

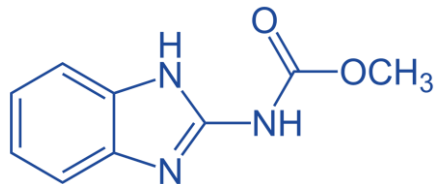
REAVLIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO INGREDIENTE ATIVO

CARBENDAZIM

Agenda Regulatória 2021-2023: Tema nº 2.4
CREAV/GEMAR/GGTOX
Terceira Diretoria

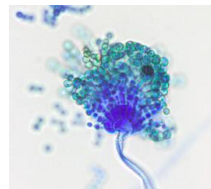


GRUPO QUÍMICO



Benzimidazois

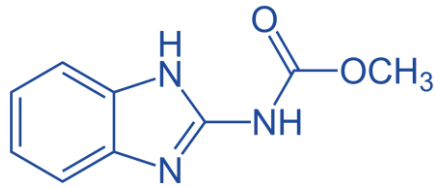
ALVO



**Fungicida sistêmico
de amplo espectro**

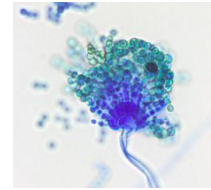


GRUPO QUÍMICO



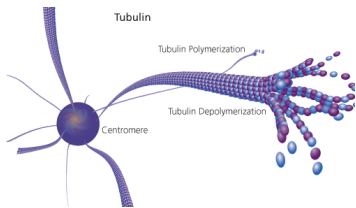
Benzimidazois

ALVO



**Fungicida sistêmico
de amplo espectro**

MODO DE AÇÃO

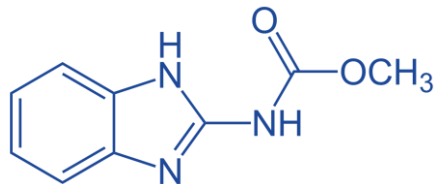


**Inibe a formação da
tubulina: destruição
dos fusos e
microtúbulos**

**Danos à divisão celular e
outras funções
relevantes**

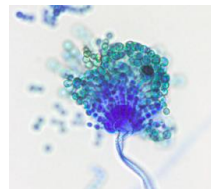


GRUPO QUÍMICO



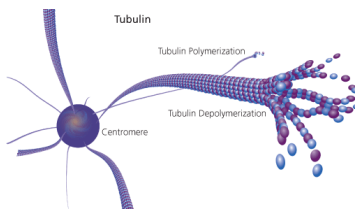
Benzimidazois

ALVO



**Fungicida sistêmico
de amplo espectro**

MODO DE AÇÃO



**Inibe a formação da
tubulina: destruição
dos fusos e
microtúbulos**

**Danos à divisão celular e
outras funções
relevantes**

USOS



Foliar

**Algodão, cana, cevada,
citros, feijão, maçã, milho,
soja e trigo**



**Tratamento
de sementes**

**Algodão, arroz, feijão,
milho e soja**



**Preservativo
de madeira**

Não agrícola



O Carbendazim no Mundo

Reavaliações recentes: EUA (USEPA, 2020), Canadá (PMRA, 2019), Europa (EFSA, 2015) e Austrália (2012)



Não possui registro para culturas alimentares

Carcinogênico

Mutagênico

Toxicidade reprodutiva

Não aprovado

Mutagênico

Toxicidade reprodutiva

Aprovado - Restrições de uso

Toxicidade reprodutiva



O Carbendazim no Brasil



16° agrotóxico mais comercializado (2019)

33 produtos técnicos

41 produtos formulados

25 empresas detentoras de registro



Restrições – reavaliação de 2002

Cancelamento da autorização de uso por equipamento manual e costal



Novas reavaliações (2019) - 1º selecionado após aplicação de matriz de risco à saúde

Suspeita de carcinogenicidade, mutagenicidade, toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento



Dados de Exposição



SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

72 notificações de exposição (2008 a 2018)



Exposição ocupacional

APVMA, PMRA e USEPA: relevante para diversos cenários



SISAGUA

63.317 amostras analisadas (2014-2019)

9.784 (15,45%) com detecção de Carbendazim



PARA – Programa de Análise de Resíduos em Alimento

	2013-2015 25 culturas	2017-2018 14 culturas
% de amostras com CBZ	24%	11%
% de amostras insatisfatórias (>LMR/não autorizado)	3,06%	1,34%



Panorama da Documentação da Reavaliação



Dados e informações
recebidos

**346 documentos
analisados**

- ✓ Artigos científicos (144)
- ✓ Estudos regulatórios (20)
- ✓ Relatórios com avaliação toxicológica (53)
 - Empresas registrantes (5)
 - Agências reguladoras (46)
 - PARA (2)
- ✓ Bancos de dados (2)
 - Sinan – intoxicações
 - Siságua – níveis de CBZ em água
- ✓ Contribuições da Consulta Pública (69)
- ✓ Documentos e relatórios enviados na CP (5)

Reavaliação iniciada em
dez/2019



2 anos e 6
meses

Documentos gerados
pela área técnica

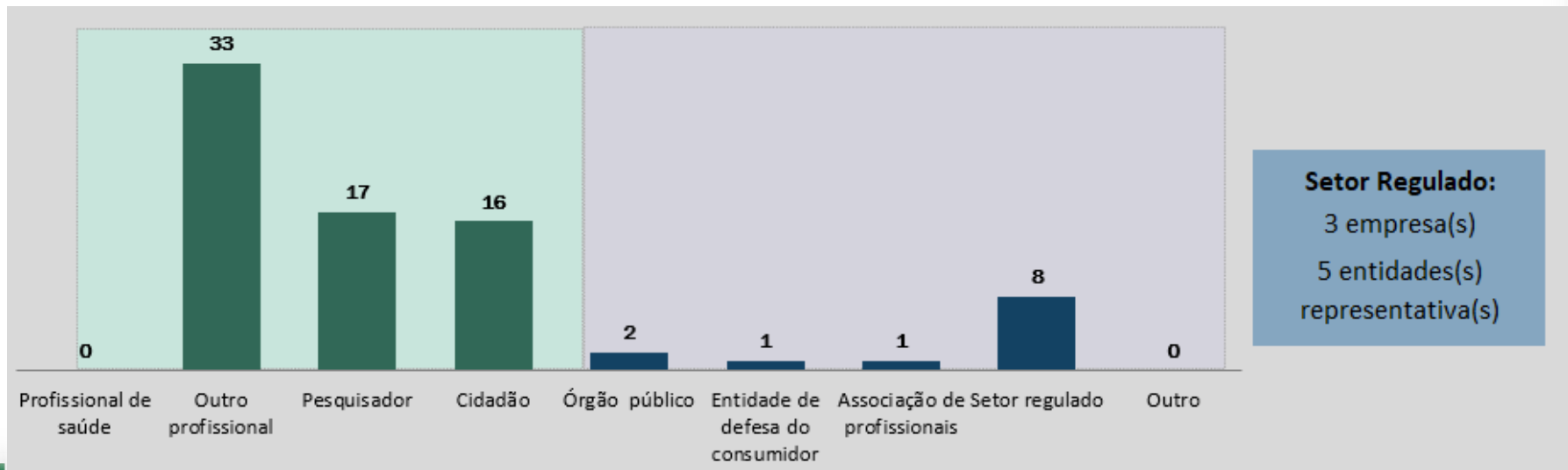
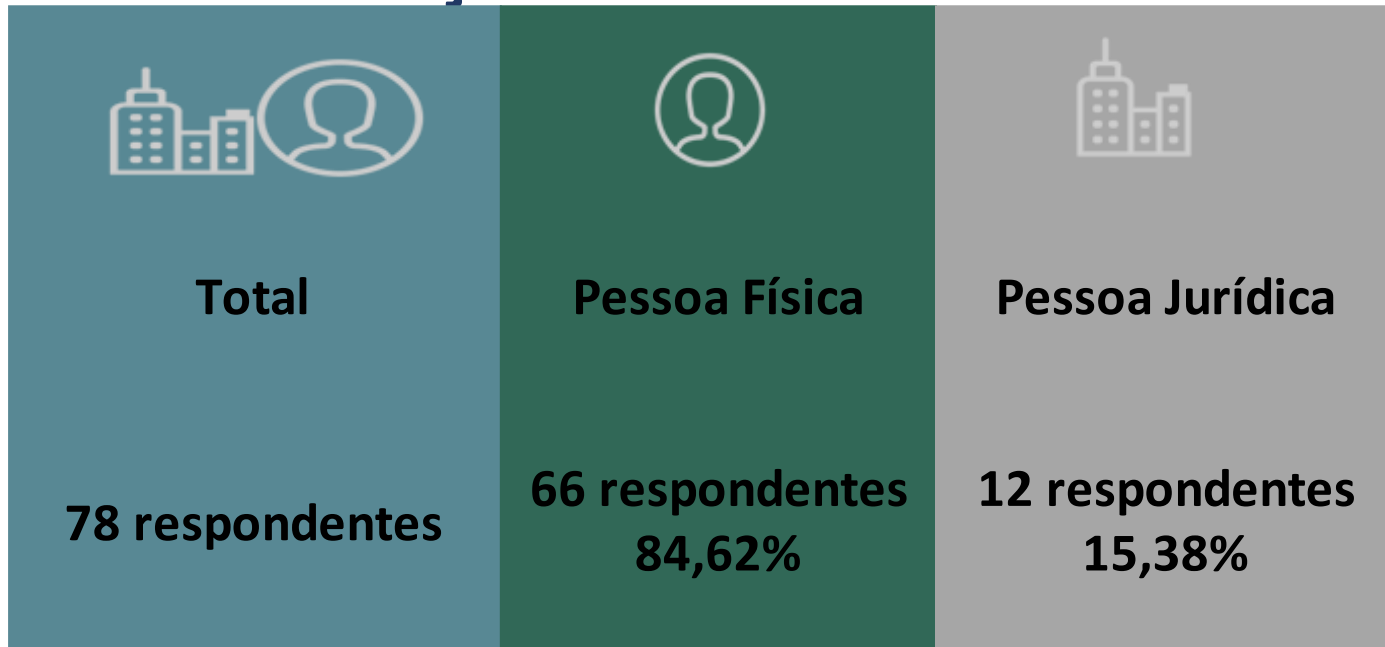


**15 documentos
técnicos produzidos**

- ✓ Pareceres técnico-científicos (10)
 - ✓ Relatório de AIR – parcial (1)
 - ✓ Notas técnicas (2)
- ✓ Planilha de análise das contribuições (1)
 - ✓ Minutas de RDC (2)



Análise das Contribuições da Consulta Pública 1.099/22



Análise das Contribuições da Consulta Pública 1.099/22

Aspectos Toxicológicos – estabelecer limiar de dose e avaliação do risco

Não acatada: sem alterações quanto aos aspectos toxicológicos

Prazos de eliminação gradual – 28 meses para a produção e importação
36 meses para exportação

Não acatada: excessivos frente às características toxicológicas

Preservativos de madeira – legislação de agrotóxicos não aplicável

Acatado: não extensão da proibição para estes produtos

Impactos agronômicos, econômicos e concorrenciais

Não acatada: mas considerados na proposta de eliminação gradual



Resultado da Análise das Diligências

MAPA e EMBRAPA

✓ Impactos agronômicos

- Há substitutos disponíveis
- Importante manter o tratamento de sementes para a próxima safra

✓ Impactos econômicos mínimos (MAPA)

- Maior custo do tratamento fitossanitário, principalmente para feijão (4 a 10%)

✓ Discussão técnica sobre prazos de eliminação gradual (MAPA)



Resultado da Análise das Diligências

IBAMA

- ✓ **Destinação adequada**
 - Uso até esgotamento – minimizar eventuais danos ambientais

Ministério da Saúde

- ✓ **Exposição no tratamento de sementes**
 - Não há como garantir ausência de exposição aos trabalhadores na indústria de tratamento de sementes
 - Uso de EPI não garante que não haverá exposição



Resultados da Análise dos Desfechos Proibitivos

Desfecho	Classificação	Limiar de Dose
Carcinogenicidade	Categoria 1B Presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos	> 0,0225 mg/kg p.c./dia
Mutagenicidade	Categoria 1B Presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos	Não foi possível definir um limiar de dose
Toxicidade reprodutiva	Categoria 1B Presumidamente possui potencial de causar toxicidade reprodutiva para seres humanos	Não foi possível definir um limiar de dose



Resultados da Análise dos Desfechos Proibitivos

Avaliação Toxicológica Internacional e da Anvisa

Desfecho	USEPA (EUA)	PMRA (Canadá)	APVMA (Austrália)	EFSA (Europa)	ANVISA
Carcinogenicidade	Possivelmente carcinogênico	Possivelmente carcinogênico	Não carcinogênico	Não carcinogênico	Presumidamente carcinogênico
Mutagenicidade	Aneugênico	Aneugênico	Aneugênico	Aneugênico	Aneugênico
Toxicidade Reprodutiva	Tóxico para a reprodução	Tóxico para a reprodução	Tóxico para a reprodução	Tóxico para a reprodução Cat. 1B	Tóxico para a reprodução Cat. 1B



Conclusões

Carbendazim possui evidências de carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva

Não foi possível encontrar um limiar de dose seguro para a população:

Mutagenicidade

Toxicidade reprodutiva

Exposição relevante dietética e ocupacional



Medidas de mitigação



Proibir o Carbendazim como ingrediente ativo de agrotóxicos no Brasil

- ✓ Realizar a **eliminação gradual** de agrotóxicos contendo Carbendazim
- ✓ Excluir as tecnologias de aplicação manual costal, semiestacionária, estacionária e por tratores de cabine aberta – **proteção da saúde do trabalhador** durante o período de descontinuação de uso
- ✓ Manter informações de uso agrícola na monografia C24 até 01/12/2024 - exclusivamente para monitoramento de resíduos em alimentos

