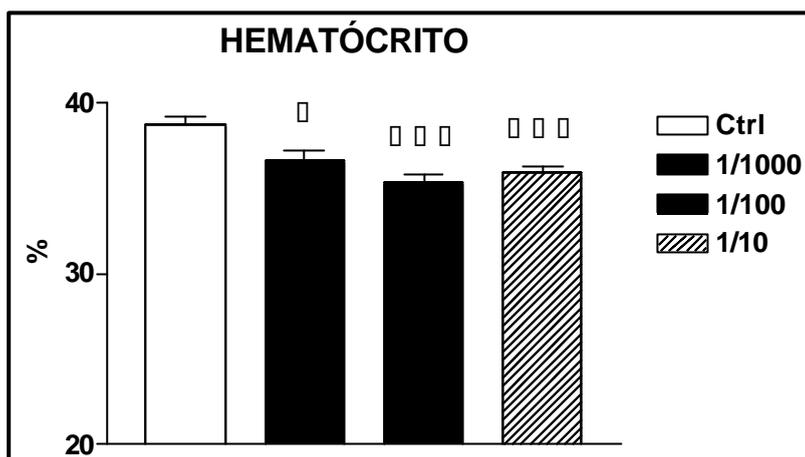


Figura 21. Hematócrito no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: * p<0,05 e ***p<0,001, em comparação com o grupo controle).

5.5.5 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

A HCM corresponde à quantidade média em peso de hemoglobina por eritrócito, expresso em picogramas. É fornecida pela razão entre a hemoglobinemia e a contagem de eritrócitos (KJELDSBERG, 1998).

A hemoglobina corpuscular média não apresentou valores estatisticamente diferentes entre os grupos tratados e o grupo controle conforme pode ser observado na Tabela 11 e na Figura 22.

Tabela 11. Dados estatísticos da HCM dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm pg	Mínimo pg	Máximo pg
Controle	17	19,5 ±0,40	18,1	21,2
1/1000	10	20,0 ±0,30	19,4	20,5
1/100	10	19,8 ±0,51	18,8	21,0
1/10	9	20,1 ±0,24	19,1	20,7

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: p>0,05).

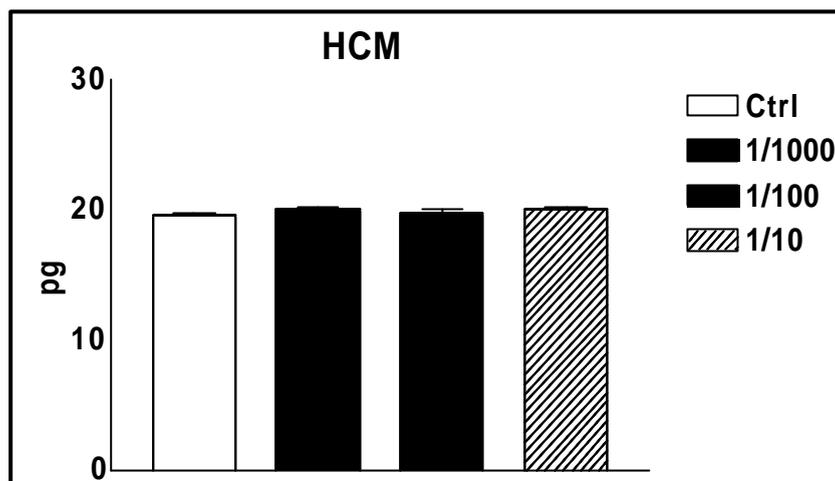


Figura 22. Hemoglobina corpuscular média no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: $p > 0,05$).

5.5.6 Concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM)

A CHCM representa a razão entre o peso da hemoglobina e o volume onde está contida sendo expressa em porcentagem ou g/dL. É obtida pela razão entre a hemoglobinemia e o hematócrito (KJELDSBERG, 1998).

Todos os grupos tratados apresentaram valores significativamente maiores que o grupo controle, para este parâmetro (Tabela 12 e Figura 23). Em face do exposto anteriormente para os demais parâmetros do eritograma tal resultado não é o esperado, no entanto a hemoconcentração que pode ter ocorrido também pode ter gerado aumento da osmolalidade sangüínea. Os eritrócitos em meio hiperosmolar podem desidratar-se aumentando a CHCM. Condições hiperosmolares podem ser geradas *in vitro* por desproporção entre o volume de sangue e a concentração de anticoagulante (FAILACE, 2003). No entanto, as amostras dos controles e dos grupos tratados com glifosato foram anticoaguladas respeitando as mesmas proporções entre sangue e anticoagulante.

Tabela 12. Dados estatísticos da CHCM dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm %	Mínimo %	Máximo %
Controle	17	36,7 ±0,33	34,9	39,3
1/1000	10	38,7 ±0,32**	36,8	40,0
1/100	10	38,2 ±0,33*	35,7	39,4
1/10	9	38,6 ±0,41**	35,8	39,8

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

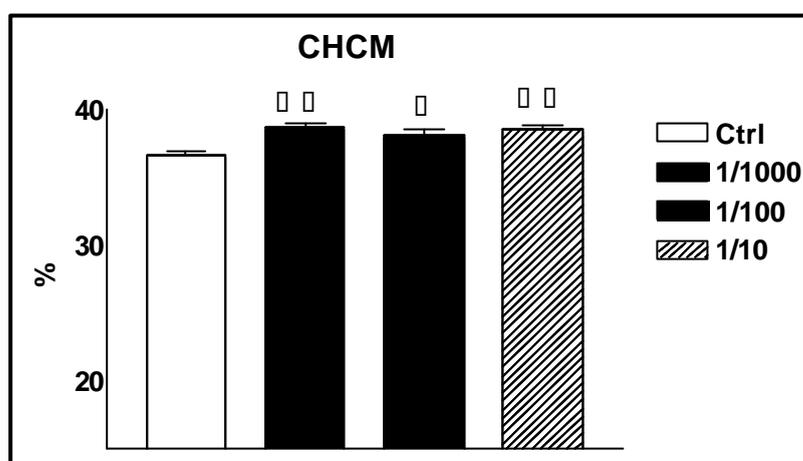


Figura 23. Concentração hemoglobínica corpuscular média no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

5.5.7 Coeficiente de variação da distribuição dos eritrócitos (RDW)

O RDW (*red cell distribution width*) representa o coeficiente de variação no volume dos eritrócitos em torno do VCM, denominada na microscopia como anisocitose. Um coeficiente maior indica maior variabilidade no volume celular de determinada amostra (RYAN, 2001).

O RDW aumenta nas anemias carenciais como as por deficiência de ferro, ácido fólico e vitamina B₁₂, nas anemias sideroblásticas e nos períodos de regeneração ou resposta medular após hemorragias, ou após a reposição

terapêutica de elementos deficientes para a eritropoiese. Nestas condições são geradas populações heterogêneas de eritrócitos em função de que o próprio fornecimento dos elementos necessários à eritropoiese apresenta oscilações com períodos de maior ou menor carência, ou no caso das anemias sideroblásticas onde o defeito na síntese do grupo heme varia de glóbulo para glóbulo (FAILACE, 2003).

Não foram encontrados dados na literatura revisada referentes ao RDW, HCM e CHCM em animais e humanos expostos ao glifosato puro ou em formulações comerciais.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram valores do RDW significativamente maiores nos grupos tratados com glifosato nas diluições 1/100 e 1/10 que no do grupo controle (Tabela 13 e Figura 24). Estes resultados estão em acordo com a possibilidade de comprometimento na eritropoiese por aporte deficiente e variável dos elementos necessários à mesma.

Tabela 13. Dados estatísticos referentes ao RDW dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm %	Mínimo %	Máximo %
Controle	16	13,8 ±0,0,22	12,4	15,0
1/1000	8	14,6 ±0,23	13,8	15,5
1/100	9	15,6 ±0,176***	14,9	16,6
1/10	8	15,9 ±0,336***	14,6	17,2

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: ***p<0,0001, em comparação com o grupo controle).

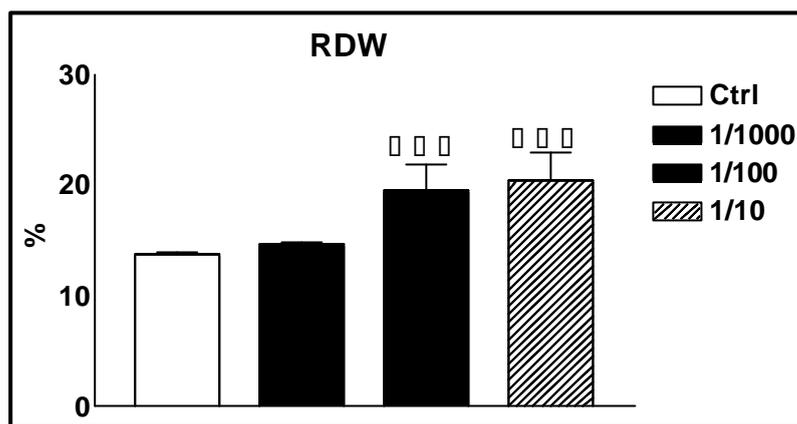


Figura 24. RDW no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL_{50} do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *** $p < 0,0001$, em comparação com o grupo controle).

Na interpretação dos resultados obtidos nos parâmetros avaliados pelo hemograma cabe ressaltar que muitas diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle ou entre os próprios grupos tratados foram estatisticamente significantes. Entretanto, a diferença entre os grupos foi pequena. Esta observação sugere que, nestes casos, o tratamento com o glifosato pode representar reflexos fisiológicos não significativos. Porém, deve-se considerar que o período de tratamento pode não ter sido suficiente para manifestações mais pronunciadas destas diferenças.

Outro aspecto a se considerar está relacionado aos fatores propostos para tais alterações que além dos referidos como a ingestão e/ou absorção de alimentos, o processo inflamatório e a fosforilação oxidativa, outros podem estar envolvidos como ação tóxica na hematopoiese por parte do produto administrado, tendo em vista a sua localização preferencialmente óssea, a somatória de fatores ou até o balanceamento na atuação de diferentes fatores.