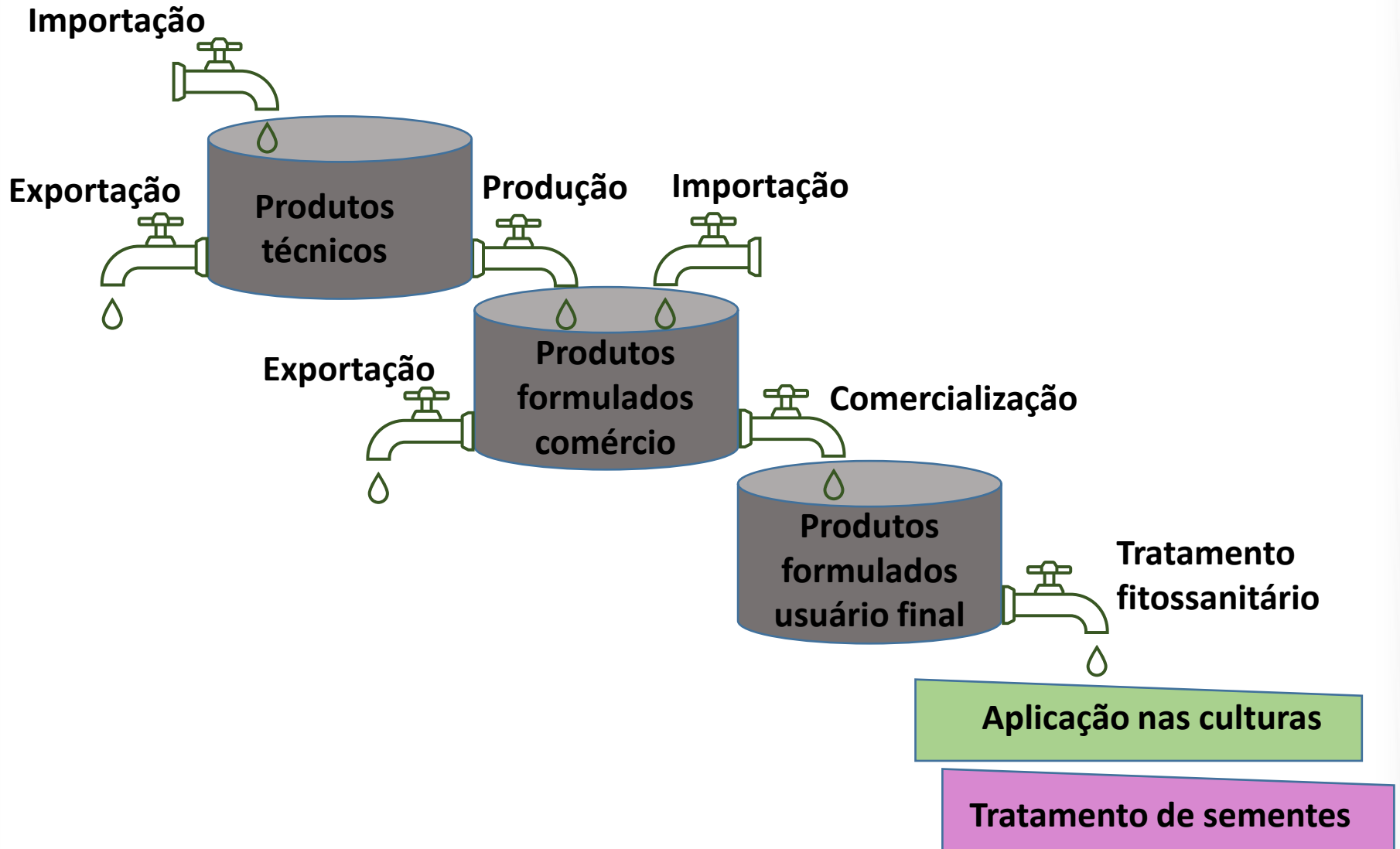


Medidas de mitigação

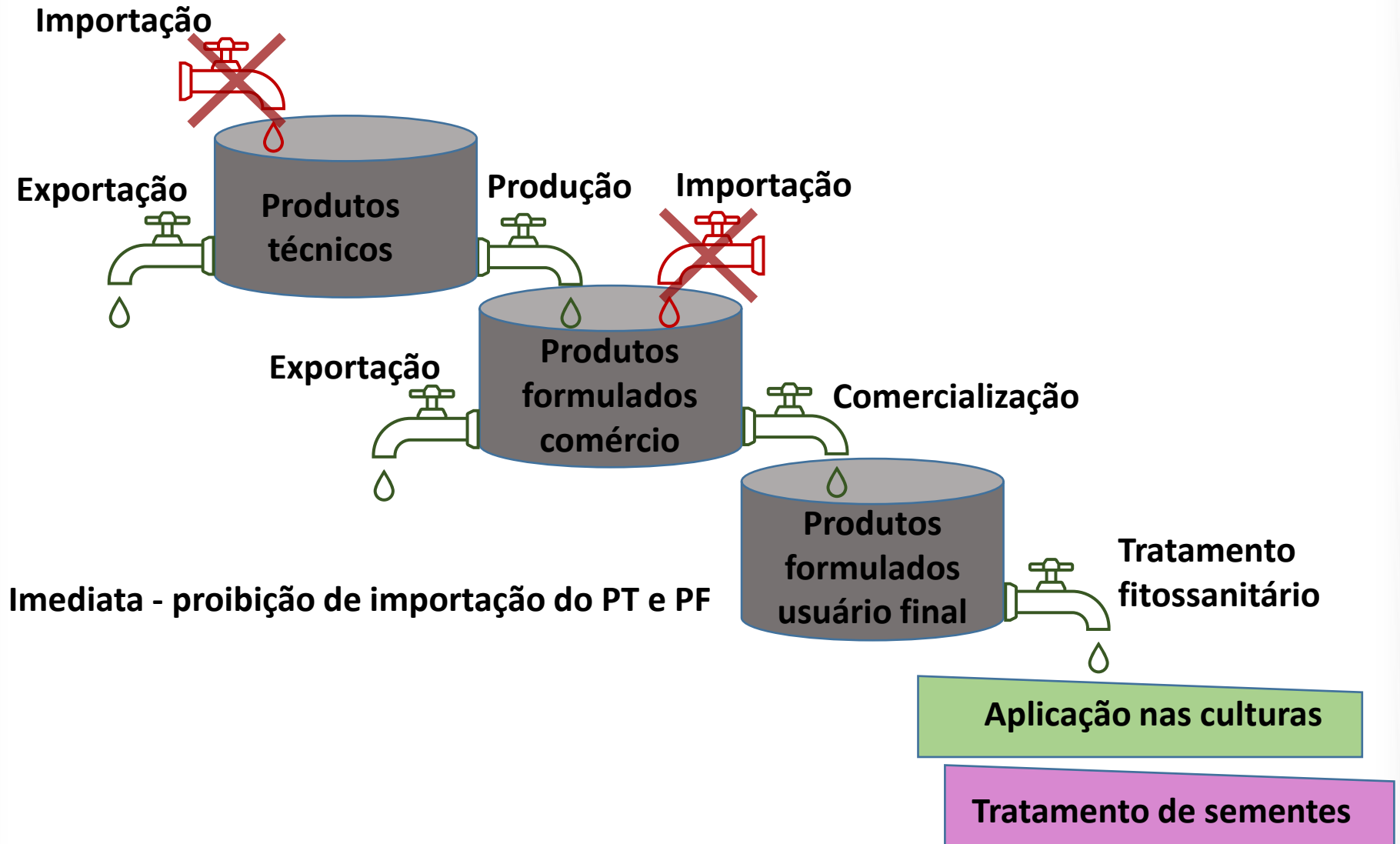
- ✓ **Por que a eliminação gradual é a medida regulatória mais adequada?**
 - **Reduz impactos ambientais**
 - **Incineração pode gerar poluentes**
 - **Descarte ou armazenamento descontrolado**
 - **Permite a uso correto**
 - **Minimização da exposição ocupacional**
 - **Manutenção das doses indicadas**
 - **Evita a ampliação do uso para culturas não autorizadas**
 - **Medida adotada internacionalmente e pela Anvisa**



Eliminação gradual



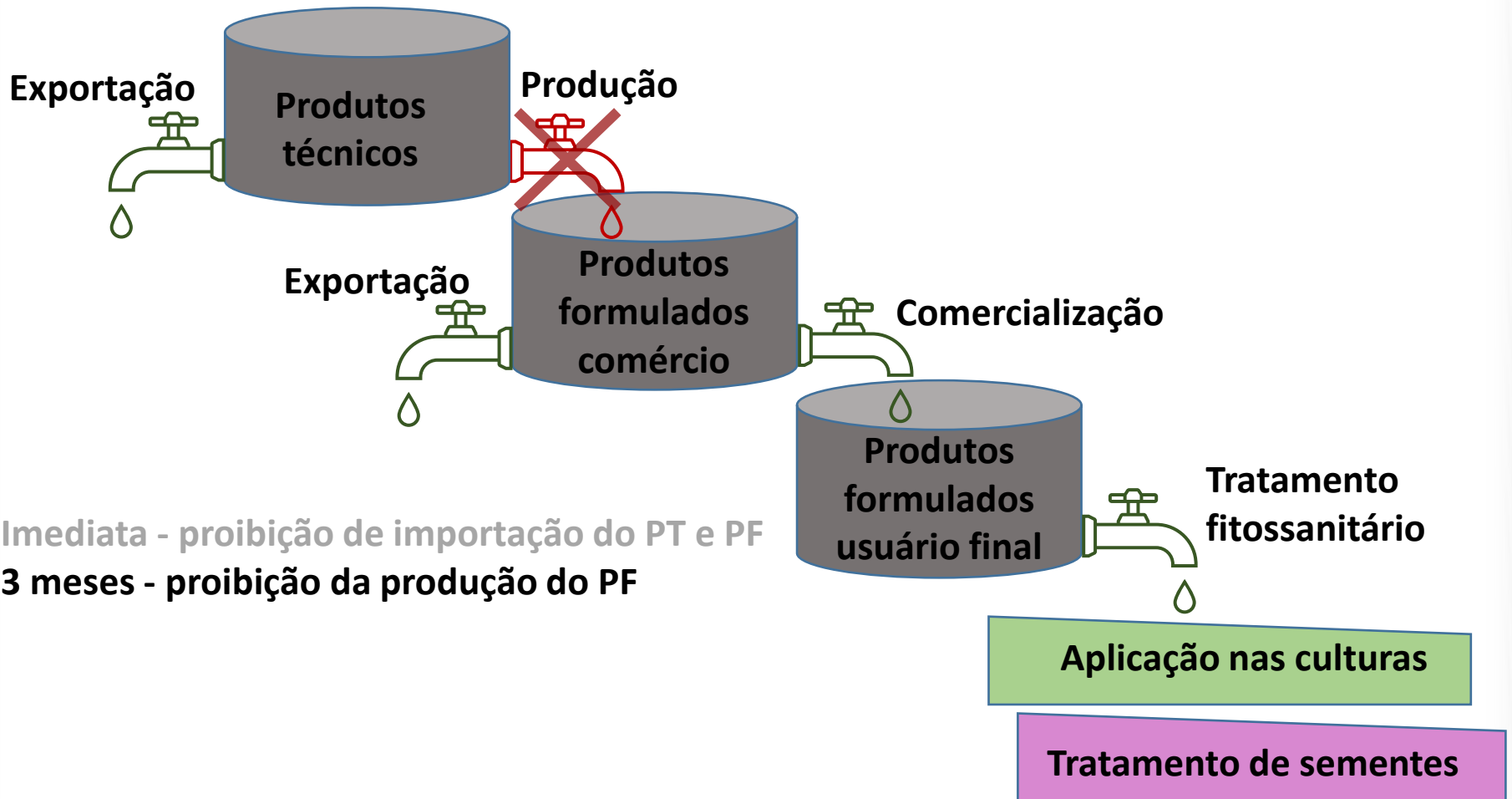
Eliminação gradual



PT = produto técnico
PF = produto formulado



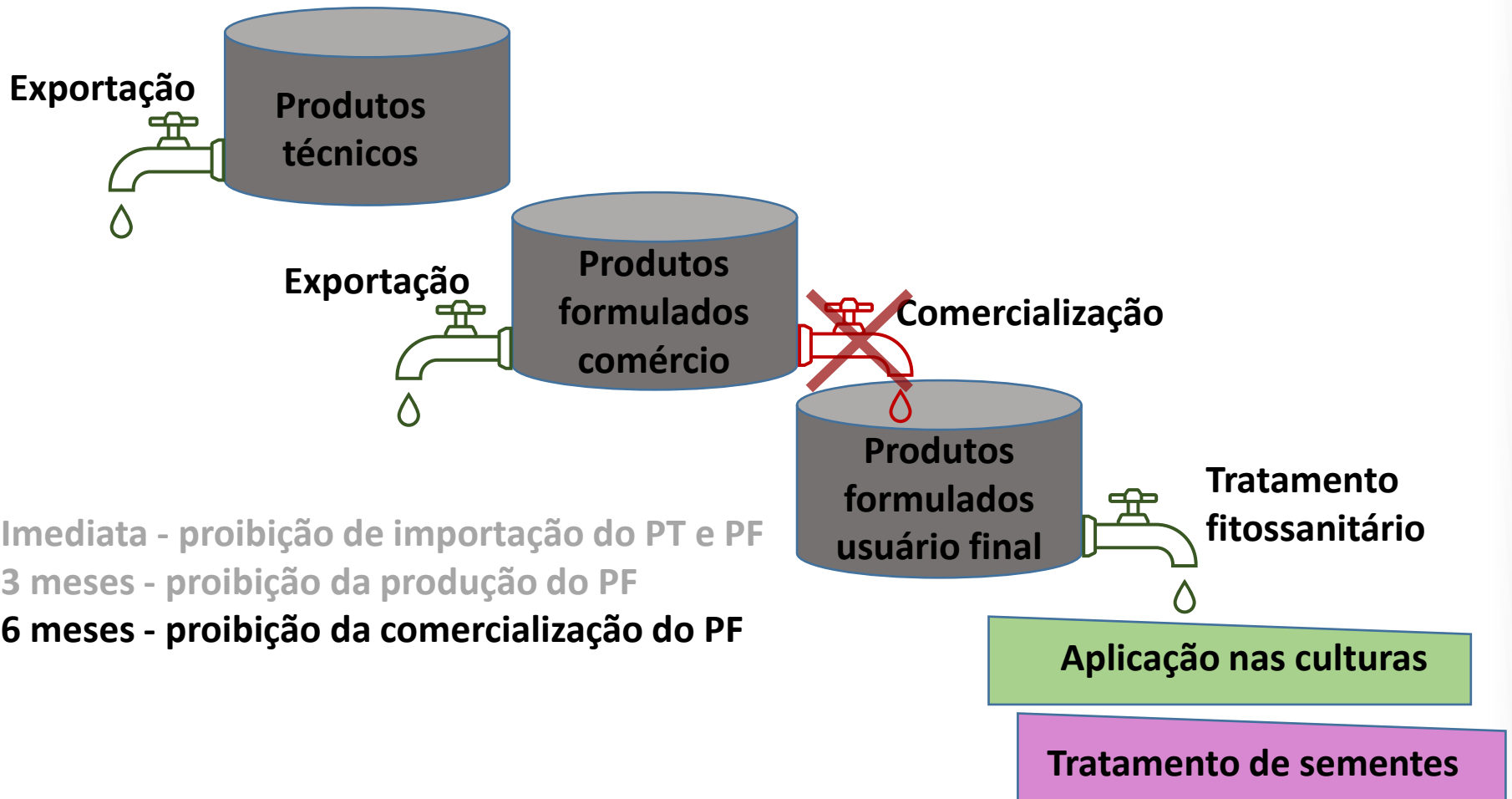
Eliminação gradual



Imediata - proibição de importação do PT e PF
3 meses - proibição da produção do PF



Eliminação gradual

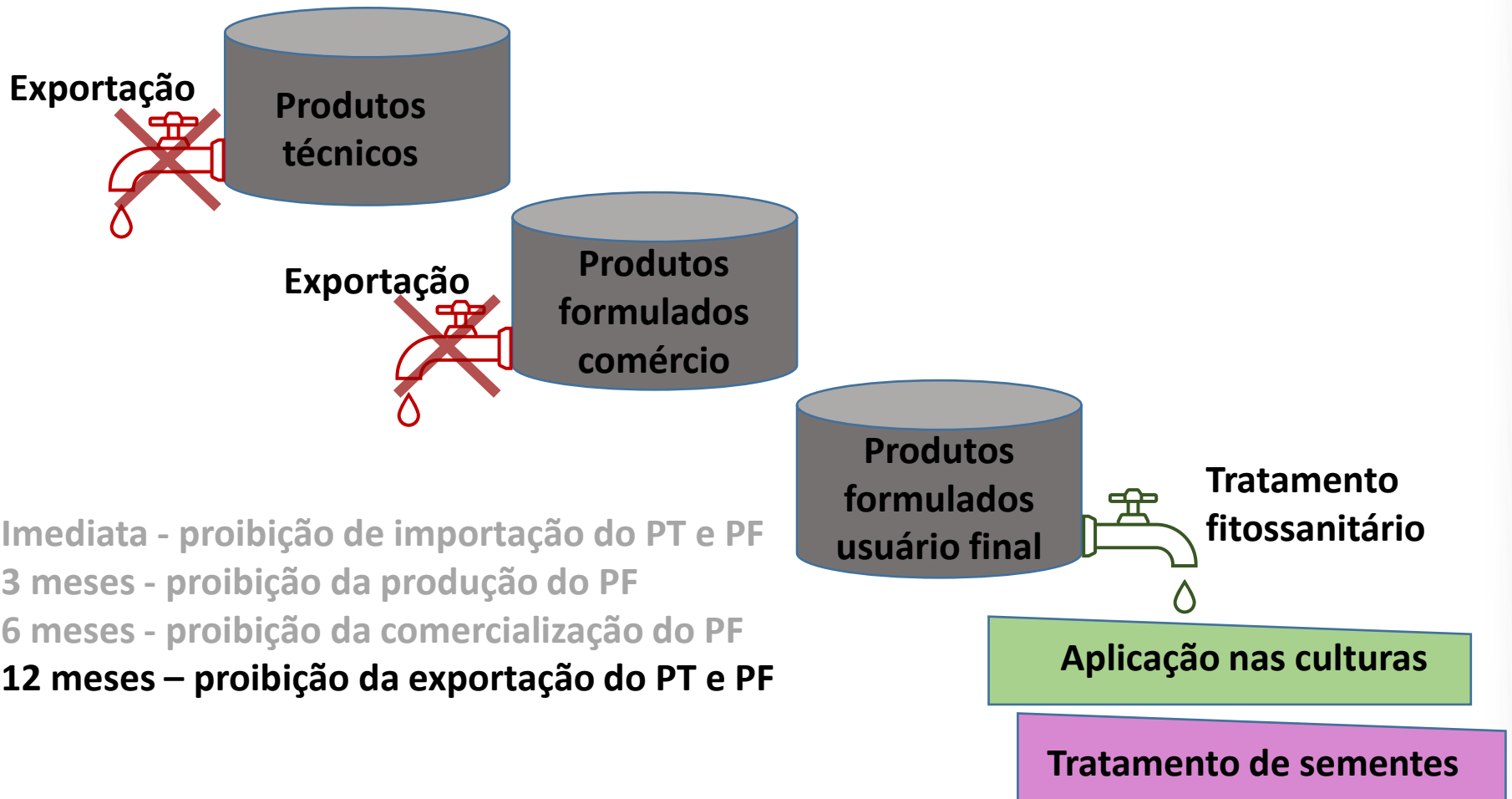


Imediata - proibição de importação do PT e PF
3 meses - proibição da produção do PF
6 meses - proibição da comercialização do PF

PT = produto técnico
PF = produto formulado



Eliminação gradual

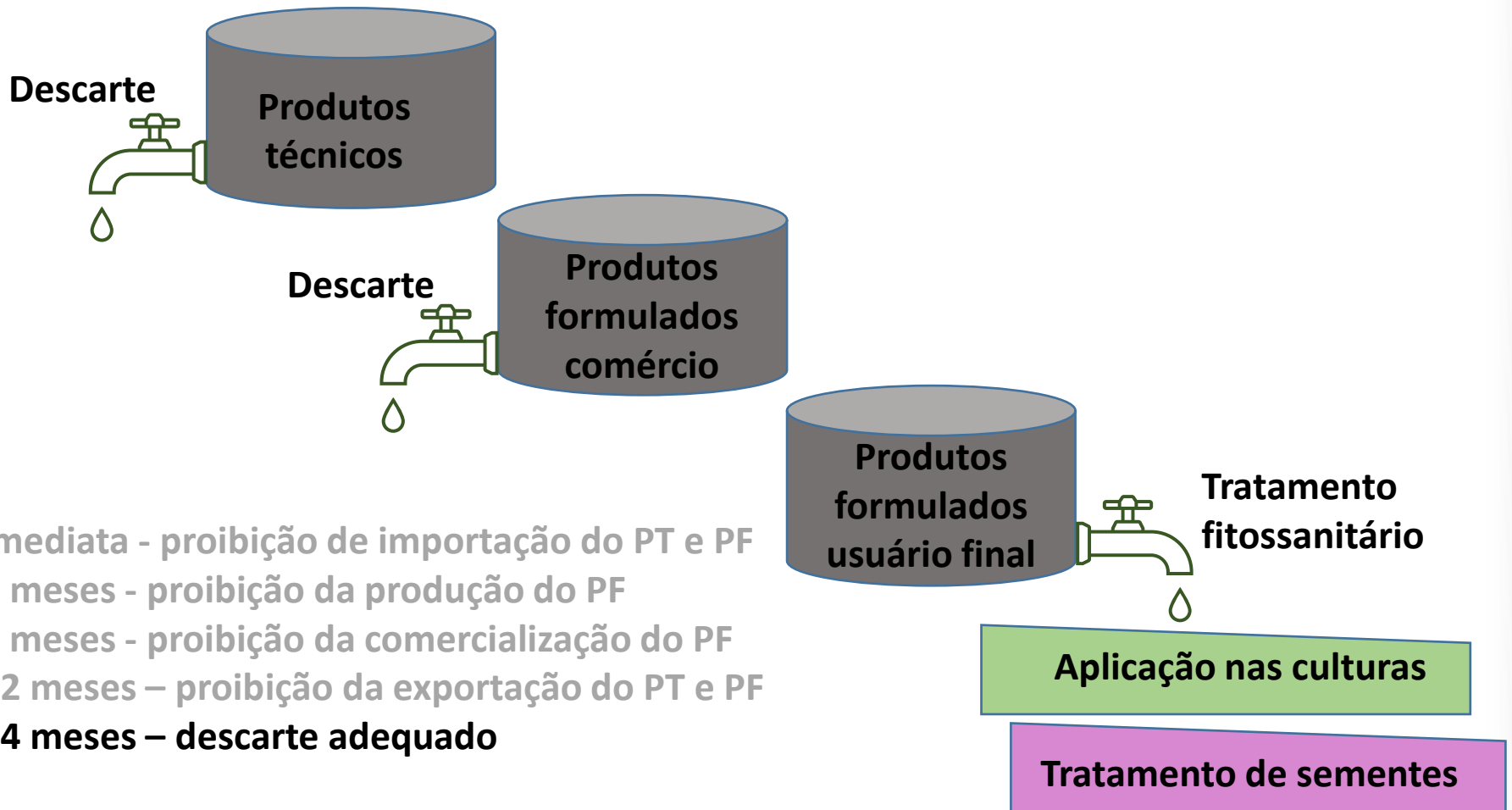


Imediata - proibição de importação do PT e PF
3 meses - proibição da produção do PF
6 meses - proibição da comercialização do PF
12 meses – proibição da exportação do PT e PF

PT = produto técnico
PF = produto formulado



Eliminação gradual



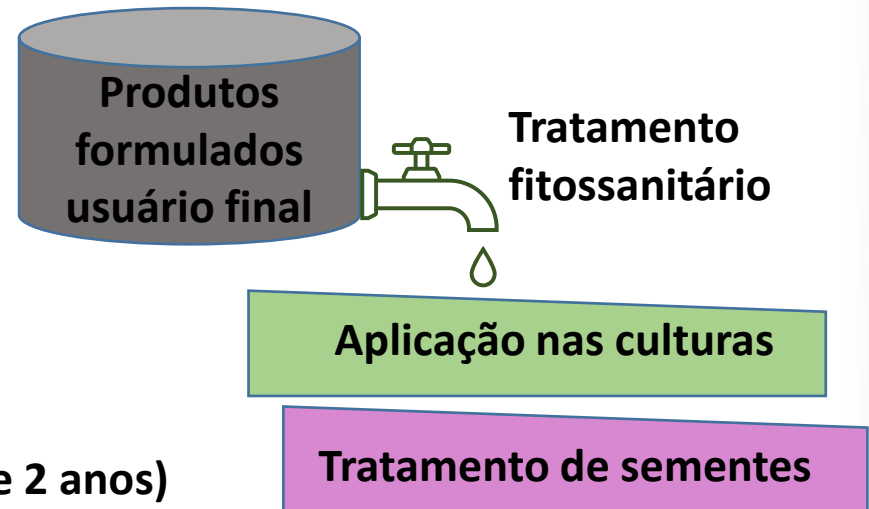
Imediata - proibição de importação do PT e PF
3 meses - proibição da produção do PF
6 meses - proibição da comercialização do PF
12 meses – proibição da exportação do PT e PF
14 meses – descarte adequado

PT = produto técnico
PF = produto formulado



Eliminação gradual

- Imediata - proibição de importação do PT e PF
- 3 meses - proibição da produção do PF
- 6 meses - proibição da comercialização do PF
- 12 meses – proibição da exportação do PT e PF
- 14 meses – descarte adequado
- Use até o esgotamento (validade do produto de 2 anos)



PT = produto técnico
PF = produto formulado





Obrigado!

Coordenação de Reavaliação
gemar@anvisa.gov.br

Camila Moreira - Daniel Coradi - Juliana Braz - Larissa Muratori – Thiago Santana



ANVISA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária



PARECER Nº 10/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise da toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde relacionados ao Carbendazim**

Avalia o relatório apresentado pela Força-tarefa Carbendazim, os relatórios de outras agências reguladoras de agrotóxicos e os estudos obtidos na busca sistemática acerca dos seguintes tópicos: toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde associados à exposição ao Carbendazim; como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

2-AB: 2-aminobenzimidazol

CBZ: Carbendazim

DNT: *Developmental neurotoxicity* (Neurotoxicidade para o desenvolvimento)

DRfa: Dose de referência aguda

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FOB: *Functional observation battery* (Bateria de observação funcional)

FT: Força-tarefa Carbendazim

GHS: *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos)

GH: *Growth Hormone* (Somatotropina, Hormônio do crescimento)

GPT: Alanina aminotransferase

IA: Ingrediente ativo

5-HBC: 5-hidroxi-1H-benzimidazol-2-yl-carbamato

LMR: Limite máximo de resíduos

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado)

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado)

NUS: Nitrogênio da ureia no sangue

NT: Neurotoxicidade

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

PoD: *Point of Departure* (Ponto de partida)

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

TGI: Trato gastrointestinal

TM: Tiofanato-Metílico

T₃: Triiodotironina

T₄: Tiroxina

TR: Toxicidade reprodutiva

TSH: *Thyroid stimulating hormone* (hormônio estimulador da tireoide)

UE: União Europeia

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

WoE: *Weight of evidence* (peso da evidência)

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis. Na análise dos parâmetros toxicocinéticos, verificou-se que esse ingrediente ativo (IA) possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), com elevada biodisponibilidade (85% após dose única via oral). É extensamente metabolizado pelo sistema microsomal hepático, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC). Em menor escala (2-4%), ocorre a formação de 2-aminobenzimidazol (2-AB), no plasma sanguíneo e outros órgãos. Não há relato de acumulação tecidual do CBZ – ou de seus metabólitos. Maiores níveis foram observados no fígado, seguido por rins, pele, TGI, sangue e pulmões. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão. Não foi relatada diferença mensurável quanto ao perfil de metabólitos do CBZ em ratos e camundongos, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação hepática de forma mais pronunciada em camundongos, quando tratados com altas doses (300 mg/kg p.c./dia) por 29 dias, o que acarretou sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação. A etapa de excreção ocorre de forma rápida, predominantemente pela urina; e pelas fezes com o aumento da dose. A maioria dos metabólitos foi detectada na forma conjugada. Apresenta baixa toxicidade, em caso de exposição aguda, pelas vias oral, cutânea e inalatória. Não apresenta potencial para causar irritação cutânea ou ocular, nem é sensibilizador cutâneo. Os principais efeitos relatados após exposição aguda via oral foram perda de peso, redução no consumo de alimentos e comprometimento de alguns órgãos-alvo, tais como: fígado (alterações bioquímicas, reação inflamatória, hipertrofia dos hepatócitos, infiltração periportal); rins (lesões degenerativas) e testículos (azoospermia, degeneração celular); além de mortalidade em ratos. Com base nos dados disponíveis, conclui-se que ocorre toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses ≥ 50 mg/kg, o que embasa a sua classificação na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, conforme previsto na Seção 2 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019. Ainda, não foram relatadas evidências de efeitos neurotóxicos nos estudos de toxicidade oral aguda e tardia, nem de toxicidade cutânea. Entretanto, alguns efeitos de neurotoxicidade para o desenvolvimento foram identificados no estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida. Não foram relatadas evidências de efeitos imunotóxicos em doses relevantes para exposição humana. Nos estudos de exposição repetida, em roedores e cães, os principais órgãos-alvo afetados foram testículos, fígado, rins e tireoide, sendo o cão a espécie mais sensível, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia a partir de dois estudos crônicos via oral. Outros efeitos indicados foram redução de

peso corporal e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Por fim, em concordância com a classificação proposta pela FT, e com base na Seção 3 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019, conclui-se que o CBZ pode ser enquadrado na Categoria 2, em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos de 90 dias em ratos pela via oral, com menor LOAEL de 16 mg/kg p.c./dia.