5.5.8 Contagem de plaquetas

As plaquetas são células anucleadas formadas por fragmentação do citoplasma dos megacariócitos medulares. Suas principais funções estão relacionadas à hemostasia primária mas participam também na hemostasia secundária. As plaquetas aderem nas paredes de vasos sanguíneos lesados (adesão plaquetária), agregam umas às outras formando o tampão plaquetário, secretam várias moléculas bioativas (agregação e secreção plaquetária) e contribuem para a geração de trombina, componente fundamental na coagulação sanguínea (PARISE; SMITH; COLLER, 2001).

A trombocitose pode ocorrer em anemias por deficiência de ferro, em períodos pós-hemorrágicos, após esplenectomia, em processos inflamatórios, nas síndromes mieloproliferativas e após traumas enquanto que a trombocitopenia pode estar associada a infecções virais, aplasia medular, anemias por deficiência de vitamina B12 e ácido fólico, coagulopatias de consumo e quimioterapia entre outras causas (FAILACE, 2003). Alterações funcionais adquiridas podem ser devidas a fármacos como os antiinflamatórios não esteroidais, a doenças sistêmicas como a uremia e hepatopatias crônicas, a desordens hematológicas como as síndromes mielodisplásicas, entre outras (SHATTIL; ABRAMS; BENNETT, 2001).

Estudo em ratos não demonstrou alterações significantes na contagem de plaquetas, após administração de glifosato puro na alimentação em concentração de 50.000 ppm/kg de alimento, entretanto os animais apresentavam sinais de desidratação o que pode ter comprometido os resultados (CHAN; MAHLER, 1992)

Embora, no presente estudo, não tenha havido diferença estatisticamente significativa na contagem de plaquetas entre os grupos tratados e o controle, nem quando foram comparados os grupos tratados entre si, o valor médio da plaquetometria foi inferior em todos os grupos tratados quando comparada a plaquetometria dos controles (Tabela 14 e Figura 25). A literatura revisada não fez referência a contagem de plaquetas em humanos expostos ao glifosato, mas hemorragia gastrointestinal foi observada em 8% dos casos de intoxicação intencional com formulações deste agrotóxico (TALBOT, 1991).

Na presente pesquisa não foram observados sinais de sangramento intestinal mas em 570 observações realizadas em 15 animais do grupo inoculado com a diluição 1/10 foram efetuados 48 registros positivos para sinais de sangramento nasal (observação de vestígios de sangue nas bordas das narinas), envolvendo 07 animais, enquanto que foram registradas 3 e 7 observações positivas em dois e 04 animais nos grupos da diluição 1/1000 e 1/100, respectivamente.

O comprometimento funcional adquirido das plaquetas pode ser a base de distúrbios hemorrágicos leves e moderados sem que haja redução no seu número. No entanto quando associado a outras alterações na hemostasia pode redundar em quadros hemorrágicos graves (SHATTIL; ABRAMS; BENNETT, 2001). No sentido de investigar estes sinais de sangramento observados nos animais tratados com o glifosato provas adicionais mais específicas para avaliar a função plaquetária tais como testes de agregação, bem como provas para coagulação sangüínea precisam ser realizadas.

Tabela 14. Dados referentes a plaquetometria dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm x 10³/μL	Mínimo x 10³/μL	Máximo x 10³/μL
Controle	13	887,5 ±22,63	744	981
1/1000	8	799,0 ±35,68	562	870
1/100	9	811,1 ±30,71	585	909
1/10	8	812,2 ±44,23	669	949

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: p>0,05).

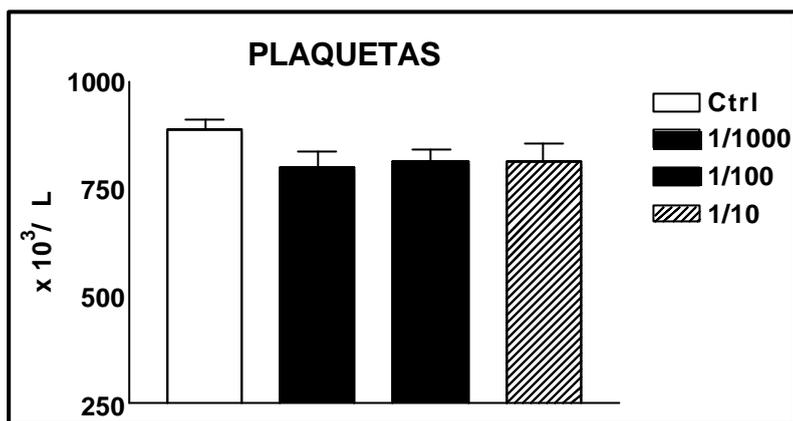


Figura 25. Contagem plaquetas no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: $p > 0,05$).

5.5.9 Contagem global dos leucócitos

Dados referentes a leucometria total e exposição crônica de humanos ao glifosato não foram encontrados na literatura revisada, entretanto nas intoxicações agudas a leucocitose foi constatada em 68% dos casos sem ter sido especificada às custas de qual população (LEE *et al.*, 2000).

Neste estudo não foram demonstradas diferenças estatisticamente significantes nos valores da leucometria global quando comparados os grupos tratados com o controle, nem quando comparados os grupos tratados entre si (Tabela 15 e Figura 26).

Tabela 15. Dados referentes a leucometria global dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm x 10 ³ /μL	Mínimo x 10 ³ /μL	Máximo x 10 ³ /μL
Controle	17	7,07 ±0,469	3,3	9,9
1/1000	10	6,83 ±0,617	4,2	9
1/100	10	8,58 ±0,906	4,7	13,8
1/10	9	6,5 ±0,956	3,2	11,6

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: $p > 0,05$).

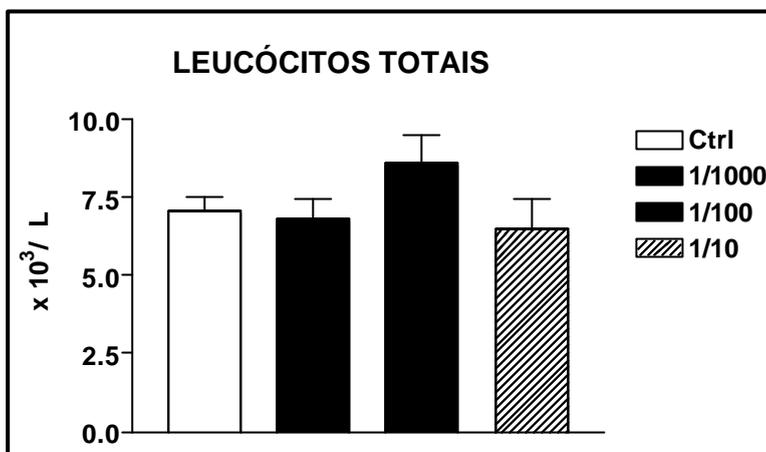


Figura 26. Leucometria global no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: $p > 0,05$).

Um estudo conduzido pela empresa que patenteou o glifosato e citado como dados não publicados no *Environmental Health Criteria 159 – Glyphosate*, demonstrou que os dados hematológicos dos ratos não foram afetados após 13 semanas da administração de glifosato na dieta em concentrações de 1.000, 5.000 e 20.000 mg/kg de alimento (MONSANTO, 1987). Resultados não significativos para a leucometria total foram obtidos por CHAN e MAHLER (1992), utilizando o glifosato puro adicionado à alimentação em quantidades de 12.500, 25.000 e 50.000 ppm/kg de alimento.

5.5.10 Contagem de monócitos

Os monócitos desenvolvem um papel central na resistência do organismo a muitas doenças infecciosas incluindo tuberculose, leishmaniose, febre tifóide e micoses sistêmicas. Na resposta imune estas células são importantes apresentadoras de antígeno para os linfócitos T e secretam várias moléculas bioativas. Possuem receptores de superfície que reconhecem imunoglobulinas, integrinas, fatores do complemento e antígenos de parede bacterianos como os lipopolissacarídeos, que lhes propiciam a capacidade de reconhecimento e

fagocitose (LEHRER; GANZ, 2001). No sangue periférico de humanos estão distribuídos em um *pool* circulante e um marginal, sendo este último em número 3,5 vezes superior ao primeiro. A monocitose pode ocorrer em várias condições clínicas como processos inflamatórios crônicos (artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico), na quimioterapia, leishmaniose, tuberculose, malária, leucemia monocítica e brucelose, enquanto que a monocitopenia é uma condição pouco comum e associada principalmente a anemia aplástica e tricoleucemia (FAILACE, 2003).

Os valores médios da contagem de monócitos não foram estatisticamente diferentes entre os animais tratados com glifosato nas diluições 1/1000 e 1/10 da DL₅₀ em comparação aos animais controles, no entanto houve aumento significativo deste parâmetro nos animais tratados com a diluição 1:100 quando comparados com os animais controles (Tabela 16 e Figura 27).