1. INTRODUÇÃO

O CBZ é o primeiro IA a ser reavaliado a partir dos critérios de priorização com base no risco à saúde humana, etapa do processo de reavaliação prevista no inciso I, Art 3º da RDC nº 221, de 28 de março de 2018. Trata-se de um fungicida sistêmico de amplo espectro, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular (mitose e meiose).

Esse IA é um metabólito dos fungicidas Tiofanato-metílico (TM), o qual também possui registro no Brasil; e Benomil, cujo uso foi proibido no país. Tendo em vista a grande instabilidade do Benomil *in vivo* e em solução aquosa no ambiente, o que acarreta sua rápida hidrólise em CBZ; além da similaridade no metabolismo e nos perfis toxicológicos desses dois compostos; nos relatórios de algumas agências (USEPA, 2020; PMRA, 2011), estudos com Benomil foram incluídos na análise de certos desfechos toxicológicos, quando da ausência de estudos conduzidos especificamente com o CBZ, conforme será detalhado nos itens específicos deste parecer.

A reavaliação toxicológica desse IA foi motivada pela preocupação com os aspectos toxicológicos referentes à mutagenicidade, à toxicidade reprodutiva e para o desenvolvimento, os quais são proibitivos de registro, conforme a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 e a RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Assim, esses aspectos serão o foco da reavaliação, porém, demais aspectos considerados relevantes para a avaliação toxicológica também serão incluídos nas análises.

Como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistematizada da literatura científica para identificar estudos que relatam toxicidade associada à exposição ao CBZ, a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE).

Neste parecer, constam as análises, efetuadas pela CREAV, dos estudos científicos selecionados na busca sistematizada, como também das evidências fornecidas pelo relatório apresentado pela FT e pelos relatórios das agências reguladoras internacionais, quanto aos parâmetros toxicocinéticos, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde associados à exposição ao CBZ.

2. TOXICOCINÉTICA

2.1. Absorção

O CBZ sofre rápida absorção pelo trato gastrointestinal, com biodisponibilidade de 85% após dose única (12 mg/kg p.c.) via oral de 14 C-carbendazim, valor calculado com base na excreção urinária do composto total e de seus metabólitos 5-HBC e 2-AB (Krechniak & Klosowska, 1986). Após administração oral de 14 C-carbendazim em ratos machos e fêmeas, o pico plasmático (C_{max} = 1,03 μ g/ml) foi atingido entre 15-40 minutos, nas doses de 3 e 12 mg/kg p.c.. Após alta dose (300 mg/kg p.c.), a absorção foi significativamente mais lenta, com pico de concentração plasmática de 16-17 μ g/mL, alcançado entre 0,4 e 4h. Esses mesmos níveis sanguíneos foram alcançados após administração diárie pela dieta, por 14 a 29 dias. Sob as mesmas condições experimentais, camundongos exibiram um valor similar de C_{max} na menor dose, enquanto na dose de 300 mg/kg p.c. o C_{max} foi superior (36-53 μ g/ml) (Kellner e Eckert, 1983 apud FAO/WHO, 1998; EFSA, 2009).

Em outro estudo, ratos do sexo masculino e feminino foram tratados com ^{14}C - carbendazim via gavagem, agrupados em três regimes de dosagem distintos: 1) Dose baixa: dose oral única de 50 mg/kg p.c.; 2) Dose baixa pré-condicionada: dose oral de 50 mg/kg após pré-tratamento por 14 dias com CBZ não radiomarcado (v.o.; 50 mg/kg p.c.); 3) Dose alta: dose oral única de 1.000 mg/kg p.c.. Nos três grupos, a excreção do composto radiomarcado, via urina e fezes, foi monitorada a cada 12h por 72h. Verificou-se que a eficiência de absorção do CBZ foi de aproximadamente 80% da dose administrada, em todos os esquemas de dose, valor calculado com base no nível de radioatividade quantificado na urina e nas fezes (somatória de todos os metabólitos e CBZ livre) (Monson, 1990 apud FAO/WHO, 1998).

Jia e colaboradores (2003), após administração de 1.000mg/kg de ^{14}C -carbendazim via oral a camundongos, enquadra seu perfil cinético no modelo de dois compartimentos com eliminação sérica de primeira ordem, ou seja, de modo exponencial, com a C_{max} de 18,4 $\mu\text{g/ml}$ alcançada em um T_{max} de 2h. Assim, a maior parte da dose de CBZ é absorvida rapidamente, mas uma pequena fração tem absorção lenta após o pico plasmático. Os autores também discutiram a extensão da absorção oral em função da solubilidade pH-dependente em diferentes seções do TGI, com absorção aumentada no estômago e duodeno, em valores de pH em torno de 4-5, no qual há aumento da solubilidade desse composto.

2.2. Distribuição

As agências reguladoras internacionais relatam baixo potencial de acumulação tecidual do CBZ ou de seus metabólitos (APMVA, 2009; PMRA, 2010; USEPA, 2020; FAO/WHO, 1998). Em um estudo de autorradiografia de corpo inteiro, conduzido em ratos e camundongos, foram detectados apenas traços do composto radiomarcado, em 12h após administração. Verificou-se, após administração de 3mg/kg de ^{14}C -carbendazim, um padrão de distribuição para o fígado e rins, em dez minutos após dose oral (FAO/WHO, 1998). Entretanto, segundo a PMRA (2011), o nível de resíduos nos tecidos foi mínimo, com detecção de somente 0,3% e 0,08% no fígado, em sete e em 14 dias, respectivamente, pós-administração de dez doses diárias (2 mg/kg p.c.). Ainda, os níveis sanguíneos e em outros órgãos (rins, tecido adiposo, músculos e gônadas) não excederam 0,03% da dose administrada, em sete dias pós-administração dos 10 dias de tratamento.

Similarmente, a USEPA (2020) também relatou que não foi observada bioacumulação tecidual, com permanência nos tecidos de somente 1% e menos de 0,7% da dose, após 72 horas de administração da menor e maior dose, respectivamente. Maiores níveis foram observados no fígado, seguido por rins, pele, TGI, sangue e pulmões. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão.

Jin e colaboradores (2015) realizaram dosagem de resíduos de CBZ no fígado, intestino e fezes de camundongos, tratados via oral com 100 e 500 mg/kg p.c./dia por 28 dias. Verificou-se um aumento dose-dependente nos níveis de CBZ nesses três locais avaliados. O conteúdo de CBZ nos grupos tratados com 100 e 500 mg/kg atingiu 0,05 e 0,38 mg/g de peso hepático, respectivamente. Quanto aos resíduos de CBZ nas fezes, seus níveis nos grupos tratados com 100 e 500 mg/kg alcançaram 0,19 e 0,29 mg/g de peso fecal, respectivamente. O conteúdo de CBZ no intestino foi similar ao do fígado e o nível fecal de CBZ foi cerca de 1000 vezes maior que no fígado ou intestino. Esses dados indicam que apenas uma pequena parte do CBZ administrado foi absorvida e transferida para o fígado e intestino, sugerindo que a maior parte pode permanecer no TGI até a eliminação nas fezes.

2.3. Metabolismo

A rota principal de metabolização do CBZ, mediada principalmente pelas enzimas do citocromo P-450 (CYP-450), consiste na oxidação do anel fenílico, com posterior hidroxilação na posição C-5, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC); e, em menor frequência, na posição C-6, com a formação de 5,6-di-hidroxi-carbendazim. Esses derivados hidroxilados, em seguida, podem passar por etapas de biotransformação – conjugação com sulfato ou glicuronídeo. Além disso,

reações no nitrogênio do anel imidazólico podem formar os derivados N-óxido. Em menor escala (2-4%), o CBZ é convertido em 2-aminobenzimidazol (2-AB), pela ação de enzimas hidrolíticas presentes no plasma sanguíneo e outros órgãos (PMRA, 2011).

Krechniak & Klosowska (1986) descreveram que, em 15 minutos após administração i.v. de ¹⁴C-carbendazim, os metabólitos 5-HBC e 2-AB atingem concentração máxima nos rins e fígado, evidenciando que as atividades enzimáticas desses órgãos exercem um papel significativo no processo de metabolização. Adicionalmente, após 2h, há predominância de CBZ inalterado no sangue (82,8%), e do metabólito 5-HBC no fígado (80,6%) e nos rins (87,5%), com detecção de 2-AB apenas em pequenas concentrações (6,8 – 11,8%) nesses três locais avaliados. Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a presença de ¹⁴C-carbendazim nas frações subcelulares hepáticas em 90 minutos após administração oral, quando houve o pico de concentração nesse órgão. Verificou-se que a disposição de ¹⁴C-carbendazim independe do conteúdo lipídico dessas frações e que o 5-HBC foi o principal componente em cada uma delas, com maior concentração (64%) no citosol. A maior concentração relativa de 2-AB (34%) foi nos microsomas e de CBZ inalterado (33%) na mitocôndria.

Em um estudo comparativo da metabolização em ratos e camundongos, esses animais foram tratados com uma dose única via oral de 3mg/kg ou 300mg/kg p.c. de ¹⁴C-carbendazim. Verificou-se que os mesmos metabólitos foram eliminados pela urina, com diferença apenas quantitativa entre as espécies (PMRA, 2011). Adicionalmente, esse estudo relatou que a administração prévia de CBZ não marcado (via dieta; em ratos: 50 e 500 mg/kg; em camundongos: 30 e 300 mg/kg), por 14 ou 29 dias consecutivos, não alterou o perfil qualitativo dos metabólitos. Entretanto, em camundongos, a administração da maior dose por 29 dias saturou a capacidade de detoxificação hepática, com sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação (Dorn et al., 1983 apud FAO/WHO, 1998; EFSA, 2009; APMVA, 2009).

A PMRA (2011) descreveu, com base em estudos de indução de enzimas hepáticas em ratos e camundongos, que não há diferença mensurável entre essas espécies animais com relação ao metabolismo do CBZ, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação de forma mais pronunciada em camundongos tratados com altas doses, conforme exposto acima. A desintoxicação e eliminação de CBZ e seus metabólitos ocorreram mais rapidamente em ratos do que em camundongos, conforme refletido pelo aumento do conteúdo de glutatona hepática e aumento da atividade enzimática de fase II em ratos.

No estudo de Monson et al (1990) já descrito no item 4.1, identificou-se o 5-HBC-S (21-43% da dose administrada) como principal metabólito, exceto para fêmeas tratadas com a maior dose e para grupos de dose pré-condicionada (5,5 - 10%). Nos grupos de fêmeas, houve predominância do metabólito 5,6-HOBC-N-oxido-G (10-19%). Tanto o 5,6-DHBC-S quanto o 5,6-DHBC-G foram identificados em pequenas quantidades em todos os grupos analisados.

2.4. Excreção

O CBZ é rapidamente excretado pela urina e fezes, com eliminação (predominante pela urina) superior a 98% em 72 horas, após administração de uma única dose e tempo de meia-vida de 12 horas. Após 6 horas, relatou-se a eliminação de 46 a 63% da menor dose (3 mg/kg p.c.) e de 8 a 19% da maior dose (300 mg/kg p.c.). A administração por 10 dias consecutivos resultou em eliminação de 60% pela urina e 35% pelas fezes. Ainda, verificou-se uma eliminação bifásica: rápida durante os três primeiros dias e mais lenta após esse período (EFSA, 2009). Praticamente todos os metabólitos foram detectados na forma de conjugados glicuronídeo e sulfato. Após a clivagem desses conjugados, os principais compostos gerados foram 5-HBC (39-90%), CBZ inalterado (2-6%), 2-AB (2-4%) e hidroxilado-2-aminobenzimidazol (até 5%) em ambas as espécies de roedores (PMRA, 2011).

Krechniak & Klosowska (1986) também descreveram o processo de excreção do CBZ como sendo bifásico, com uma etapa rápida seguida de uma lenta, conforme um modelo cinético de dois compartimentos, com predominância de eliminação pela via urinária. Na administração intravenosa, após

a fase rápida ($T_{1/2} = 1,37h$), mais de 71% do composto radiomarcado foi eliminado pela urina e, em 12h, verificou-se que a composição desses compostos eram 94% de 5-HBC, 3% de 2-AB e 3% de CBZ inalterado. Pela via oral, a eliminação pela urina após a fase rápida ($T_{1/2} = 2,5h$) foi de 91% do composto radiomarcado, sendo a sua composição após 12h bem similar ao descrito anteriormente para a administração intravenosa.

No estudo de Monson e colaboradores (1990) descrito anteriormente, após monitoramento da excreção do composto radiomarcado, via urina e fezes a cada 12h por 72h, verificou-se uma eliminação superior a 98% da dose administrada após esses 3 dias, com predominância da via urinária. Nos grupos de dose baixa única (50mg/kg p.c.) e dose baixa pré-condicionada (50mg/kg p.c. por 14 dias), a excreção urinária representou 62-66% da dose em machos e 54-62% em fêmeas. Nos grupos de dose alta (1.000 mg/kg p.c.), a via urinária representou 41% em ambos os sexos, o que indica que, em altas doses, a via urinária se torna saturada. A excreção fecal correspondeu ao restante, com a detecção de um pequeno percentual de CBZ inalterado (10-15% da dose administrada), além do metabólito principal 5-HBC. Esses dados indicam que, assim como a absorção, a excreção ocorre de forma semelhante em machos e fêmeas, de modo dose-dependente, com um maior percentual de excreção fecal em altas doses.

A APMVA (2009) relatou que o metabolismo, a distribuição e a excreção desse IA exercem grande influência na sua toxicidade para o desenvolvimento. Após administração de Benomil via gavagem a ratas grávidas, no período de DG 7-16, constatou-se que o Benomil e seu metabólito CBZ atravessam a membrana placentária, com maior dosagem desses dois IA no sangue materno e tecido embrionário, em uma hora após a administração. O tempo de meia-vida do Benomil foi de aproximadamente 45 minutos no sangue materno e inferior a isso nos embriões. Observou-se ainda que os níveis de Benomil e CBZ, quando dosados uma hora após o tratamento, diminuíram com o número crescente de administrações, enquanto o nível de 5-HBC-S aumentou com a exposição repetida, sendo a meia-vida do 5-HBC-S de 2-3h no sangue materno e de 4-8h em embriões. Isso sugere que a exposição repetida leva a uma aceleração no metabolismo do Benomil, provavelmente em decorrência da indução de enzimas hepáticas.

Em um segundo estudo, com administração de Benomil pela dieta em uma dose aproximadamente 4 vezes superior àquela administrada via gavagem, não se detectou Benomil e CBZ nos embriões, sendo o nível máximo desses compostos no sangue materno marcadamente inferior ao quantificado após o início da administração por gavagem. No entanto, as concentrações máximas de 5-HBC-S no sangue materno e nos embriões foram aproximadamente o dobro daquelas detectadas após a administração por gavagem. Isso indica que o Benomil administrado na dieta é metabolizado mais rapidamente do que por gavagem (APMVA, 2009).

Na Tabela 1, há um resumo dos principais resultados dos estudos de toxicocinética descritos nos relatórios das agências reguladoras.

Tabela 1: Quadro-resumo das informações relevantes obtidas a partir dos estudos de toxicocinética	
Espécie/dose	Resultados
Rato e camundongo 3 mg/kg ou 300 mg/kg de ^{14}C -carbendazim por v.o. e i.v. (Padrões de distribuição foram investigados em ratos e camundongos por autorradiografia de corpo inteiro após administração i.v. e v.o. de 3 mg/kg p.c. de ^{14}C -carbendazim).	<ol style="list-style-type: none"> Absorção: <ul style="list-style-type: none"> Ratos: $C_{max} = 1,03 \mu g/ml$ em 15-40 min, na dose de 3 mg/kg p.c.; e $C_{max} = 16 \mu g/ml$ em 0,4-4 h, na dose de 300 mg/kg p.c. Camundongos: C_{max} similar na menor dose; $C_{max} = 36-53 \mu g/ml$ na dose de 300 mg/kg p.c. Distribuição: Maiores concentrações no fígado e rins; nas gônadas os níveis foram próximos ou abaixo das concentrações sanguíneas. Excreção: Quase total em 24h <ul style="list-style-type: none"> Ratos após 6h: 3mg/kg - Urina: 46-63%; 300mg/g - Urina: 8-19%.

	<ul style="list-style-type: none"> • Camundongos após 6h: 3mg/kg - Urina: 33-75%; Fezes: 10%; 300mg/g - Urina: 10-24%; Fezes: 27%.
<p>Rato</p> <p>12mg/kg p.c. de ¹⁴C-carbendazim por via gavagem ou i.v.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Absorção</u>: biodisponibilidade de 85% após dose única; 2. <u>Distribuição</u>: Maior dosagem nos rins e menor dosagem no sangue; 3. <u>Metabolismo</u>: <ul style="list-style-type: none"> • Hidroxilação pelo CYP-450, gerando 5-HBC como principal metabólito; posterior conjugação com sulfato ou glicuronídeo; • Hidrólise em 2-AB pela ação de enzimas do plasma sanguíneo e outros órgãos. 4. <u>Excreção</u>: Predominantemente renal e quase total em 24h. Comportamento bifásico, conforme modelo cinético de dois compartimentos.
<p>Rato</p> <p>8mg/kg p.c. de ¹⁴C-carbendazim por v.o. por 10 dias consecutivos</p>	<p><u>Excreção</u>: 60% urina e 35% fezes por 5 dias. Principal metabólito 5-HBC livre (fezes) ou conjugado (fezes e urina).</p>
<p>Rato e camundongo</p> <p>3mg/kg ou 300mg/kg p.c. de ¹⁴C-carbendazim por via gavagem em dose única;</p> <p>Grupos de pré-tratamento com CBZ não marcado via gavagem, por 14 ou 29 dias consecutivos, com posterior dose única de ¹⁴C-carbendazim (3mg/kg ou 300mg/kg p.c.).</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Metabolismo</u>: Metabólitos como conjugados glicuronídeo e sulfato: 5-HBC (39% - 90%), CBZ inalterado (2% - 6%), 2-AB (<2% - 4%), 2-AB hidroxilado (0% -5%); 2. <u>Distribuição</u>: Conteúdo residual no fígado foi menor em ratos (12-18%, dose única; 2-4% dose repetida) do que em camundongos (26-29%, dose única, <2-28% dose repetida) – saturação da capacidade de detoxificação hepática na dose de 300 mg/kg; 3. <u>Excreção</u>: Aproximadamente, 60-84% (dose baixa) e 10-24% (dose alta) pela urina.
<p>Rato</p> <p>50 mg/kg p.c. ¹⁴C - carbendazim v.o. dose única</p> <p>1000 mg/kg p.c. ¹⁴C - carbendazim v.o. dose única</p> <p>50 mg/kg p.c. ¹⁴C - carbendazim após 14 dias de pré-tratamento com 50 mg/kg p.c.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Metabolismo</u>: principal metabólito em M e F: 5-HBC. Em fêmeas após pré-TTT: presença de 5,6-HOBC-N-óxido. Identificados 5,6-DHBC-S e 5,6-DHBC-G em menor quantidade. 2. <u>Excreção</u>: Em 72h: > 98% excreção pela urina e fezes. 50 mg/kg com ou sem pré-ttt - excreção urinária: 62-66% (M) e 54-62% (F); 1000 mg/kg - excreção urinária: 41%. OBS: Eliminação nas fezes constitui o restante.
<p>Rato</p> <p>2 mg/kg p.c./dia ¹⁴C - carbendazim via gavagem por 10 dias.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Distribuição</u>: Resíduos no fígado: 0,3% em 7d e 0,08% em 14d após a última dose; níveis no sangue e outros órgãos (rim, gordura, músculo e gônadas) não excederam 0,03% após 7 dias. 2. <u>Excreção</u>: Eliminação rápida do sangue – bifásica com uma taxa rápida durante os primeiros 3 dias e fase mais lenta depois disso (59% excretado na urina e 36% nas fezes).
<p>v.o.: via oral; i.v.: intravenosa</p> <p>Fontes: PMRA, 2010; APMVA, 2009; EFSA, 2009; FAO/WHO, 1998; Krechniak & Klosowska, 1986; Monson et al., 1990.</p>	

3. TOXICIDADE APÓS EXPOSIÇÃO ÚNICA

As agências europeia, americana, canadense e australiana são consoantes quanto à baixa toxicidade do CBZ, quando administrado de forma aguda, pelas vias oral, cutânea e inalatória (USEPA, 2020; APVMA, 2009; PMRA, 2011; EFSA, 2010). Esse IA não apresenta potencial para causar irritação cutânea ou ocular. Quanto à sensibilização cutânea, a EFSA (2010) o classifica como sensibilizante quando analisado no teste de maximização e não sensibilizante pelo teste de Buehler. Já as agências canadense, americana e australiana o classificam como não sensibilizante cutâneo, com base em ambos os testes (USEPA, 2020; PMRA, 2011; APMVA, 2009). Isso está de acordo com os estudos descritos no relatório da FT, onde o CBZ não foi considerado sensibilizante cutâneo, nem irritante cutâneo/ ocular. Referente à DL₅₀ oral e cutânea, o menor valor descrito para ambas foi > 2.000 mg/kg p.c. (APMVA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2011) e a menor CL₅₀ foi > 5-5,8 mg/L (PMRA, 2011). Todos esses valores foram obtidos com o produto técnico (alta pureza), em estudos conduzidos em ratos.

Com relação à classificação em função da toxicidade aguda, embora a FT tenha sugerido um enquadramento na Categoria 5, este não é cabível no processo de reavaliação, pois a classificação que consta no rótulo e na bula deve considerar o produto formulado e não apenas o IA.

Estudos de toxicidade aguda foram conduzidos em diferentes espécies animais, por distintas vias de administração, sendo a perda de peso e a redução no consumo de alimentos um efeito comum a todas as espécies. Quando administrados a ratos e cachorros pela via oral (dieta ou gavagem), por exemplo, os órgãos-alvo afetados foram fígado e rins, associado a um comprometimento severo dos testículos em doses mais altas. Os principais efeitos observados foram: alterações hematológicas e bioquímicas, lesões degenerativas nos rins, danos hepáticos (reação inflamatória, hipertrofia dos hepatócitos, infiltração periportal), azoospermia, degeneração celular dos testículos; bem como mortalidade em ratos (EFSA, 2010; PMRA, 2011).

Embora a FT não tenha discutido em seu relatório a toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, vários estudos da literatura indicaram toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses ≥ 50 mg/kg (Nakai et al., 1992, 1993; 1994; 1995; 1997a; 1997b; 1998b; 2002; Markelewicz, 2004; Kawata et al., 2020). A sequência de eventos tem início com a indução de alterações morfológicas nas células de Sertoli, com posterior descamação de células germinativas imaturas, o que acarreta obstrução e distensão dos ductos eferentes, decorrente da presença de conteúdo luminal altamente compactado, com sinais de inflamação; em seguida, ocorre grave desorganização epitelial, necrose e consequente fibrose tecidual. Essa oclusão dos ductos resulta em um rápido inchaço testicular e, por fim, atrofia tubular seminífera e infertilidade. Os principais efeitos adversos descritos foram observados logo após 90 minutos, com persistência por até 70 dias pós-exposição.

Nakai e colaboradores (1992) conduziram dois protocolos experimentais em ratos: 1) Perfil de monitoramento de efeitos entre 2 horas e 32 dias após a exposição (0 e 400 mg/kg p.c.); e 2) Curva dose-resposta em 2 e 70 dias após a exposição (50, 100, 200, 400 ou 800 mg/kg p.c.). No experimento 1, verificou-se, já a partir de 8h após exposição, um aumento no peso testicular acompanhado de redução na contagem e motilidade, além de alterações morfológicas em espermatozoides, com duração desses efeitos pelos 32 dias de análise. No experimento 2, observou-se, no segundo dia pós-exposição, toxicidade testicular já na menor dose testada (50 mg/kg p.c.), com descamação precoce de células germinativas imaturas; além de aumento no peso testicular, ausência de células germinativas, oclusão e dilatação dos dutos eferentes, dilatação de túbulos seminíferos nas maiores doses testadas. Essa cascata de efeitos é desencadeada pela inibição da montagem dos microtúbulos nas células de Sertoli, com consequente falha no processo de divisão, maturação e migração das células germinativas. O tratamento com doses a partir de 100 mg/kg p.c. acarretou um aumento dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, além de oclusões nos dutos eferentes, causadas por conteúdo luminal compactado, granulomas espermáticos, mineralização e obliteração do lúmen original por tecido conjuntivo fibrótico. Na análise realizada após 70 dias de exposição, observou-se uma redução dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, decorrentes de um aumento na atrofia dos túbulos seminíferos. Essa atrofia testicular a longo prazo parece ser decorrente do processo de oclusão associado à exposição às maiores doses. Com base nesse estudo, fica definido um LOAEL de

50 mg/kg p.c. para efeitos testiculares após exposição aguda, sem definição de NOAEL, em alinhamento ao estabelecido pelas agências canadense e australiana (APMVA, 2009; PMRA, 2011).

Então, a partir do conjunto de dados apresentados, há evidência suficiente indicativa de toxicidade testicular após exposição única via oral ao CBZ, em doses \geq 50 mg/kg, o que embasa a classificação do CBZ na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, conforme previsto na Seção 2 do Anexo IV da RDC nº 294/ 2019. Esse enquadramento se fundamenta na tabela 3.8.1 do Capítulo 3.8 do GHS (GHS, 2017), visto que a menor dose associada à toxicidade testicular foi 50 mg/kg p.c., isto é, uma dose inferior ao valor indicativo (C) de 300 mg/kg p.c..

4. TOXICIDADE APÓS EXPOSIÇÃO REPETIDA

4.1. Aspectos gerais

Em seu relatório, a FT revisou um total de 16 estudos de toxicidade para exposições repetidas, sendo 5 regulatórios e 11 provenientes da literatura científica. Dos estudos regulatórios, 4 foram conduzidos em ratos, com administração pela via oral (alta pureza; gavagem, água ou alimento), por 28 a 91 dias, 5-7 dias/ semana. O menor NOAEL foi 102-107 mg/kg p.c./dia (para machos e fêmeas, respectivamente), com base nos seguintes efeitos adversos: leve a moderada redução de hemoglobina, hematócrito e contagem de eritrócitos, quando tratados com 518-564 mg/kg p.c./dia (machos e fêmeas); discreta elevação de alanina aminotransferase (ALT), persistente até o final do período de observação; aumento significativo de nitrogênio da ureia no sangue (NUS) e de ureia, evidente somente ao final do período de observação; redução no peso do baço, verificado ao final do período de tratamento. A FT incluiu ainda para discussão outros estudos pela via oral disponíveis na literatura científica, os quais não apresentaram a pureza do CBZ ou foram conduzidos com o produto formulado, estando, por essa razão, fora do escopo deste parecer. De modo geral, os dados da literatura e os relatórios das agências reguladoras indicaram, em roedores e cães, os seguintes órgãos-alvo afetados pela exposição ao CBZ: testículos, fígado, rins e tireoide. Outros efeitos indicados foram redução de peso corporal e alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (USEPA, 2020; APVMA, 2009; PMRA, 2011; EFGA, 2010).

Pela via dérmica, a FT apresentou um estudo regulatório conduzido em ratos, por 92 dias (5 dias/semana). O NOAEL estabelecido foi 10 mg/kg p.c./dia, com base no aumento de eosinófilos, redução de leucócitos e linfócitos verificado na dose de 100 mg/kg p.c./dia. A agência americana também relatou, no estudo de exposição dérmica de 28 dias em ratos, degeneração dos túbulos seminíferos, hipospermia, lesões em espermatozoides com formação de granulomas em machos; e alterações nos parâmetros hematológicos em fêmeas, em doses superiores ao NOAEL indicado no estudo da FT (NOAEL = 20 mg/kg/dia) (USEPA, 2020).

A FT não incluiu estudo de exposição repetida pela via inalatória. A USEPA (2020), em razão da ausência de estudos conduzidos especificamente com o CBZ, incluiu um estudo de exposição inalatória em ratos, por 90 dias, com Benomil, indicando um NOAEC de 0,010mg/L com base na degeneração do epitélio olfativo na cavidade nasal e redução do peso corporal em doses mais altas.

As evidências obtidas dos estudos da literatura científica, avaliados pela CREAV, constam na Tabela 2 e serão detalhadas posteriormente nos itens específicos.

Tabela 2: Avaliação de estudos de toxicidade por exposição repetida ao Carbendazim.