Tabela 16. Dados referentes à contagem de monócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm x 10³/μL	Mínimo x 10³/μL	Máximo x 10³ /μL
Controle	17	0,69 ±0,08	0,27	1,4
1/1000	10	0,82 ±0,06	0,5	1,1
1/100	10	1,33 ±0,18*	0,5	2,2
1/10	9	0,79 ±0,10	0,4	1,2

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

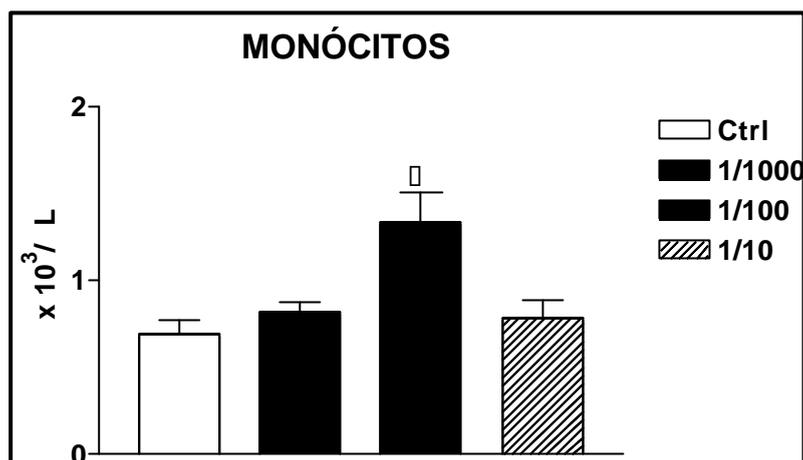


Figura 27. Contagem de monócitos no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

Efeitos sobre a saúde como a irritação do trato gastrointestinal inclusive com ulcerações após ingestão por seres humanos (CHANG *et al.*, 1999) ou após a administração em ratos (WHO, 1994) foi descrita para o glifosato. A elevação no número médio de monócitos pode ser consequência de um possível processo inflamatório fruto da irritação do trato gastrointestinal associada ao glifosato. Embora os tratamentos com a menor e a maior dose não tenham sido significativos, demonstraram um número de monócitos ligeiramente superior ao do controle em concordância com a interpretação de inflamação no trato gastrointestinal. No entanto não foi possível estabelecer uma hipótese plausível para a diferença ter sido significativa no grupo que recebeu a dose intermediária (1/100 da DL₅₀) do glifosato, cabendo ressaltar que nesta dose, embora não significativo, foram obtidos os maiores valores para leucometria total e linfócitos totais e os menores valores para a eritrometria e hemoglobinemia.

5.5.11 Contagem de granulócitos

Na contagem de granulócitos estão incluídos os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. A principal função dos neutrófilos é prevenir ou retardar a introdução de agentes infecciosos ou outros materiais estranhos no organismo por meio da

quimiotaxia, fagocitose e digestão intracelular dos mesmos. As principais condições associadas com neutrofilia são as infecções bacterianas (pneumonias, meningites, peritonites, septicemias, urinárias, amigdalianas, entre outras), inflamações, síndromes mieloproliferativas crônicas, hemorragias e estresse enquanto que neutropenias podem ser devidas a aplasia medular, fármacos, febre tifóide, malária, causas imunes, quimioterapia, entre outras (ATHENS, 1998).

Neste estudo os valores sanguíneos médios das contagens de granulócitos não foram estatisticamente diferentes entre os animais tratados com glifosato na diluição 1/1000 da DL₅₀ em comparação aos controles ou quando comparados os grupos tratados entre si. No entanto os valores deste parâmetro foram significativamente maiores nos animais tratados com as diluições 1/100 e 1/10, quando comparados com os animais controles (Tabela 17 e Figura 28).

A neutrofilia é uma condição freqüentemente associada aos processos inflamatórios enquanto que a eosinofilia e a basofilia comumente não o são. Na revisão de 131 casos de intoxicação por glifosato (LEE *et al.*, 2000) não foram relatados sintomas alérgicos enquanto que alterações na mucosa gástrica compatíveis com resposta inflamatória foram descritas (CHANG *et al.*, 1999). Portanto, o aumento significativo dos granulócitos nos grupos tratados com as diluições 1/100 e 1/10 da DL₅₀ como consequência de uma neutrofilia associada a um processo inflamatório sugere ser a hipótese mais coerente. Os resultados deste parâmetro demonstraram ser crescentes com o aumento da dose o que pode ser compatível com agressão química produzida pelo glifosato e/ou outro componente da formulação.

Tabela17. Dados referentes à contagem de granulócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm x 10³/μL	Mínimo x 10³/μL	Máximo x 10³ /μL
Controle	17	0,58 ±0,08	0,3	1,2
1/1000	10	0,65 ±0,06	0,3	0,9
1/100	10	2,0 ±0,19*	0,2	2,0
1/10	9	2,3 ±0,19*	0,5	2,3

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

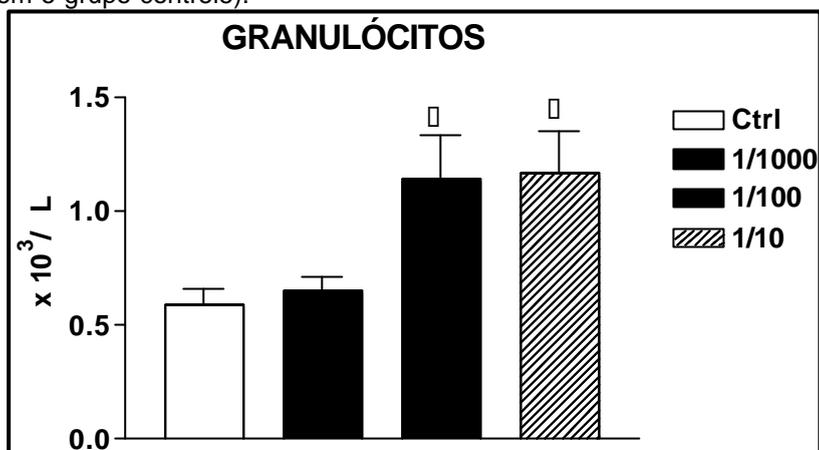


Figura 28. Contagem de granulócitos no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

5.5.12 Contagem de linfócitos

Os linfócitos desempenham papel fundamental na resposta imune humoral e celular. Estas células podem ser distribuídas em três populações principais denominadas de linfócitos B, T e NK (*Natural Killer*), além de sub-populações dentro destas, cada qual com funções especializadas no sistema imune. Dessa forma para uma avaliação do sistema imune reveste-se de importância não só o número absoluto das três populações em conjunto mas também o número e a relação das sub-populações de linfócitos além de outros componentes deste sistema (PARASKEVAS; FOERSTER, 1998). Portanto, a ausência de alterações no número absoluto dos linfócitos observadas neste estudo não pode ser interpretada como ausência de alterações no sistema imune, requerendo pesquisas mais detalhadas tal como a avaliação das sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Linfocitoses podem ocorrer em infecções virais (mononucleose, rubéola, citomegalovírus, sarampo, hepatites virais), coqueluche, brucelose, sífilis, pós-

esplenectomia, tuberculose e leucemias linfocíticas, enquanto que a linfopenia está associada a infecções bacterianas em geral, Síndrome da Imunodeficiência adquirida (SIDA), estresse, condições de hipoplasia e aplasia medular e a iatrogenia (KIPPS, 2001a).

No presente estudo a contagem de linfócitos não demonstrou diferenças estatisticamente significantes quando comparados os grupos tratados e os controles, nem quando comparados quaisquer dos grupos tratados entre si (Tabela 18 e Figura 29).

Tabela 18. Dados referentes à contagem de linfócitos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X \pm epm x 10 ³ / μ L	Mínimo x 10 ³ / μ L	Máximo x 10 ³ / μ L
Controle	17	5,79 \pm 0,405	2,4	8,7
1/1000	10	5,38 \pm 0,675	2,5	7,9
1/100	10	6,11 \pm 0,697	4,0	11,1
1/10	9	4,54 \pm 0,807	2,3	9,1

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: p>0,05).

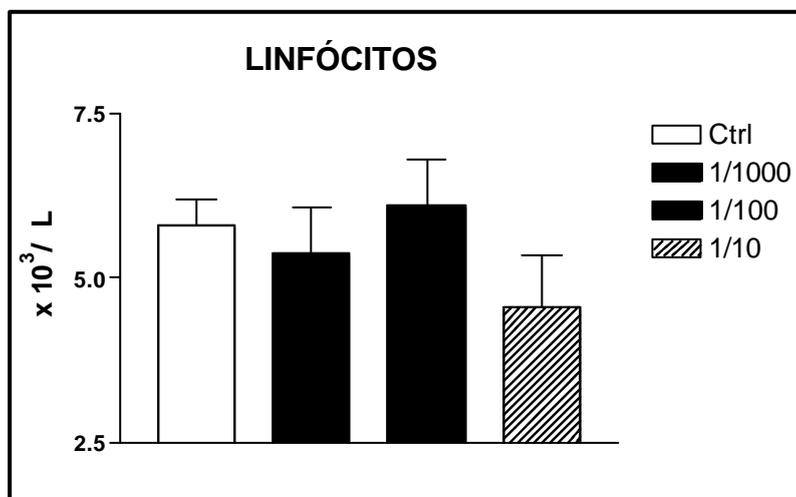


Figura 29. Contagem de linfócitos no grupo controle e nos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do

produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: $p > 0,05$).

5.6 CONTAGEM E RELAÇÃO DOS LINFÓCITOS CD4⁺ E CD8⁺, NO SANGUE PERIFÉRICO E LINFONODOS

O sistema imune é constituído por células e moléculas que fisiologicamente respondem de forma coordenada à presença de substâncias estranhas, infecciosas ou não, no organismo.

A interação do sistema imune com substâncias estranhas ao mesmo inicialmente ocorre por meio das reações da imunidade inata e posteriormente pelas reações da imunidade adquirida. Esta última por sua vez pode ser mediada por anticorpos, denominada imunidade humoral, ou por células constituindo a imunidade celular (ROIT; BROSTOF; MALE, 1999).

Os linfócitos B desempenham papel fundamental na resposta imune humoral uma vez que são as células produtoras dos anticorpos, enquanto que a imunidade mediada por células está centrada nos linfócitos T com a participação de células acessórias como os fagócitos mononucleares e as células dendríticas.

A expressão de diferentes glicoproteínas na membrana dos linfócitos T subdivide os mesmos em duas principais populações, os que expressam CD4 designados como células T auxiliares e os que expressam CD8 denominados como células T citotóxicas/supressoras, não estando definido ainda se esta última corresponde a uma única sub-população ou duas, as citotóxicas e as supressoras (ABBAS; LITCHTMAN; POBER, 2003).

Em termos funcionais, de um modo geral os linfócitos CD8⁺ possuem como função principal reconhecer e destruir células do hospedeiro que expressem antígenos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade tipo I (MHC classe I). Os linfócitos T auxiliares podem ser distribuídos em duas subpopulações chamadas T_H1 e T_H2, com expressão de diferentes glicoproteínas além da expressão comum de CD4, e a produção, quando ativadas, de diferentes citocinas o que lhes confere características funcionais individuais. Entretanto, genericamente apresentam a função de promover a produção de anticorpos pelos linfócitos B e de ativar macrófagos. Estes linfócitos reconhecem antígenos ligados ao MHC classe II (KIPPS, 2001b).

Em humanos, os linfócitos CD4⁺ representam aproximadamente 50 a 60% dos linfócitos do sangue, linfonodos e baço e os CD8⁺ constituem de 20 a 25%, 15 a 20% e 10 a 15% dos linfócitos do sangue, linfonodos e baço, respectivamente (ABBAS; LITCHTMAN; POBER, 2003).

Atualmente um dos grupos de testes propostos para avaliar o sistema imune de indivíduos ocupacionalmente expostos a produtos químicos é o estudo do efeito sobre as subpopulações de linfócitos como a de CD4⁺ e de CD8⁺ (DACASTO; NEBIA; BOLLO, 2001).

5.6.1 Percentual e relação dos Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico

Os resultados obtidos neste estudo para o percentual e número absoluto de linfócitos no sangue periférico para as duas subpopulações e relação entre elas constam nas Tabelas 19 e 20. Os valores médios do percentual e número absoluto de linfócitos CD4⁺ dos animais dos grupos tratados com as diluições 1/1000 e 1/100 da DL₅₀ foram superiores, porém não significativos quando comparados com os controles. Por outro lado, o grupo tratado com a diluição 1/10 demonstrou valores significativamente reduzidos para estes parâmetros quando comparados com os respectivos valores do grupo controle (Figura 30). O mesmo

padrão de resultado foi obtido para o CD8⁺, conforme Figura 31. A relação CD4⁺/CD8⁺ demonstrou discreta redução sem significado estatístico, visto que as sub-populações de CD4⁺ e CD8⁺ reduziram com certa proporcionalidade, conforme Figura 32.

Os resultados dos valores percentuais tanto para as células CD4⁺ quanto para as CD8⁺ evidenciaram respostas com padrões diferentes em função das doses administradas. O tratamento com o glifosato nas diluições 1/1000 e 1/100 da DL₅₀ do produto, sugere ter induzido uma resposta discreta do organismo no sentido de uma possível proliferação e diferenciação equilibrada das duas subpopulações gerando aumento proporcional destas células, conforme verificado pela relação entre as mesmas. Entretanto quando o tratamento foi realizado com a diluição 1/10 o organismo demonstrou um padrão inverso na resposta, com reflexos mais pronunciados na sub-população de células CD4⁺. Padrões semelhantes de resposta de células CD4⁺ e CD8⁺ estão descritos na literatura para outros agrotóxicos.

Tabela 19. Dados dos valores percentuais dos linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e da relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	CD4⁺ X±epm %	CD8⁺ X±epm %	CD4⁺/CD8⁺ X±epm
Controle	10	43,9 ±4,07	6,7 ±1,45	7,8 ±1,19
1/1000	10	49,2 ±3,26	7,6 ±1,47	7,6 ±1,66
1/100	10	56,6 ±2,73	8,0 ±0,97	7,5 ±0,82
1/10	8	20,4 ±2,56**	3,4 ±0,29*	6,3 ±1,26

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05 e **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

Tabela 20. Dados referentes aos valores absolutos dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	CD4 ⁺ X ±epm x 10 ³ /μL	CD8 ⁺ X ±epm x 10 ³ /μL
Controle	10	2,143 ±0,30	0,316 ±0,06
1/1000	10	3,362 ±0,26	0,542 ±0,11
1/100	10	3,803 ±0,94	0,548 ±0,15
1/10	8	1,381 ±0,38*	0,209 ±0,04*

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

FAN; WIERDA; ROZMAN e colaboradores (1996), demonstraram num trabalho realizado em ratos, que o pesticida organoclorado 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) afetava a resposta imune mediada por células evidenciando uma curva dose-resposta em forma de "U" invertido. A resposta imune aumentava com o aumento da dose do produto até a concentração de 20 μg/kg de peso corporal e começava a reduzir com 30 μg tornando-se significativamente reduzida a partir de 40 μg/kg de peso corporal. Outro estudo realizado com este produto em primatas, demonstrou que doses que gerassem acúmulo de 2,5 a 2,7 ng do mesmo/kg de peso corporal elevavam a contagem de CD4⁺ para valores acima da referência enquanto reduzia a contagem de CD4⁺ virgens, sem alterar a contagem de CD8⁺ ou a contagem total de células T. No entanto quando a dose gerava um acúmulo de 9 a 10 ng do produto/kg de peso corporal houve redução da contagem de CD4⁺ para valores aquém dos de referência e aumento da contagem de CD8⁺ (NEUBERT *et al.*,1992).

Esta redução significativa pode ocorrer por diversos mecanismos. Teoricamente pode ser por interferência na proliferação ou diferenciação de células tímicas em células CD4⁺ ou por incremento na morte celular via indução da apoptose ou não. Interferência na proliferação e diferenciação de células T tem sido observada com outros compostos. O TCDD demonstrou inibir a proliferação de tímócitos obtidos de camundongos ao mesmo tempo em que estimulou a diferenciação destes para linfócitos CD8⁺, esta última por interferência na via de

sinalização extracelular de quinases (ERK), em experimentos *in vitro*. A ERK é uma via reconhecidamente crítica para diferenciação e apoptose de timócitos (TSUKUMO *et al.*, 2002). Efeito tóxico direto ou atuando em nível de produção de citocinas que de algum modo regulem a população ou sub-populações de células CD4⁺ como a IL-2 (interleucina-2) e IL-7 também podem ser formas de atuação que tenham resultando no decréscimo das células CD4⁺.

A redução da população de células CD4⁺ por aumento da morte celular foi demonstrada em comundongos tratados com TCDD. Os resultados demonstraram que a morte celular induzida pelo TCDD pode ser mediada pela interação com Fas e FasL (DEARSTYNE; KERKVIET, 2002).

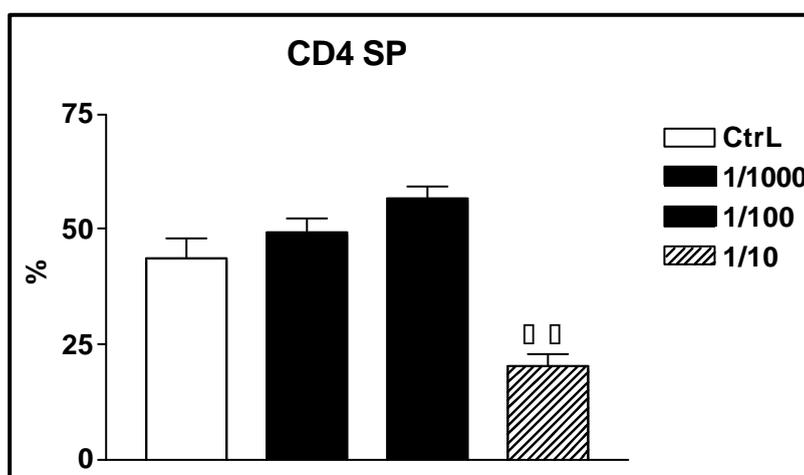


Figura 30. Linfócitos CD4⁺ no sangue periférico do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: **p<0,01, em comparação com o grupo controle).

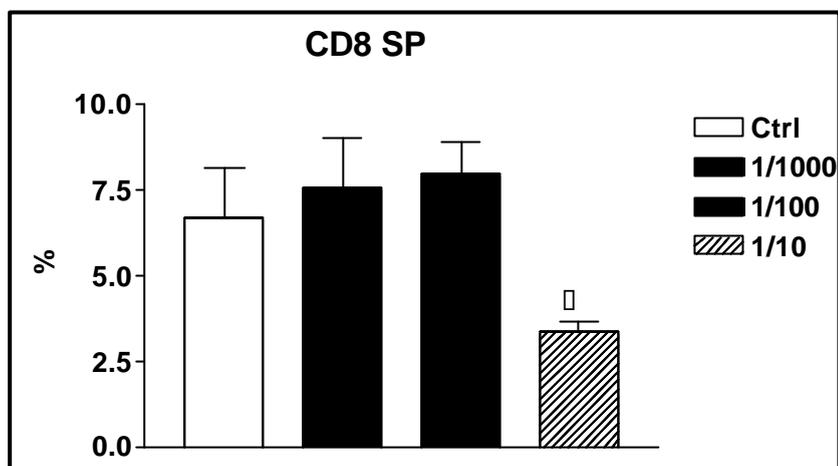


Figura 31. Linfócitos CD8⁺ no sangue periférico do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

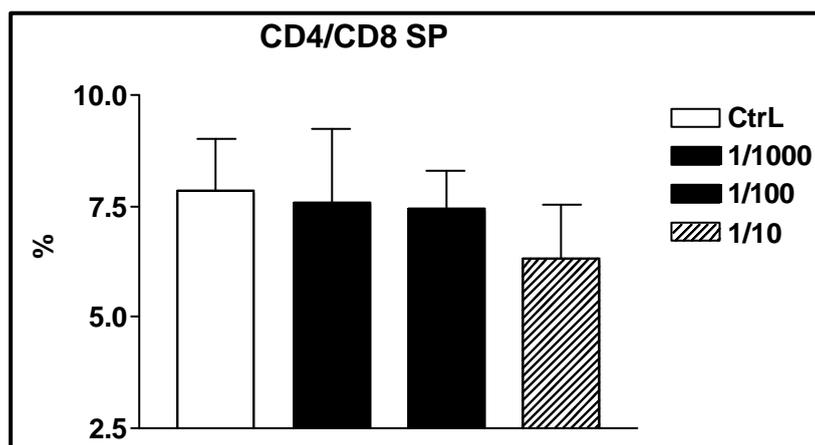


Figura 32. Relação CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: p>0,05).