Referência	Pureza IA/ Cepa ou Linhagem/ Delineamento/	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Abolaji et al., 2016	Pureza: 97%; Linhagem: Ratas Wistar; Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=8) – CBZ administrado via	<ul style="list-style-type: none"> Sem alteração no peso corporal e peso relativo do fígado, baço e rins; ↓ ganho de peso corporal. 	<ul style="list-style-type: none"> A depleção do status antioxidante, níveis elevados de marcadores inflamatórios e 	CBZ induziu toxicidade hepática e renal, associadas ao estresse oxidativo e processo

	oral (50 mg/kg p.c.) por 7d. Análise: dosagens bioquímicas (ALT, AST, ureia e creatinina), atividade antioxidante e histopatologia (fígado, rim e baço).	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* ALT, AST, creatinina e ureia plasmáticas. • ↓* enzimas antioxidantes: GSH, SOD e GST no fígado, rins e baço; CAT somente rins e baço; com ↑* biomarcadores inflamatórios e de peroxidação lipídica (H₂O₂, ON, MPO) nos três órgãos. • Análise histopatológica: focos de necrose e células inflamatórias no fígado, infiltração neutrofílica no baço e congestão leve e infiltração neutrofílica nos rins. 	peroxidação lipídica foram acompanhados por danos oxidativos hepáticos, renais e esplênicos em ratos.	inflamatório nesses órgãos (LOAEL = 50mg/kg)
Barlas et al., 2002	<p>Pureza: 98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c./dia) por 105 dias. Análise: dosagem hormonal e histopatologia da tireoide, paratireoide, adrenal e hipófise.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* T₃ (300 mg/kg p.c./dia); • Alterações histopatológicas em todas as doses: I) tireoide: folículos danificados e expandidos, infiltração de células linfóides, congestão e aumento do tecido intersticial; II) Paratireoide: degeneração celular, congestão, lesões amiloides; III) Adrenais: degeneração celular, gotículas de lipídios e edema. 	-	CBZ induziu danos histopatológicos na tireoide, paratireoide e adrenais (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)
Đikić et al., 2012a	Pureza: 95%;	<ul style="list-style-type: none"> • ↓* ganho de peso corporal, sem alteração no 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo conduzido conforme Diretriz OECD 407 (Teste 	CBZ induziu toxicidade hepática verificada por

	<p>Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i> ♂/ ♀;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via oral (20 mg/kg p.c.) por 28d. Análise: dosagens bioquímicas (ALT, AST, amilase, FA, LD, CK, creatinina e proteínas totais) e histopatologia do fígado.</p>	<p>peso do fígado e no índice hepatossomático;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dosagem bioquímica: ↑* AST e CK (indicativa de condição de hipóxia induzida pelo CBZ), sem alteração nas demais; • Histopatologia: alteração na arquitetura lobular decorrente de morte celular e alterações visíveis na heterocromatina nuclear; • Sem alteração no nível de proteína total, o que indica que fígado permaneceu funcional. 	<p>de toxicidade subcrônica (28 dias) em roedores);</p> <ul style="list-style-type: none"> • Experimento feito em duplicata, sem diferença estatística entre o primeiro e o segundo experimento. 	<p>alteração da atividade enzimática e histopatológica (LOEL = 20mg/kg)</p>
Helali et al., 2016	<p>Pureza: >98%;</p> <p>Linhagem: Macrófagos peritoneais de camundongos <i>Swiss</i>;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vitro</i>. Exposição ao CBZ (0,001 - 10 µM) por 24h. Análise da atividade enzimática lisossomal do macrófago e da produção / liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-1β) e de ON.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição concentração-dependente da atividade enzimática lisossomal e da produção de ON, TNF-α e IL-1β (↓* em 1µM), o que foi considerado um potencial mecanismo imunossupressor, por meio do qual o CBZ inibe resposta imune inata. 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada citotoxicidade observada a 100 µM (concentração excluída do estudo); • Avaliação das culturas em duplicata. • Concentrações de CBZ selecionadas com base em LMR estabelecidos pela UE e FAO. 	<p>CBZ exibiu efeitos imunomoduladores, com potencial ação imunossupressora <i>in vitro</i> (inibição da função pró-inflamatória dos macrófagos).</p>
Janardhan et al., 1987	<p>Pureza: 98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar ♂/♀;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n = 10♂ e 10♀). Administração via gavagem de CBZ (16, 32 e 64 mg/kg p.c./dia) por</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alterações hematológicas: ↓ leucócitos e linfócitos; • Alterações bioquímicas: ↑* ALT e bilirrubina; • Alterações histopatológicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de análise estatística nos dados de parâmetros hematológicos. 	<p>CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (rins e fígado) (LOEL = 16 mg/kg p.c./dia)</p>

	90 dias. Análise: parâmetros hematológicos, bioquímicos (glicose, ureia, FA, ALT, AST, bilirrubina) e histopatologia do fígado e rins.	dose-dependentes hepática (congestão da veia porta e degeneração hidrópica) e renal (dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular).		
Janardhan et al., 1988	<p>Pureza: 98%;</p> <p>Linhagem: Cães ♂/♀;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n = 3♂ e 3♀). Administração oral de CBZ (20, 40 e 80 mg/kg p.c./dia) por 90 dias. Análise: parâmetros hematológicos, bioquímicos (glicose, ureia, FA, ALT, AST, bilirrubina) e histopatologia do fígado e rins.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Alterações hematológicas: ↓* leucócitos; Alterações bioquímicas: ↑* ALT, AST, ureia e bilirrubina; Alterações histopatológicas dose-dependentes: I) fígado: infiltração esparsa de células inflamatórias, infiltração lipídica, congestão extensa e alterações inflamatórias e degenerativas; II) rins: (dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular, hialinização e extensa congestão vascular). 	<ul style="list-style-type: none"> Autores concluíram que cães apresentam uma susceptibilidade aumentada aos efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos, em comparação aos ratos. 	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (rins e fígado) (LOAEL = 20 mg/kg p.c./dia)
Jin et al., 2015	<p>Pureza: >98%;</p> <p>Linhagem: Camundongos ICR ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=15). Administração oral de CBZ (100 e 500 mg/kg p.c./dia) por 28d. Eutanásia nos dias 8 (n=7) e 28 (n=8). Análise: dosagem sérica de glicose, CT, HLD, LDL, ácidos graxos livres, TG,</p>	<ul style="list-style-type: none"> Alteração histopatológica hepática: ↑* acúmulo de lipídios (500mg/kg) e taxa de degeneração hidrópica (ambas as doses); Dosagens bioquímicas: ↑* CT (duas doses) e HDL (500 mg/kg) séricos; ↑* CT 	<ul style="list-style-type: none"> Alteração no metabolismo lipídico e dano hepático: acúmulo de lipídios, aumento de TG, taxa de degeneração hidrópica 	CBZ induziu alterações histopatológicas hepáticas, distúrbio do metabolismo lipídico, disbiose da microbiota intestinal e inflamação em camundongos (LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia)

	<p>piruvato; dosagem hepática de TG, piruvato, proteínas; extração de RNA e RT-qPCR; dosagem sérica de IL-1β e IL-6; sequenciamento de DNA do genoma microbiano; dosagem dos níveis hepático, intestinal e fecal de resíduos de CBZ (HPLC); histopatologia hepática.</p>	<p>(100mg/kg) e TG (500 mg/kg) hepáticos;</p> <ul style="list-style-type: none"> • CBZ interrompeu o metabolismo lipídico do fígado por meio da regulação positiva de muitos genes-chave; • CBZ induziu resposta inflamatória no fígado \uparrow^* IL-1β e IL-6 séricas (500mg/kg); \uparrow^* RNAm de IL-1β e IL-6 no fígado (ambas as doses), contribuindo para o distúrbio do metabolismo lipídico. • CBZ não absorvido no TGI induziu disbiose intestinal, com redução da diversidade bacteriana 		
Jin et al., 2018	<p>Pureza: $\geq 98\%$;</p> <p>Linhagem: Camundongos C57BL/6 σ;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=8). Administração oral de CBZ (0,2; 1 e 5 mg/kg p.c./dia) por 98 dias. Análise: histoquímica da gordura epididimal, fígado e cólon; dosagem sérica de glicose, CT, ácidos graxos livres, TG, LPL, insulina, LCN-2, TNF-α, IL-1β, LPS; dosagem hepática de TG; determinação das atividades LPL; sequenciamento de DNA do genoma microbiano; extração de RNA total e análise da expressão gênica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • \uparrow^* peso relativo do fígado ($\geq 0,2$ mg/kg) e da gordura epididimal (≥ 1 mg/kg); • Metabolismo lipídico: \downarrow^* LPL sérico, com \uparrow^* TG sérico ($\geq 0,2$ mg/kg, sem alteração no TG hepático; \uparrow^* ácidos graxos livres; • Histopatologia: sem acúmulo lipídico no fígado; infiltrado de células inflamatórias na gordura epididimal e no cólon; • CBZ apresentou ação pró- 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ induziu expressões gênicas relacionadas à síntese de TG, de ácidos graxos e ao armazenamento no tecido adiposo 	<p>CBZ induziu disbiose da microbiota intestinal, alteração no metabolismo lipídico, com hiperlipidemia e resposta inflamatória em múltiplos tecidos (LOAEL = 0,2 mg/kg)</p>

		<p>inflamatória (↑*TNF-α, IL-1β, LCN-2) e imunossupressora (↓* IL-17 α).</p>		
Salihu et al., 2015	<p>Pureza: ≥98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10). Administração oral de CBZ (50 mg/kg p.c./dia) por 14 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem bioquímica (ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina, ureia e creatinina) e de indicadores de estresse oxidativo (SOD, CAT, GST, GPX, GSH, H₂O₂); histopatologia renal e hepática.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* peso relativo fígado; • ↓* leucócitos, linfócitos e plaquetas; ↑* neutrófilos; • ↑* ALT, AST, FA, GGT, bilirrubina, ureia e creatinina, indicando danos de função hepática e renal; • ↓* SOD, CAT, GST GSH (fígado e rins) e ↓* GPX (fígado); ↑* H₂O₂ e MDA (indicando peroxidação lipídica no fígado e rins); • Alterações histopatológicas renal (degeneração severa, inflamação com congestão de vasos, infiltração lipídica da medula e túbulos convolutos) e hepática (necrose, discreta dilatação de sinusóides com presença de células inflamatórias). 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo de toxicidade hepática e renal, para verificação dos efeitos do composto 6- gingerol. 	<p>CBZ induziu toxicidade renal e hepática (alteração bioquímica e histopatológica), associados à imunossupressão, indução de inflamação e estresse oxidativo (LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia)</p>
Selmanoglu et al., 2001	<p>Pureza: ≥98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c.) por 105 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ≥150 mg/kg p.c./dia: ↓* leucócitos e linfócitos; • Em 600 mg/kg p.c./dia: ↑* colesterol sérico, albumina, glicose e creatinina; e ↓* VLDL; 	-	<p>CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas no fígado e rins (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)</p>

	bioquímica; histopatologia renal e hepática.	<ul style="list-style-type: none"> Alterações histopatológicas (≥ 150 mg/kg p.c./dia): I) Hepática: congestão da veia porta, infiltração de células mononucleares, degeneração hidrópica; e II) Renal: degeneração tubular, congestão, infiltração de células mononucleares, fibrose. 		
Songur et al., 2004	<p>Pureza: 98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar Swiss albinos ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10) – CBZ administrado via gavagem (150, 300 e 600 mg/kg p.c.) por 105 dias. Análise: histopatologia do timo e IHQ para fibronectina (FN).</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↓* dose-dependente no peso relativo do timo e ↑* marcação de FN (≥ 150 mg/kg p.c./dia); Alterações histopatológicas: fibrose e edema (300 e 600 mg/kg p.c./dia). 	<ul style="list-style-type: none"> Aumento da densidade de FN pode estar associado ao aumento do tecido conectivo intersticial nas regiões com fibrose e edema no timo. 	CBZ induziu alterações histopatológicas no timo (LOAEL = 150 mg/kg p.c./dia)
Zari et al., 2011	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10). Administração oral de CBZ (200 mg/kg p.c./dia) por 30 dias. Análise: parâmetros hematológicos; dosagem bioquímica (glicose, proteína total, TG, colesterol, creatinina, ALT, AST séricos; glicogênio, lipídeo e proteína hepáticos) e histopatologia renal, hepática e testicular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Parâmetros hematológicos: ↓* hemácias, Hb, hematócrito; ↑* leucócitos; Dosagens bioquímicas: ↓* proteína total sérica e hepática; ↑* glicose, TG, colesterol, creatinina, ALT, AST, glicogênio e lipídeo total; Alterações histopatológicas: I) hepáticas: desarranjo dos filamentos, aumento dos sinusoides, formação de vacúolos, 	<ul style="list-style-type: none"> CBZ usado como modelo de dano testicular; Influência do CBZ nos órgãos de hematopoese, com indução de anemia Alteração no metabolismo da glicose no fígado (inibição da glicogenólise e estimulação da gliconeogênese); redução na taxa de síntese proteica. 	CBZ induziu alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas, características de toxicidade hepática, renal e testicular (LOAEL = 200mg/kg p.c./dia)

		<p>dilatação e congestão dos vasos sanguíneos com hemorragia; II) renais: desarranjo do córtex renal e tecidos da medula com congestão severa de vasos sanguíneos e hemorragia; corpúsculos renais com degeneração dos glomérulos e cápsulas de Bowman; III) testiculares: ausência total de espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes e espermatozoides.</p>		
Salihu et al., 2017b	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem – 50mg/kg p.c./dia; n = 10) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e status antioxidante (testículo e epidídimo), dosagens hormonal (TSH, T₃, T₄, prolactina, testosterona, LH, FSH) e bioquímica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* pesos absoluto e relativo dos testículos; sem efeitos no ganho de peso corporal e nos pesos absoluto e relativo do epidídimo, vesícula seminal e próstata; • ↓* motilidade, contagem de espermatozoides testiculares e epididimais, alterações morfológicas (cabeças sem cauda, peças intermediárias curvadas e dobradas); • Redução da capacidade antioxidante com indução de estresse oxidativo e peroxidação 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Análise morfológica de 400 espermatozoides/animal; 	<p>CBZ induziu toxicidade testicular, estresse oxidativo e alterações em hormônios sexuais e tireoidianos (LOAEL = 50mg/kg p.c./dia)</p>