Por outro lado, o possível comprometimento do sistema imune por agrotóxicos ou outras causas, não está restrito apenas a aspectos quantitativos como o observado para a redução das células CD4⁺ pelo glifosato neste estudo, mas envolve também a capacidade funcional destas células seja como efetoras ou moduladoras da atividade de outras relacionadas com a imunidade, como observado por WHALEN e colaboradores (2003). Estes autores constataram que o herbicida atrazina e os fungicidas do grupo dos carbamatos (maneb, ziram e metiram) inibem significativamente a capacidade citolítica de células NK, isoladamente, sobre as células K562 (linhagem celular da leucemia mielóide crônica em humanos). Quando a capacidade citolítica das NK foi testada na presença de células T a inibição foi significativa apenas com a atrazina, evidenciando que este composto interfere também na modulação que as células T exercem sobre a atividade das NK.

Portanto futuros trabalhos que avaliem a funcionalidade das subpopulações de células T frente à exposição ao glifosato podem se revestir de importância na avaliação dos efeitos deste agrotóxico sobre o sistema imune.

5.6.2 Percentual e relação dos Linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no linfonodo

Os linfonodos são órgãos linfóides periféricos ou secundários onde se iniciam as respostas imunes adquiridas aos antígenos protéicos originários da linfa. Apresentam-se como agregados nodulares de tecido rico em linfócitos distribuídos por todo o corpo, ao longo dos canais linfáticos (ABBAS; LITCHTMAN; POBER, 2003).

Os dados referentes aos linfócitos CD4⁺ no linfonodo demonstraram valores significativamente reduzidos no grupo tratado com a diluição 1/10 da DL₅₀ quando comparados aos controles. Não houve diferença significativa para os demais

grupos tratados, embora tenham demonstrado uma redução gradativa, quando comparados ao controle (Tabela 21 e Figura 33). Por sua vez os resultados para as células CD8⁺ evidenciaram um perfil oposto, aumento crescente destas com o aumento da dose, sendo significativamente diferente na diluição 1/10 da DL₅₀ quando comparada ao controle (Tabela 21 e Figura 34). Conseqüentemente, com a redução no percentual de células CD4⁺ e aumento no percentual de células CD8⁺ a relação CD4⁺/CD8⁺ no linfonodo demonstrou contínua redução com o aumento da dose do produto. Houve diferença significativa nos grupos tratados com diluição 1/100 e 1/10 da DL₅₀ quando comparados com o grupo controle (Tabela 21 e Figura 35).

Além das alterações observadas nas sub-populações de células estudadas nos linfonodos, foi constatado um proeminente aumento destes com diferenças significantes nas três doses utilizadas, quando comparados aos controles (Tabela 22 e Figuras 36 e 37).

A hipertrofia dos linfonodos pode decorrer de processos inflamatórios, infecciosos (bacterianos, virais e por protozoários), neoplásicos e imunes (HABERMANN; STEENSMA, 2000).

Tabela 21. Dados referentes aos valores percentuais dos linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e da relação CD4⁺/CD8⁺ no linfonodo dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	CD4⁺ X±epm %	CD8⁺ X±epm %	CD4⁺/CD8⁺ X±epm
Controle	10	48,8 ±4,20	10,7 ±2,21	5,1±0,82
1/1000	10	42,4 ±4,91	14,4 ±2,38	3,3 ±0,61
1/100	10	41,8 ±1,14	17,0 ±0,91	2,5 ±0,18*
1/10	8	25,4 ±2,91*	24,5 ±5,67*	1,2 ±0,21*

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: * p<0,05, em comparação com o grupo controle).

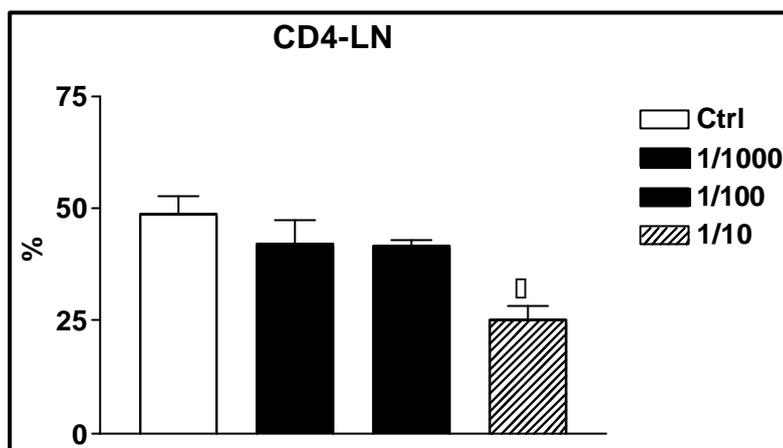


Figura 33. Linfócitos CD4⁺ no linfonodo inguinal do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

Estes resultados demonstram que a exposição ao glifosato pode apresentar perfis diferentes nas sub-populações de células CD4⁺ e CD8⁺ dependendo do sítio onde as mesmas são obtidas. Além disso, a detecção de alterações destas sub-populações nos linfonodos demonstrou ser mais sensível neste órgão que no sangue periférico.

Os aspectos discutidos e referenciados na literatura para as alterações observadas no sangue periférico podem ser aplicados para os linfonodos. Entretanto, estudos adicionais específicos para este órgão, tais como histológicos com coloração H/E, marcação de populações por técnicas de imunohistoquímica ou por citometria de fluxo, expressão de receptores nas células e seus respectivos ligantes no tecido, poderão fornecer dados como a participação de outros grupos celulares, alterações histológicas e aspectos do alojamento celular que auxiliem a entender as modificações constatadas no órgão.

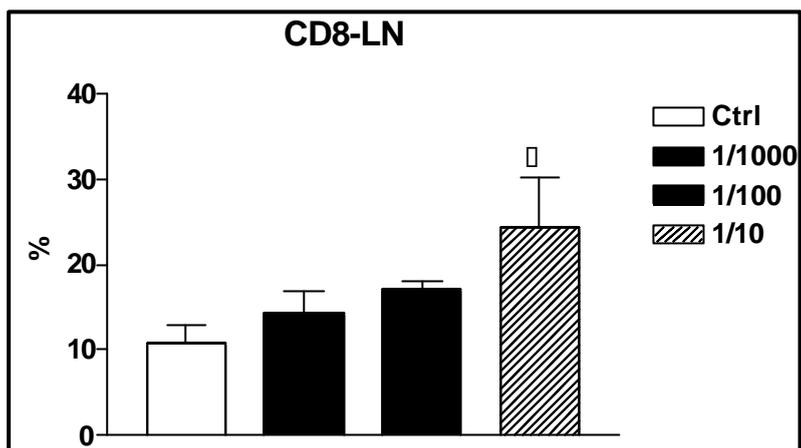


Figura 34. Linfócitos CD8⁺ no linfonodo do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

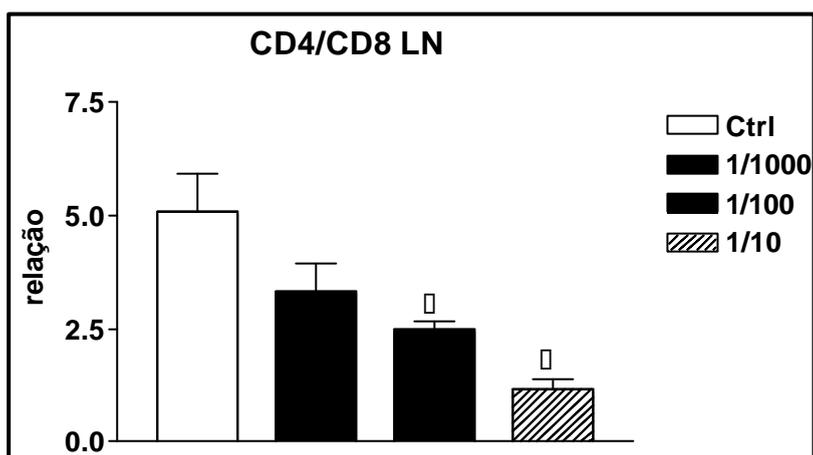


Figura 35. Relação CD4⁺/CD8⁺ no linfonodo do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: *p<0,05, em comparação com o grupo controle).

Tabela 22. Dados referentes ao peso dos linfonodos dos ratos do grupo controle e dos grupos tratados com glifosato.

Grupo	n	X ±epm mg	Mínimo mg	Máximo mg
Controle	10	20 ±2,58	10	30
1/1000	10	73 ±5,78***	50	110
1/100	10	87 ±5,97***	60	110

1/10	8	65,6 ±11,63***	30	120
------	---	----------------	----	-----

Grupo controle: animais que receberam água destilada; Grupos tratados: animais que receberam a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses. "X" representa a média e "epm" o erro padrão da média (Mann-Whitney: ***p<0,0001, em comparação com o grupo controle).

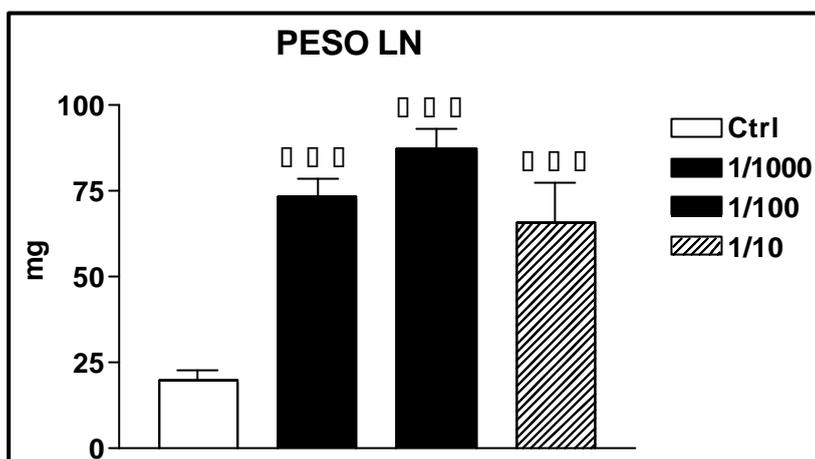


Figura 36. Peso dos linfonodos inguinais do grupo controle e dos grupos tratados com a formulação comercial do glifosato, por via oral, nas respectivas doses de 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto tecnicamente puro, por um período de 75 dias, com intervalo de 48 h entre as doses (Mann-Whitney: ***p<0,0001, em comparação com o grupo controle).



Figura 37. Imagem de linfonodos: grupo controle (A) e tratado com diluição 1/10 DL₅₀ (B).

No que tange as populações de células avaliadas, outros estudos que pesquise aspectos envolvidos na proliferação, diferenciação e a capacidade funcional destas células, devem ser realizados para melhor entender os mecanismos bem como a importância das alterações que o glifosato demonstrou induzir no sistema imune.

Em suma, a administração crônica do glifosato pode mediar efeitos importantes a nível hepático e no perfil hematológico. Assim como a imunidade celular, pela sua ação na população de linfócitos T, principalmente CD4⁺, comprometendo a resposta imune dos animais. O comprometimento na imunidade pode gerar suscetibilidade as infecções e ao desenvolvimento de neoplasias. É possível que a hipertrofia observada com aumento dos linfócitos CD8⁺ nos linfonodos esteja relacionada a alterações de características neoplásicas. Estamos estudando esta hipótese no laboratório por meio da análise semi-quantitativa da expressão dos oncogenes c-myc, c-fos e c-jun, por RT-PCR.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS PARA FUTUTROS TRABALHOS

6.1 CONCLUSÕES

A exposição ao glifosato por 75 dias em doses correspondentes a 1/1000, 1/100 e 1/10 da DL₅₀ do produto, administradas em intervalos de 48 horas, reduziu o ganho de peso dos animais;

O aumento na atividade sérica das enzimas AST e ALT demonstraram que o glifosato apresenta toxicidade para o tecido hepático podendo afetar suas funções;

O aumento aparente do número de células de Kupffer e de reticulina no cortes histológicos de tecido hepático sugere que o glifosato induziu uma resposta do órgão com produção de tecido conjuntivo;

A ALT demonstrou ser um indicador mais sensível da agressão hepática pelo glifosato que a AST e a análise de cortes histológicos corados pela H/E. Entretanto não foi possível estabelecer uma relação direta entre alterações morfológicas (degeneração, necrose) nos hepatócitos e a elevação na atividade séricas das enzimas;

A exposição ao glifosato demonstrou reflexos nos dados hematológicos do sangue periférico com redução do número de eritrócitos, da concentração de hemoglobina e do hematócrito e aumento do RDW, do número de monócitos e granulócitos. Estes resultados são compatíveis com a redução na ingestão de alimentos associada ao processo inflamatório causado pela agressão do glifosato à mucosa gastrointestinal, além de possível interferência na produção de energia, entretanto a possibilidade de efeito tóxico direto ou por outros mecanismos, sobre o tecido hematopoiético não pode ser desconsiderada;

O aumento na concentração sérica da uréia pode representar redução da volemia e conseqüente hemoconcentração nos animais tratados, fato que pode afetar os resultados de alguns parâmetros do sangue, como os do eritrograma;

A observação microscópica de cortes da medula óssea corados pela H/E não demonstrou alterações detectáveis do produto sobre este tecido. Portanto não foi possível estabelecer qualquer relação com as alterações nos dados hematológicos do sangue periférico;

A exposição ao glifosato na diluição 1/10 da DL₅₀ afetou o sistema imune, reduzindo o percentual e o número absoluto de células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico e o percentual das células CD4⁺ no linfonodo, bem como aumentou o percentual de células CD8⁺ neste último;

Os resultados dos valores percentuais das células CD4⁺ e CD8⁺, assim como da relação CD4⁺/CD8⁺ no linfonodo, demonstraram que o mesmo pode evidenciar alterações no sistema imune não detectáveis no sangue periférico, quando são administradas doses menores do glifosato;

A relação CD4⁺/CD8⁺ no linfonodo demonstrou ser o parâmetro da imunidade, dentre os estudados, mais precocemente afetado pela exposição ao glifosato;

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a exposição ao glifosato pode apresentar reflexos negativos sobre a saúde, alguns dos quais ainda não descritos na literatura, como o aumento de reticulina e as alterações nas subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico e nos linfonodos.

6.2 PERSPECTIVAS PARA FUTUTROS TRABALHOS

Avaliar os efeitos do glifosato sobre o trato gastrointestinal em busca de alterações inflamatórias e correlacionar com as determinações de mediadores da inflamação como a IL-1 e o TNF- α , juntamente com medidas que possam confirmar baixa oferta de ferro para eritropoiese como a determinação da concentração do ferro sérico, transferrina, capacidade total de ligação do ferro;

Avaliar a medula óssea por meio de técnicas mais específicas, como imunohistoquímica e culturas primárias para averiguar possíveis alterações na distribuição das populações celulares e na proliferação e/ou diferenciação destas, bem como modificações no microambiente medular que envolvam a disposição de moléculas da matriz extracelular como colágeno (I, II, IV), laminina e fibronectina;

Avaliar o número de células de Kupffer no tecido hepático por técnicas mais apropriadas como a imunohistoquímica (marcação para lisosima) o que pode revelar alterações neste tecido em doses menores que a observada;

Avaliar a hipertrofia dos linfonodos por técnicas histológicas e imunohistoquímicas que possam contribuir para esclarecer a base fisiopatológica das alterações observadas nestes órgãos;

Avaliar aspectos relacionados a proliferação e/ou diferenciação de células T, com dosagens de interleucinas e estudos do timo, assim como testes de resposta a imunização, com o objetivo de esclarecer as modificações constatadas na subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺;

Avaliar a expressão de oncogenes como o c-jun, c-fos e o c-myc, nos tecidos linfóides primário e secundário por técnica RT-PCR, semi-quantitativa.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LITCHTMAN, Andrew H.; POBER, Jordan S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter Ltda., 4. ed. 2003. 544p.

ABUCKLE, Tye; LIN, Zhiqiu; MERY, Leslie S. An exploratory analysis of the effect pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 8, p. 851-857. 2001.

AGCAOILI Mercedita C.; ROSEGRANT, Mark W. World Production of Cereals, 1966-90. **International Food Policy Research Institute (IFPRI)**. Agosto de 1994. Disponível em: <http://www.ifpri.org/2020/briefs/number03.htm>. Acesso em: 19 de junho de 2003.

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

ALVAREZ-SILVA, Márcio; PINAZO, A. C.; EI-CHEIK, M. C.; BOROJEVIC, R. Myelopoietic competence of stroma composed of hepatic granuloma-derived connective tissue cells or skin fibroblasts. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, n. 27, p. 2143-2152. 1994.

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

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

ATHENS, John W. Granulócitos – neutrófilos. In: LEE, Richard G. et al. **Hamatologia clínica**: Wintrobe. São Paulo: Manole, 1998. p. 382-441.

AZEVEDO, Paulo Roberto Gouveia de. **Manual técnico do consultor agroquímico**. São Paulo: Icone, 1995, p. 345-400.

BAKORE, N.; JOHN, P. J.; BHATNAGAR, P. Evaluation of organochlorine insecticide residue levels in locally marketed vegetables of Jaipur City, Rajasthan, India. **Journal of Environmental Biology**, v. 23, n. 3, p. 247-252. 2002.

BARBOSA E. R. et al. Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders**, v. 16, n. 3, p. 565-568. 2001.

BEARD, John et al. Health impacts of exposure pesticide in a cohort of outdoor workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 5, p. 724-730. 2003.

BEÇAK Willy; PAULETE, Jorge. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., v. 1, 1976. 305p.

BENER, A et al. Respiratory symptoms, skin disorders and serum IgE levels in farm workers. **Allergy Immunology**, v. 31, n. 2, p. 52-56. 1999.

BEUTLER, Ernest. morphology of the erythron. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 271-288.

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

BLAIR, Aaron; ZAHM, Shelia Hoar. Agricultural exposure and cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 205-208, 1995. Supplement 8. 1995.

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

BOLOGNESI, Claudia et al. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 45, p. 1957-1962. 1997.

BRASIL. Representação OPAS/OMS. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 1996. 72 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA. Intoxicações por agrotóxicos. In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**, Cap. 5.15, Brasília, p. 1-17. 1998.

BRASIL. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Decreto 4.074 de 04 de janeiro de 2002**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/sda/agrotox_afins.htm. Acesso em: 20 de janeiro de 2003.

BRASIL-MAPA-ANVISA-IBAMA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE). **Sistema integrado de informações sobre agrotóxicos**. sd. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>. Acesso em: julho de 2003.

BRASIL/MINISTÉRIO DA SAÚDE/ANVISA. **Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992-** Anexo III. Brasília, 1992. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/03_92.htm. Acesso em: 20 de janeiro de 2003.

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. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 43-51. 1991.

BUCKLEY, Jonathan D. et al. Pesticide exposure in children with non-Hodgkin lymphoma. **Cancer**, v. 89, n.11, p. 2315-2321, december. 2000.

CABRAS, P.; CONTE, E. pesticides residues in grapes and wine in Italy. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 10, p. 880-885. 2001.

CALDAS, Eloisa Dutra; de SOUZA, Luiz César Kennup R. Avaliação do risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-537. 2000.

CASARETT, L. J. et al. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 1996. 1111p.

CHAN, Po C.; MAHLER, D. V. M. NTP technical report on the toxicity studies of glyphosate (CAS n. 1071-83-6) administered in dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. **Toxicity Reports Series**, n. 16. 1992. 39 p.

CHANG, C. Y. et al. Clinical impact of upper gastrointestinal tract injuries in glyphosate-surfactant oral intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, n. 18, p. 475-478. 1999.