		<p>lipídica (↓* catalase, GST e GSH e ↑* H₂O₂, ↑* MDA) nos testículos e epidídimo;</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓* dos níveis plasmáticos de testosterona, TSH, T₃, T₄; ↑* FSH sem afetar LH e prolactina; • Alterações histopatológicas: epitélio seminífero degenerado com poucos espermatozoides, presença de células espermatogênicas descamadas no lúmen de alguns túbulos; congestão severa dos vasos intersticiais; epidídimo com formato irregular e poucos espermatozoides. 		
<p>Estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014)</p> <p>Análise baseada no relatório da USEPA (2020) e e PMRA (2019).</p>	<p>Pureza: 99,5%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar Hannover [Crl:WI (HAN)];</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> de uma geração estendida.</p> <p>Geração P: Administração dietética de CBZ (n = 30/ sexo/ dose; 0, 250, 1000 ou 2000 ppm (equivalente à dose média diária pré-acasalamento na geração P de 0; 13,9; 53,2 ou 106,7 mg/kg p.c./dia em ♂ e 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia em ♀) por 4 semanas antes do acasalamento, por 14 dias de acasalamento e</p>	<p><u>Toxicidade parental (P e F1 adultos):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥250ppm: ↑ T₄ e TSH em ♀P (sg somente em 1000ppm); • ≥1000ppm: ↓sg T₃ em ♂ F1 coorte 1b; ↓sg área coloidal e ↑ altura das células foliculares em ♀P; • 2000ppm: ↑sg peso absoluto/ relativo tireoide, ↓área coloidal/ ↑ altura das células foliculares em ♀ F1 coorte 1b. <p><u>Prole:</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Estão aqui detalhados somente os efeitos adversos para a tireoide. Os efeitos sobre o desenvolvimento e a fisiologia reprodutiva serão detalhados em pareceres específicos. 	<p>CBZ induziu alterações na homeostase tireoidiana (LOAEL = 16,2 mg/kg p.c./dia)</p>

	<p>até DPN₈₅ (♂) ou até o desmame da prole F1 no DL₂₂ (♀);</p> <p><u>Geração F1:</u> Administração dietética do desmame ao término do estudo. Coorte 3 (12/sexo/ dose) - Dosagem de hormônios tireoidianos, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN₂₃.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ≥1000ppm: ↓ dose-dependente T₄ no DPN₄ de F1 (sg em 2000ppm); ↑sg T₄ (♂) e TSH (♀/♂), além de ↓sg área coloidal/ ↑ altura das células foliculares (♂) no DPN₂₃; • 2000ppm: ↑sg T₄ (♀/♂) e TSH (♀); ↓sg área coloidal/ ↑ altura das células foliculares (♀/♂ no DPN₂₃). 		
--	--	---	--	--

MPO: Mieloperoxidase; ON: óxido nítrico; FA: fosfatase alcalina; LD: Lactato desidrogenase; CK: creatina kinase; CT: colesterol total; LPL: lipase lipoproteica; GSH: Glutathione, SOD: Superóxido dismutase; GST: Glutathione tranferase; CAT: Catalase; GPX: Glutathione peroxidase; MDA: malondialdeído; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; P: Parental; DPN: Dia pós-natal; DL: Dia lactacional.

Quanto à classificação do CBZ, segundo a RDC nº 294, de julho de 2019, a FT sugere o seu enquadramento na Categoria 2 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos.

4.2. Toxicidade testicular

Na busca sistemática, vários estudos analisados relataram toxicidade testicular após exposição repetida ao CBZ (alta pureza) pela via oral, em ratos e camundongos (Evenson et al., 1987; Gray et al., 1989; Rajeswary et al., 2007; Yu et al., 2009; Jones e Al-Attar, 2011; Pacheco et al., 2012; Moffit et al., 2013; Breslin et al., 2013; Dere et al., 2016; Sakr e Shalaby, 2014; Liu et al., 2019; Li et al., 2020). Dentre os efeitos adversos descritos, os principais foram: redução no peso testicular, no nível de testosterona sérica, na atividade das enzimas esteroideogênicas (Rajeswary e colaboradores, 2007) e em vários parâmetros espermáticos – como na motilidade espermática já em doses ≥ 0,1mg/kg p.c./dia (Liu et al., 2019); alterações histopatológicas testiculares (dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli) e epididimárias (edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares) em doses ≥ 20 mg/kg p.c./dia, com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração (Breslin et al., 2013); toxicidade direta às células germinativas com interrupção da espermatogênese; infertilidade, a qual foi altamente correlacionada com depleção de células germinativas, elevação de LH e FSH séricos e alterações nas funções das células de Leydig (Gray et al., 1989).

A exposição crônica dietética ao CBZ também revelou degeneração testicular progressiva em ratos e cães. Num estudo conduzido em ratos, com exposição por dois anos, (Sherman et al., 1972 apud APMVA, 2009), foram observadas incidências aumentadas de atrofia testicular difusa na dose de 250 mg/kg p.c./dia. Em cães, também após 2 anos de exposição ao CBZ, foi relatada a ocorrência de infiltrados de células inflamatórias mononucleares intersticiais e de túbulos atróficos dos testículos, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia (Reuzel et al., 1976 apud APMVA, 2009).

Nos relatórios das agências canadense e europeia, os testículos também foram considerados órgão-alvo para a exposição ao CBZ (PMRA, 2010; EFSA, 2011). Já a agência americana, em seu relatório, expôs que, apesar do conjunto de evidências indicativas dos testículos como um órgão-alvo, os efeitos não foram observados em todos os estudos e a exposição via gavagem parece potencializar o efeito tóxico, em comparação à exposição dietética. Já no estudo de exposição dérmica por 28 dias em ratos, verificou-se degeneração dos túbulos seminíferos testiculares e hipospermia, com persistência

durante um período de recuperação de 10 semanas. Quanto a isso, a USEPA discutiu que a administração dérmica efetuada em um veículo oleoso pode ter potencializado a absorção percutânea em relação às diluições aquosas. Adicionalmente, a ausência de metabolismo de primeira passagem após a absorção dérmica pode ter contribuído para o aumento da dose testicular, em relação à administração oral de uma dose equivalente. Em contraste, a USEPA relata que nenhum efeito adverso testicular foi observado na geração parental ou filial no estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida, conduzido em ratos com exposição dietética, nem na maior dose testada (107 mg/kg p.c./dia em machos) (USEPA, 2020).

O dano testicular causado pelo CBZ decorre da inibição da associação de microtúbulos, o que acarreta falha na segregação cromossômica durante a meiose espermiática, necrose dos espermatócitos meióticos, descamação de espermátides imaturas, atrofia do túbulo seminífero, anormalidades nas espermátides longas e alongadas (inclusive no acrossoma), com formação de magaespermátides e simplastos (PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº [1309909](#)). Então, diante das evidências acima descritas, conclui-se que a toxicidade testicular é um importante desfecho toxicológico associado à exposição ao CBZ, o qual teve a sua discussão aprofundada, por ser um aspecto toxicológico proibitivo de registro, no parecer nº 12/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1517596](#)), com a análise dos estudos específicos relevantes. Adicionalmente, o Parecer de Mutagenicidade (SEI nº [1309909](#)) pode ser consultado para a obtenção de informações acerca do mecanismo subjacente à toxicidade testicular, o qual está relacionado à capacidade de interação do CBZ com elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos, com consequente indução de aneuploidia.

4.3. Toxicidade para a tireoide

A tireoide foi considerada um órgão-alvo pela agência americana (USEPA, 2020), tendo sido relatada também por outras agências internacionais a ocorrência de efeitos adversos nessa glândula (EFSA, 2010; PMRA, 2011; APMVA, 2009). No estudo de toxicidade dérmica de 28 dias em ratos, os níveis de T₄ aumentaram em fêmeas nos dois grupos de dose mais elevadas (40%, p<0,05 em 480 mg/kg/dia; e 31% em 720 mg/kg/dia), sem alterações relevantes no peso ou na histopatologia desse órgão. Em cães, três estudos crônicos pela via oral relataram aumento de TSH sérico, redução de T₄, aumento no peso absoluto e relativo da tireoide e hipertrofia dos folículos, com definição de NOAEL em 7,5 mg/kg p.c./dia (USEPA, 2020; Reuzel et al., 1976; Til et al., 1972 apud APMVA, 2009).

No estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida (EOGRTS, 2014), foram relatadas alterações nos níveis plasmáticos de hormônios e na histopatologia da tireoide em 1.000 e 2.000 ppm (≥ 53 mg/kg p.c./dia), nos animais das gerações parental (P) e F1 adulta, como também na prole F1 e F2. Os efeitos foram mais pronunciados em fêmeas P, nas quais os níveis plasmáticos de T₄ aumentaram em todos os grupos tratados (p > 0,05 a 16,2 e 67,6 mg/kg p.c./dia), como também os níveis de TSH (64, 164 e 92%, p <0,05 a 67,6 mg/kg p.c./dia). Ainda nas fêmeas P, verificou-se uma mínima a leve hipertrofia microscópica da célula folicular em 67,6 (2/29) e 136,8 (3/23) mg/kg p.c./dia. Uma diminuição estatisticamente significativa na área coloidal e um aumento na altura das células foliculares foram observados na análise microscópica semiquantitativa da tireoide a partir de 67,6 mg/kg p.c./dia. Nenhum efeito foi observado em machos P, exceto por uma diminuição não significativa (19%) em T₄ em 106,7 mg/kg p.c./dia. Similarmente, na prole F1 adulta, nenhum efeito sobre a tireoide foi observado em machos (DPN₁₄₈) ou fêmeas (DG₂₀) da coorte 1a. Já em machos da coorte F1 1b (DPN₁₇₅) foi verificada uma diminuição significativa em T₃ (19% e 18%), em doses a partir de 53,2 mg/kg p.c./dia, mas nenhum outro efeito nos hormônios tireoidianos ou na análise histopatológica. Nas fêmeas da coorte F1 1b (DL₂₂), não foram relatados efeitos hormonais, mas houve um aumento significativo no peso absoluto/ relativo da tireoide (18%/ 25%) na maior dose. Também foram observadas diminuição da área coloidal/ aumento da altura das células foliculares (USEPA, 2020). Com relação à prole ainda jovem, também foram relatadas alterações nos níveis dos hormônios tireoidianos, na área coloidal e na altura das células foliculares, porém sem consistência entre as coortes ou diferentes idades analisadas. Em F1, no DPN₄ relatou-se diminuição dose-dependente nos níveis séricos de T₄, nos níveis de dose

intermediária (53,2 e 67,6 mg/kg p.c./dia, respectivamente ♂/♀) e alta (106,7 e 136,8 mg/kg p.c./dia, respectivamente ♂/♀), sendo significativo somente na maior dose. Porém, o TSH não foi afetado e a histopatologia não foi avaliada (USEPA, 2020). Essa redução nos níveis séricos de T₄ sem alteração de TSH foi atribuída à imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, sabidamente presente em ratos no período pós-natal inicial (PMRA, 2019). No DPN₂₃, machos F1 (coorte 3) tratados com 53,2 mg/kg p.c./dia exibiram aumentos significativos em T₄ e TSH (42% /21%) e alterações significativas na área coloidal/altura das células foliculares (-12%/+ 43%). Já em fêmeas, apenas o TSH foi aumentado (28%). No maior nível de dose (106,7 e 136,8 mg/kg p.c./dia, em machos e fêmeas respectivamente), foram relatados aumentos significativos nos níveis de T₄ (53% ♂/ 22% ♀) e TSH (41% ♀), além de significativa redução na área coloidal/ aumento na altura de células foliculares em ambos os sexos. Em contraste, filhotes F2 no DPN₂₃ mostraram apenas aumentos não significativos em T₄ (20% ♂) e TSH (26% ♀). No DPN₄₅, essas alterações permaneceram em fêmeas tratadas com a maior dose. Não se verificou uma correlação positiva consistente entre a altura da célula folicular e os níveis de T₄ ou TSH nos animais tratados. Nenhuma mudança nos parâmetros tireoidianos foi observada na prole tratada com a menor dose (13,9 e 16,2 mg/kg p.c./dia, em machos e fêmeas respectivamente).

No geral, embora os efeitos na tireoide não tenham sido consistentes entre os sexos, idades e gerações, em fêmeas P, as evidências de alterações em T₄ e TSH, juntamente com leve hipertrofia da tireoide e aumento da altura das células foliculares / diminuição da área colóide folicular, foram considerados pela USEPA como indícios de perturbação da homeostase da tireoide e, portanto, um efeito adverso (USEPA, 2020). Em alinhamento, a PMRA considerou o aumento do TSH em associação às alterações histopatológicas observadas na tireoide como sugestivos de que a exposição ao CBZ induziu hipotireoidismo em animais adultos (PMRA, 2019).

Com relação aos estudos da literatura, Salihu et al (2017b) também relataram que a exposição ao CBZ (gavagem; 50 mg/kg p.c./dia) por 14 dias induziu uma redução dos hormônios tireoidianos (TSH, T₃ e T₄), os quais desempenham um papel regulador na atividade metabólica basal testicular, esteroidogênese e espermatogênese. Em oposição, se verificou aumento significativo de T₃ e alterações histopatológicas na tireoide, em doses ≥ 150mg/kg p.c./dia por 105 dias (Barlas et al, 2002). Isso se assemelha às inconsistências observadas entre os sexos, idades e gerações relatadas no estudo EOGRTS (2014). Portanto, conclui-se que há evidências sugestivas de efeitos do CBZ na homeostase da tireoide, conforme também apontado pelas agências americana (USEPA, 2020) e canadense (PMRA, 2019).

4.4. Toxicidade hepática e renal

A administração dietética e via gavagem, de curta e longa duração em ratos e cães, está associada a efeitos no fígado e rins, os quais são órgãos-alvo primários em ambas as espécies. A natureza e a gravidade dos efeitos verificados diferem a depender do método de administração. Então, em estudos subcrônicos de toxicidade oral, o aumento do peso do fígado foi o principal efeito em ratos e cães, em associação a alterações patológicas hepáticas e efeitos no peso corporal em doses mais elevadas no cão. Verificou-se efeitos mais severos após administração de doses inferiores via gavagem, em ratos e cães, incluindo efeitos hematológicos e bioquímicos, lesões renais degenerativas e alterações patológicas no fígado (reações inflamatórias, inchaço dos hepatócitos, infiltração periportal hepática, regeneração hepática), bem como mortalidade em ratos (PMRA, 2011). Um estudo com exposição dietética por 13 semanas em ratos relatou aumento no peso relativo do fígado na maior dose testada (67,5 mg/kg p.c./dia), com definição de NOAEL em 22,5 mg/kg p.c./dia (APVMA, 2009). Em cães, a administração dietética de CBZ (pureza não informada) por 28 dias acarretou aumento no peso do fígado e alterações histopatológicas (infiltração celular periportal, hepatócitos aumentados e de coloração diferente), com definição de NOAEL em 19-21 mg/kg p.c./dia (fêmeas e machos) (Til et al., 1971 apud APVMA, 2009).