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

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

COLOSIO, Claudio et al. Immune parameters in biological monitoring of pesticide exposure: current knowledge and perspectives. **Toxicology Letters**, n.108, p. 285-295. 1999.

COMPSTON, J. E. et al. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. **Lancet**, v. 354, n. 9192, p. 1791-1792. 1999.

CORTNER Janelle; VANDE WOUDE, Susan; VANDE WOUDE, George F. **Genes involved in oncogenesis**. 1. ed. New York: Academic Press. 1997. p. 52.

CRAWFORD, James M. Fígado e vias biliares. In: COTRAN, Ramzi S.; KUMAR, Vinay; ROBBINS, Stanley L. **Robbins Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5. ed. 1996. p. 743-805.

CREMLYN, Richard James. Introduction: historical aspects. In: _____. **Agrochemicals: preparation and mode of action**. 1. ed. Cichester: John Wiley & Sons. 1991. p. 1-15.

CRISOLIA, Cesar Koppe. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, n. 518, p. 145-150. 2002.

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

DACASTO, M.; NEBIA, C; BOLLO, E. In vitro effects of triphenyltin acetate (TPTA) on mouse lymphocyte proliferation. **Toxicology in Vitro**, n. 15, p. 343-346, 2001.

DALLEGRAVE, Eliane et al. The teratogenic potential of herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, n. 142, p. 45-52. 2003.

DALVIE A. Mohamed et al. Contamination on rural surface and ground water by endosulfan in farming areas of the Western Cape, South Africa. **Environment Health: A Global Access Science Source**, v. 2, n.1, p. 1-15. 2003.

DARUICH, Jorgelina; ZURULMIK, Fanny; GIMENEZ, María Sofía. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environmental Research Section A**, n. 85, p. 226-231. 2001.

DEARSTYNE, E. A.; KERKVLIT, N. I. Mechanism of 2,3,7,-8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced decrease in anti-CD3-activated CD4(+) T cells: the roles of apoptosis, Fas and TNF. **Toxicology**, v. 170, n. 1-2, p. 139-151, 2002.

DINHAM, B. Growing vegetables in developing countries for local urban populations and export markets: problems confronting small-scale producers. **Pest Management Science**, v. 59, n. 5, p. 575-82, maio. 2003.

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

ECOBICHON, Donald J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, n. 160, p. 27-33. 2001.

EDLESTON, Michael et al. Pesticide poisoning in the developing world – a minimum pesticides list. **The Lancet**, v. 360, n. 12, p. 1163-1167. 2002.

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

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

FAILACE, Renato. **Hemograma – manual de interpretação**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed. 2003. 298 p.

FAIRBANKS, Virgil F.; BEUTLER, Ernest. Iron metabolism. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 295-304.

FAKOYA, F.A.. Reticulin fibres in the tunica albuginea and peritubular tissue of seminiferous tubules of adult male Wistar rats. **Acta Histochemica**, n. 104, p. 279-283, 2002.

FAN, Fang; WIERDA, Daniel; ROZMAN, Karl K. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on humoral and cell-mediated immunity in Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, n. 106, p. 221-228, 1996.

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

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

FARAHAT, T. M. et al. Neurobehavioral effects among workers occupationally exposed to organophosphorous pesticides. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 4, p. 279-286. 2003.

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

FLEMING L. E. et al. Cancer incidence in a cohort of licensed pesticide applicators in Florida. **Journal Occupational Environmental Medicine**, v. 41, n. 4, p. 279-288. 1999.

FOUCAR, Kathryn. Bone marrow examination: indications and techniques. In: _____. **Bone Marrow Pathology**. Chicago: ASCP Press, 2. ed. 2001. p. 31-47.

GAYOTTO, Luis Carlos C.; VIANNA, Maria Regina. Fígado e vias biliares. In: FARIAS, José Lopes et al. **Patologia especial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed. 1999. p. 321-342.

GHANY, Marc; HOOFNAGLE, Jay H. Doenças do fígado e trato biliar. In: BRAUNWALD, Eugene et al. **Medicina interna: Harryson**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 15. ed. 2002. p. 1808-1812.

GOLDSMITH D. F. Epidemiology research prospects linking pesticide exposures and cancer risks. **Rev. Toxicol.**, n. 2, p. 17-36. 1998.

GRANBY, Kit; VAHL, Martin. Investigation of the herbicide glyphosate and the plant growth regulators chlormequat and mepiquat in cereals produced in Denmark. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 10, p. 898-905. 2001.

HABERMANN, T. M.; STEENSMA, D. P. Lymphadenopathy. **Mayo Clin Proc**, n. 75, p. 723-732, 2000.

HARDELL, Lennart; ERIKSSON, Mikael. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. **Cancer**, v. 85, n. 6, p. 1353-1360, março. 1999.

HARKNESS, John E.; WAGNER, Joseph E. Clinical procedures. In: _____. **The biology and medicine of rabbits and rodents**. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 81, 94, 134.

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

HENRY, John Bernard; KUREC, Anthony S. O laboratório clínico: organização, propósitos e prática. IN: HENRY, John Bernard. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 2. ed brasileira. São Paulo: Manole, 1999. p. 24.

HOAR, Scheila K. et al. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. **JAMA**, v. 256, n. 9, p. 1141-1147. 1986.

IBGE. **Dados históricos dos censos**. População residente, por situação do domicílio e por sexo – 1940-1996. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 08 de junho de 2003.

IBGE. **Anuário estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro:IBGE, 1963, p. 60.

IBGE/DIRETORIA DE PESQUISAS/DEPARTAMENTO DE AGROPECUÁRIA. **Produção agrícola municipal 2001**. IBGE, 2001. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/tabela1pam_2001.shtm. Acesso em: 11 de junho de 2003.

IBMA. **Portaria normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2003.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas 2003**. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativas/tbregioes_consolidado.asp?ID=1. Acesso em: 23 de junho 2003.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Previsão e acompanhamento de safras. **Uso de agrotóxicos no Estado do Paraná**. Safra 1998/1999. Rio de Janeiro, 2001. 48p.

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

JEYARATNAM, J. Occupational health issues in developing countries. **Environmental Research**, n. 60, p. 207-212. 1993.

KEMPLE, Megan. ABCs of toxicology – basic definitions. **Journal of pesticide reform**, v. 21, n. 4, p. 22-23. 2001.

KIER, L. D. et al. Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor herbicides formulation. **Fundamental and applied toxicology**. v. 36, n. 1, p. 305. 1997. Part 2.

KIPPS, Thomas J. Lymphocytosis and lymphocytopenia. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001a. p. 949-958.

KIPPS, Thomas J. Functions of T lymphocytes: T-cell receptors for antigen. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001b. p. 969-971.

KJELDSBERG, Carl R. Princípios do exame hematológico. In: LEE, Richard G. et al. **Hamatologia clínica**: Wintrobe. São Paulo: Manole, 1998. p. 07-41.

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

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

LARINI, Lourival. Herbicidas. In:_____. **Toxicologia dos praguicidas**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 178-179.

LEE, H. L. et al. Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant oral intoxication: a review 131 cases. **Academic Emergency Medicine**, n. 7, p. 906-910. 2000.

LEE, Richard G. Fatores nutricionais na produção e função dos eritrócitos In: LEE, Richard G. et al. **Hamatologia Clínica**: Wintrobe. São Paulo: Manole, 1998. p. 166-207.

LEHRER, Robert I.; GANZ, Tomaz. Biochemistry and function of monocytes and macrophages. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 865-871.

LEWIN, Benjamin. Oncogenes and cancer. In: _____. **Genes VI**. 6. ed. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 1131-1134.

LIOI, M. B. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. **Mutation Research**, n. 403, p. 13-20. 1998b.

LIOI, Maria B. et al. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 39-46. 1998.

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

MAGE, David T. et al. A model for predicting the frequency of high pesticide exposure events in the agricultural health study. **Environmental Research**, n. 83. 2000. p. 67-71. Section A.

MARC, Julie et al. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chemical Research in Toxicology**, n. 15, p. 326-331. 2002.

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

MARONI, MARCO; FAIT, ANTONELLA; COLOSIO, CLAUDIO. Risk and management of occupational exposure to pesticides. **Toxicology Letters**, n.107, p. 145-153. 1999.

MATHUR, V. et al. Breast cancer incidence and exposure to pesticides among women originating from Jaipur. **Environment International**, v. 28, n. 5, p. 331-336. 2002.

MEKONNEN, Y.; AGANOFIR, T. Effects of pesticides applications on respiratory health of Ethiopian farm workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 8, n.1, 35-40. 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA/SECRETARIA DE POLÍTICA AGRÍCOLA. **Meios de produção**. 2003. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/ch01/1_6.xls. Acesso em: 08 de junho de 2003.

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

MONSANTO. 90 day study glyphosate administered in feed to Sprague-Dawley rats (Project n. ML-86-351/EHL 86128). St. Louis, Missouri, Monsanto environmental Health Laboratory (Unpublished report n. MSL-7575, submitted by Monsanto Ltda), 1987. Apud: WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental health criteria 159: glyphosate**. Geneva, 1994. 177p.

MOTTA, Valter T. Aminotranferases. In: _____. **Bioquímica clínica para o laboratório**. 4. ed. Caxias do Sul: Editora Médica Missau, 2003. p. 117-118.

NEUBERT, R., et al. Polyhalogenated dibenzo-p-dioxins e dibenzofurans and the immune system. Effects of multiple-dose treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*). **Archives of Toxicology**, v.66, n. 4, p. 250-259, 1992.

OLORUNSOGO, O. O. Inhibition of energy-dependent transhydrogenase reaction by N-(phosphonomethyl) glycine in isolated rat liver mitochondria. **Toxicology Letters**, v. 10, n. 1, p. 91-95. 1982.

OMENN, Gilberts. Cancer prevention. In: GOLDMAN, Lee; BENNET, J. Claude. **Cecil Textbook of medicine**. 21. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p. 1033-1035.

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

PARASKEVAS, Frixos; FOERSTER, John. Os linfócitos. In: LEE, Richard G. et al. **Hamatologia clínica**: Wintrobe. São Paulo: Manole, 1998. p. 382-441.

PARISE, Leslie V.; SMITH, Susan S.; COLLIER, Barry S. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 1357-1408.

PINCUS, Mathew R.; SCHAFFNER, John A. Avaliação da função hepática. In: HENRY, John Bernard. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 2. ed. brasileira. São Paulo: Manole, 1999. p. 253-267.

RECCIO, R. et al. Organophosphorous pesticide exposure increases of the frequency of sperm sex null aneuploidy. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 12, p. 1237-1240. 2001.

ROIT, Ivan; BROSTOF, Jonathan; MALE, David. Imunidade inata e adaptativa. In: _____. **Imunologia**. São Paulo: 5. ed. 1999. p. 1.1-1.10.

RYAN, Daniel H. Examination of the blood. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 09-16.

SHATTIL, Sanford J.; ABRAMS, Charles S.; BENNETT, Joel S. Acquired qualitative platelet disorders due to diseases, drugs, and foods. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 6. ed. 2001. p. 1583-1603.

SIMONE, Joseph V. Oncology. In: GOLDMAN, Lee; BENNET, J. Claude. **Cecil Textbook of medicine**. 21. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. p. 1029.

SINITOX. **Tabulação a nível nacional.** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox/>. Acesso em: 20 de junho 2003.

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

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

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

STILLER-WINKLER, Renate et al. Immunological parameters in humans exposed to pesticides in the agricultural environment. **Toxicology Letters**, n. 107, p. 219-224. 1999.

TALBOT, A. R. et al. Acute poisoning with a glyphosate-surfactant herbicide ('Roundup'): a review of 93 cases. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 01-08. 1991.

TAPPE, W.; GROENEWEG, J.; JANTSCH, B. Diffuse atrazine in German aquifers. **Biodegradation**, v. 13, n. 1, p. 3-10. 2002.

The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. **Oncogene**, n. 21, p. 3414-3421. 2002.

TSUKUMO, Shin-ichi et al. Skewed differentiation of thymocytes toward CD8 T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires activation of the extracellular signal-related kinase pathway. **Archives of Toxicology**, n. 76, p. 335-343, 2002.

U. S. CENSUS BUREAU – INTERNATIONAL DATA BASE. **Total midyear population for the world: 1950-2050.** 2002. Disponível em <http://www.Census.gov/ipc/www/worldpop.html>. Acesso em: 10 de junho de 2003.

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

WALSH, et al. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 8. 2000.

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

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

WHALEN, Margaret M. et al. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. **Chemico-Biological Interactions**, n. 145, p. 311-319, 2003

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

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

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

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

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

WILLIAMS, Gary M.; KROES, Robert; MUNRO, Ian C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and pharmacology**, n. 31, p. 117-165. 2000.

ZANIN, Marlene (coordenadora); NIEWEGLOWSKI, Ana M.; MEDEIROS, Maria L., SLISZ, Reinaldo; FOWLER, Rossana; CAVALET, Valdo e ZAPPIA, Vania – **Agrotóxicos: a realidade do Paraná**. Curitiba: Edição da Secretaria do Meio Ambiente do Paraná, 1992. 93 p.

8 ANEXOS

8.1 REAGENTES

- Ácido clorídrico (Merck)
- Ácido oxálico (Nuclear)
- Azida de sódio (Merck)
- Cloreto de ouro (Synth)
- Cloreto de potássio (Nuclear)
- Cloreto Sódio (Nuclear)
- EDTA tetrassódico (Vetec)
- Eosina amrela (Merck)
- Fosfato de potássio monobásico (Vetec)
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec)
- Hematoxilina (Merck)
- Hidróxido de amônia (Nuclear)
- Hidróxido de potássio (Nuclear)
- Isoton (Biotec)
- Solução lisante diferencial (Biotec)
- Nitrato de prata (Nuclear)
- Óxido vermelho de mercúrio (Nuclear)
- Paraformaldeído (Reagen)
- Permanganato de potássio (Nuclear)
- Sulfato de ferro amoniacal (Merck)
- Tartarato de sódio e potássio (Vetec)
- Tiosulfato de sódio (Vetec)

8.2 SOLUÇÕES

Ácido Oxálico 5%:

Ácido Oxálico..... 5,0 g
Água destilada qsp.....100 mL

Alúmem de ferro 5%:

Alúmem de ferro (sulfato de ferro amoniacal).....	5,0 g
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

Cloreto de ouro 0,2%

Cloreto de ouro.....	0,2 g
Água destilada q.s.p....	100,0 mL

Permanganato de potássio 0,5%:

Permanganato de potássio.....	0,5 g
Água destilada qsp.....	100,0 mL

Solução de Gomori:

Hidróxido de potássio10%.....	10,0 mL
Nitrato de Prata 10%.....	50,0 mL

OBS. Forma-se um precipitado cinza que deverá ser dissolvido acrescentando-se hidróxido de amônia concentrado gota a gota. Feita a dissolução completa, o líquido obtido transparente deverá ser acrescido de nitrato de prata 10%, gota a gota, até não mais haver reabsorção do nitrato, ficando de cor pardacenta. Diluir o reagente em uma proporção de 1:1 em água destilada.

Tiosulfato de sódio 5%

Tiosulfato de sódio	0,5 g
Água destilada qsp.....	100,0 mL

Hematoxilina

Hematoxilina.....	5 g
Álcool absoluto.....	50 mL
Alúmem de potássio.....	100 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL
Óxido Vermelho de Mercúrio.....	2,5 g

Preparo:

Dissolver a Hematoxilina no álcool absoluto. O Alúmem deve ser dissolvido na água destilada á quente até a dissolução total do sal. Deixar em repouso 24 horas.

Misturar as duas soluções e acrescentar o óxido vermelho de mercúrio. Lavar ao fogo e deixar ferver por 5 minutos. Pronto para uso após 24 horas.

Eosina

Eosina amarelada hidrossolúvel.....	1 g
Água destilada.....	20 mL
Álcool 95° GL.....	180 mL

Preparo:

Dissolver a eosina na água destilada e acrescentar o álcool.

Diferenciador álcool-ácido

Álcool 70° GL	100 mL
Ácido clorídrico	1 mL

Solução descalcificadora

EDTA tetrassódico	700 mg
Tartarato de sódio e potássio	8 mg
Tartarato de sódio	140 mg
Ácido clorídrico	99,2 mL
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

PBS/EDTA

PBS/EDTA 1X	100 mL
EDTA.....	150 mg

PBS/EDTA/AZIDA/SAB

PBS 1x.....	100 mL
EDTA.....	1850 mg
Azida de sódio.....	10 mg
SAB (soroalbumina bovina).....	1 g

Paraformaldeio 4%

PBS 1X.....	100 mL
Paraformaldeio.....	4 g

OBS: Dissolver o paraformaldeído em PBS aquecido a 70⁰ C.

PBS pH 7,2

Cloreto de sódio.....	8 g
Cloreto de potássio.....	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico.....	2g
Fosfato de potássio monobásico.....	0,2 g
Água q..p.....	1000 mL

Formol tamponado 10%

Formaldeído 40%.....	10 mL
PBS 1x pH 7,2.....	90 mL

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina.....	5,0 g
Álcool Absoluto.....	50,0 mL
Álumem de potássio.....	100,0 g
Óxido vermehlo de mercúrio.....	2,5 g
Água destilada q.s.p.....	1000,0 mL

Preparo: Dissolver a hematoxilina e o alúmem na água destilada à quente até a dissolução total do sal. Deixar em repouso 24 horas. Misturar as duas soluções e

acrescentar o óxido vermelho de mercúrio. Levar ao fogo e deixar ferver por 5 minutos. Pronto para uso após 24 horas.

8.3 COLORAÇÕES

Hematoxilina e Eosina

- Xilol: 04 (quatro) banhos de cinco minutos cada;
- Álcool absoluto: dois banhos dois minutos cada;
- Álcool 90° GL: dois minutos;
- Álcool 80° GL: dois minutos;
- Álcool 70° GL: dois minutos;
- Água corrente: cinco a dez minutos;
- Hematoxilina de Harris: trinta segundos a dois minutos;
- Água corrente: dois minutos;
- Diferenciador álcool-ácido: duas imersões rápidas;
- Água corrente: oito minutos;
- Eosina: trinta segundos a um minuto;
- Alcool 70° GL: três imersões;
- Alcool 80° GL: três imersões;
- Alcool 90° GL: três imersões;
- Alcool absoluto: três imersões;
- Xilol 1: três mergulhos;
- Xilol 2: três mergulhos;
- Xilol 3: três mergulhos;
- Xilol 4: três mergulhos;
- Montagem da lâmina.

Reticulina

- Desparafinizar e
 - Xilol: quatro banhos de cinco minutos cada;
 - Álcool etílico absoluto: quatro banhos de dois minutos cada.

- Lavar em água destilada: duas imersões rápidas;
- Imergir as lâminas em solução permanganato de potássio 0,5% durante dois minutos;
- Lavar em água destilada: duas imersões rápidas;
- Imergir as lâminas em solução de ácido Oxálico 5%, até retirada do permanganato residual;
- Lavar em água destilada duas imersões rápidas;
- Imergir as lâminas em solução de Alunem de ferro 5% durante dois minutos;
- Lavar em água destilada: duas imersões rápidas;
- Imergir as lâminas em solução de Gomori durante dois minutos;
- Lavar em água destilada com duas imersões rápidas;
- Imergir as lâminas em Formol tamponado 10%, durante cinco minutos;
- Lavar em água corrente durante dois minutos;
- Solução diferenciadora de cloreto de ouro 0,2% uma imersão rápida;
- Lavar em água destilada: duas imersões rápidas;
- Tiosulfato de sódio 5%: três imersões rápidas;
- Álcool etílico absoluto: quatro imersões rápidas;
- Xilol: quatro imersões rápidas;