A administração prolongada de CBZ está associada a efeitos adversos hepáticos, observados em camundongos, ratos e cães. Em ratos, os efeitos relatados foram inchaço hepatocelular, necrose e hipertrofia celular em áreas centrolobulares e intermediárias. Adicionalmente, em ratos e cães,

verificou-se um aumento do peso do fígado, associado a níveis elevados de alanina aminotransferase sérica e/ou fosfatase alcalina (PMRA, 2011). Estudos crônicos (2 anos) em ratos evidenciaram aumento do peso relativo do fígado, redução dos níveis de AST e outros sinais de hepatotoxicidade na dose de 100 mg/kg p.c./dia (Til et al., 1976 apud APMVA, 2009; USEPA, 2020), com menor NOAEL de 15 mg/kg p.c./dia para ratos. Já dois estudos em cães, com administração dietética de CBZ (pureza não informada) por 90 dias e dois anos, evidenciaram aumento de fosfatase alcalina e peso relativo do fígado na dose de 50 mg/kg p.c./dia, com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia (Reuzel et al., 1976; Til et al., 1972 apud APMVA, 2009). Na busca sistemática, uma série de estudos da literatura indicaram toxicidade hepática após exposição repetida ao CBZ (alta pureza) pela via oral, em ratos e camundongos (Abolaji et al., 2016; Đikić et al., 2012a; Janardhan et al., 1987; Jin et al., 2015; Jin et al., 2018; Salihi et al., 2015; Selmanoglu et al., 2001; Zari et al., 2011) e em cães (Janardhan et al., 1988), verificada pelo aumento dos marcadores de função hepática (ALT e AST) e de bilirrubina, além de várias alterações histopatológicas, verificadas já a partir de 7 dias de exposição. As principais evidências foram: dilatação de sinusóides, desarranjo dos filamentos, formação de vacúolos, degeneração hidrópica, presença de células inflamatórias, infiltração de células mononucleares, focos de necrose com alteração na arquitetura lobular, alterações na heterocromatina nuclear, dilatação e congestão da veia porta com hemorragia. O valor de LOAEL estabelecido a partir desses estudos foi 16 mg/kg p.c./dia em ratos (Janardhan et al., 1987) e 20 mg/kg p.c./dia em cães (Janardhan et al., 1988).

Segundo esses estudos, a toxicidade hepática pode ser decorrente do processo inflamatório e de estresse oxidativo induzidos pelo CBZ no fígado, com depleção da capacidade antioxidante (GSH, SOD, GST, CAT, GPX) e elevação nos níveis de marcadores inflamatórios (ON, IL-1 β e IL-6) e de peroxidação lipídica (H₂O₂, MPO, MDA). Como consequência da toxicidade hepática, alguns estudos indicaram alteração no metabolismo lipídico (elevação de TG e colesterol) e redução dos níveis de proteína total.

Adicionalmente, dados da literatura indicaram toxicidade renal em roedores (Abolaji et al., 2016; Janardhan et al., 1987; Salihi et al., 2015; Selmanoglu et al., 2001; Zari et al., 2011) e em cães (Janardhan et al., 1988), após exposição oral repetida ao CBZ, com ocorrência de aumento nos níveis de ureia e creatinina séricas (marcadores de função renal), além de várias alterações histopatológicas renais: infiltração neutrofílica, dilatação tubular, degeneração hidrópica, fibrose periglomerular, infiltração lipídica da medula e túbulos convolutos, hialinização e extensa congestão vascular com hemorragia; corpúsculos renais com degeneração dos glomérulos e cápsula de Bowman. Assim como no fígado, nos rins também se verificou ocorrência de estresse oxidativo e processo inflamatório.

4.5. Outros efeitos associados à exposição ao Carbendazim

Dois estudos avaliaram o efeito do CBZ sobre a microbiota intestinal de camundongos, com as possíveis alterações metabólicas e histopatológicas, além dos processos inflamatórios associados (Jin et al., 2015; Jin et al., 2018) (Tabela 1). No primeiro estudo, Jin e colaboradores (2015) relataram que a administração oral de altas doses de CBZ (≥ 100 mg/kg p.c./dia, por 28 dias) alterou rapidamente a composição da microbiota intestinal, resultando em distúrbio metabólico lipídico hepático e processo inflamatório. Houve redução na proporção de bactérias benéficas e aumento das bactérias patogênicas. No segundo estudo, Jin e colaboradores (2018) relataram que a exposição crônica a baixas doses de CBZ ($\geq 0,2$ mg/kg p.c./dia, por 14 semanas), também induziu disbiose da microbiota intestinal (redução da diversidade bacteriana), o que acarretou aumento da absorção de TG exógeno pelo intestino e redução no consumo de TG (causa direta da hiperlipidemia e da resposta inflamatória multitecidual). Com isso, houve aumento de TG sérico e, conseqüentemente, inibição da síntese hepática de TG e indução do armazenamento de lipídios no tecido adiposo, de modo a compensar a absorção intestinal em excesso. Essa alteração na microbiota também afetou a barreira imunológica, o que acarretou o aumento na secreção de muco e resposta inflamatória no cólon, além de outros tecidos (Jin et al., 2018).

5. EVIDÊNCIAS DE NEUROTOXICIDADE (NT)

Em seu relatório, a FT mencionou os posicionamentos da EFSA e da USEPA quanto à ausência de qualquer potencial neurotóxico direto do CBZ. Então, considerando que nenhum estudo específico de NT foi apresentado pela FT, tampouco foram obtidos estudos com esse desfecho na busca sistemática realizada pela CREAV, as conclusões apresentadas nesse item se embasaram nas discussões dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais consultadas. Desse modo, para a análise desse desfecho toxicológico, as evidências disponíveis nos relatórios foram: estudo de NT aguda oral em ratos; estudo de NT tardia após exposição aguda, conduzido em galinhas; estudo de toxicidade reprodutiva (TR) de uma geração estendida em ratos (Diretriz OECD 443); estudo de toxicidade dérmica de 28 dias em ratos. Todas as agências consultadas relataram que não foram verificadas evidências clínicas ou histopatológicas de NT relacionada ao CBZ (USEPA, 2020; EFSA, 2010; PMRA, 2011; APVMA, 2012).

5.1. Estudo de NT aguda

Não estão disponíveis estudos de NT conduzidos pela via oral em roedores para o CBZ. No relatório da agência americana (USEPA, 2020), foi utilizado um estudo conduzido com o Benomil (pureza de 94,7%) em ratos, com administração única via oral (por gavagem) nas doses de 500, 1.000 ou 2.000 mg/ kg. Considerando a rápida metabolização de Benomil em CBZ, as doses equivalentes de CBZ foram calculadas, por meio de um fator de 0,67 para as diferenças no peso molecular, resultando nas doses de 335, 670 ou 1.340 mg/ kg. Foram conduzidos sequencialmente os testes de bateria de observação funcional (FOB) e de atividade motora, em 2 horas pós-dosagem no dia 0, 1, 7 e 14. Foi realizada análise macroscópica e microscópica dos tecidos do sistema nervoso central e periférico (SNC e SNP) de 5 ratos/sexo/dose ao término do estudo, no dia 14, após a perfusão *in situ*. Nas doses de 500 mg/kg e 1.000 mg/kg, foram verificadas alterações testiculares na necropsia, as quais foram consideradas relacionadas ao tratamento, mesmo na ausência de dose-resposta, tendo em vista que os testículos são, sabidamente, um órgão-alvo para o Benomil e o CBZ, conforme será detalhado posteriormente no item específico de toxicidade testicular. Quanto aos parâmetros de NT, na maior dose testada (2.000 mg/kg), verificou-se redução da atividade motora em fêmeas no dia um (-39% abaixo do grupo controle), com recuperação no dia oito. Não foram verificados efeitos adversos relacionados ao tratamento na sobrevivência, sinais clínicos, peso corporal médio, parâmetros da FOB ou no exame neuropatológico. Houve redução das atividades motoras médias, em machos e fêmeas, somente no dia um (39% e 38% abaixo do controle, respectivamente). Entretanto, essas alterações não foram consideradas adversas por não terem significância estatística em relação ao controle e não terem sido observadas nos momentos de avaliação posteriores (dias sete e 14). Os estudos de controle positivo demonstraram a capacidade do laboratório em conduzir testes de triagem de NT.

5.2. Estudo de NT tardia

O estudo disponível de NT tardia após exposição aguda antecede a publicação da Diretriz OECD 418, entretanto, o protocolo de teste está, em grande medida, em conformidade com a referida diretriz. Os desvios verificados são: não há relato sobre o estado inicial de saúde dos animais; a faixa de idade dos animais foi de seis a 14 meses; não foram efetuados cortes da medula oblonga; foram utilizadas 10 galinhas nos grupos tratados e 20 galinhas nos respectivos grupos controle negativo e positivo, o que excede ao previsto na diretriz; o período de observação foi de 28 dias (EFSA, 2010). O CBZ foi administrado em dose única (gavagem – 500, 2.500 e 5.000 mg/kg) a galinhas poedeiras, enquanto o grupo controle positivo recebeu TOCP (triortocresil fosfato). Diariamente, por quatro semanas, foram registradas as taxas de mortalidade e demais sinais clínicos de NT. No grupo controle positivo, foram verificados efeitos neurotóxicos (fraqueza nas pernas, ataxia). Na maior dose testada (5.000 mg/kg), verificou-se toxicidade sistêmica e sinais neurotóxicos transitórios (ataxia e fraqueza nas pernas). Já nos grupos de doses inferiores (500 e 2.500 mg/kg), verificou-se apenas leve salivação. Adicionalmente, o exame microscópico não indicou degeneração axonal ou desmielinização em nenhum dos grupos tratados (Goldenthal, 1978). Como conclusão desse estudo, a EFSA (2010) estabeleceu um NOAEL para NT de 2.500 mg/kg p.c., com base na ataxia e fraqueza nas pernas observados no nível de dose superior a

esse. Um NOAEL para toxicidade sistêmica não pode ser estabelecido devido à salivação verificada em todos os grupos tratados. Nos relatórios das agências canadense e europeia, consta ainda um estudo complementar em galinhas – com administração dietética por 21 dias (40, 80 e 400 mg / kg p.c.) – no qual se verificou, somente em um animal do grupo de maior dose (400 mg/kg p.c.), aumento na atividade de colinesterase sérica e leve ataxia por aproximadamente dois dias, seguidos de completa recuperação. Nenhum outro efeito neurotóxico foi observado nos demais animais (EFSA, 2010; PMRA, 2011). Nos relatórios mais recentes das agências europeia, australiana e americana, concluiu-se que não há NT tardia associada ao CBZ (EFSA, 2010; USEPA, 2020; APVMA, 2012). Já a agência canadense concluiu que há sinais de NT tardia na maior dose testada (400 mg/kg) (PMRA, 2011).

Dois estudos não regulatórios relataram que o CBZ não apresentou efeito inibitório de atividade de colinesterase em ratos (via gavagem, por 90 dias) e em cães (administração pela dieta, por 13 semanas) (Janardhan et al., 1987, 1988). Diante das evidências apresentadas, e alinhada às demais agências internacionais, conclui-se que não há indício de NT tardia induzida pela exposição ao CBZ.

5.3. **Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida (Diretriz OECD 443)**

Considerando que esse estudo inclui uma coorte de neurotoxicidade para o desenvolvimento (DNT), ele é considerado adequado para avaliar desfechos de DNT, em substituição ao estudo regulatório específico para DNT (Diretriz OECD 426). Nos relatórios das agências europeia e australiana, esse estudo ainda não estava disponível, o que levou à exigência, em razão da constatação de evidências de danos ao desenvolvimento do sistema nervoso, possivelmente induzidos pelo CBZ. Então, segundo o relatório da USEPA (2020), não houve alteração relacionada ao tratamento nos sinais clínicos, exame oftalmológico, parâmetros de FOB, atividade motora e locomotora, parâmetros de sobressalto auditivo, pesos cerebrais, medições cerebrais macroscópicas e microscópicas, neuropatologia cerebral ou quaisquer outras evidências neuropatológicas. Ela relata ainda que as diferenças estatisticamente significativas na morfometria cerebral foram de pequena magnitude, não exibiram um padrão dose-dependente e, portanto, não foram consideradas relacionadas ao tratamento. Por outro lado, no estudo de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal, conduzido em ratos, foram observadas malformações fetais referentes ao desenvolvimento da cabeça e do sistema nervoso central (SNC), tanto na presença quanto na ausência de toxicidade materna (PMRA, 2011). Foram observadas exencefalia, hidrocefalia, distensão dos ventrículos laterais, anoftalmia ou microftalmia e malformações cranianas na presença de toxicidade materna, no maior nível de dose (90 mg/kg/dia) (USEPA, 2020).

A agência americana alega que essas evidências são consistentes com os dados obtidos no mesmo tipo de estudo, efetuado com o fungicida Benomil, mas que evidências semelhantes não foram observadas em coelhos ou na coorte de DNT no estudo de toxicidade reprodutiva, conforme falado anteriormente, no qual o CBZ foi administrado na dieta e não por gavagem. Além disso, ela relata que esses dados estão alinhados aos estudos efetuados com o fungicida Benomil, cujos dados de NT aguda e subcrônica também não evidenciaram NT em doses relevantes para a avaliação do risco à saúde humana. Então, ela considera que os desfechos selecionados para avaliação de risco à saúde humana são protetores dos efeitos para o desenvolvimento descritos acima para ratos (USEPA, 2020). O conjunto de evidências aqui apresentado é insuficiente para se alcançar uma conclusão acerca do potencial de DNT associado ao CBZ, sendo necessária a análise direta dos estudos de toxicidade supracitados, cuja discussão é objeto do parecer de toxicidade para o desenvolvimento (Parecer SEI nº [1505782](#)).

5.4. **Estudo de toxicidade cutânea de 28 dias em ratos**

Os parâmetros neurocomportamentais (bateria de observação funcional e atividade motora) avaliados nesse estudo não indicaram efeitos relacionados ao tratamento com CBZ, tendo sido verificados somente um leve aumento na força de preensão dos membros anteriores e/ou posteriores em ambos os sexos (PMRA, 2011; USEPA, 2020).

6. **EVIDÊNCIAS DE IMUNOTOXICIDADE**

No relatório da FT, o desfecho de imunotoxicidade não foi mencionado. Similarmente, não foram relatadas evidências relevantes de imunotoxicidade por nenhuma agência reguladora (USEPA, 2020; PMRA, 2011; EFSA, 2010; APMVA, 2012). A USEPA, por exemplo, declarou em seu relatório que não há estudo de imunotoxicidade disponível para o CBZ, mas que foi recomendado que o requerimento para esse estudo seja dispensado. No estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida conduzido em ratos, não foi incluída a coorte de imunotoxicidade. No entanto, o estudo, conforme conduzido, não evidenciou um potencial imunotóxico do CBZ, com base na ausência de efeitos observados nos parâmetros hematológicos, de peso do órgão ou histopatologia (USEPA, 2020). No estudo de carcinogenicidade, os camundongos exibiram um aumento na depleção linfóide tímica na dose média de 225 mg/kg p.c./dia, mas tal efeito foi observado somente ao término do estudo e na presença de toxicidade hepática aumentada, inclusive com incidência aumentada de tumores hepáticos (USEPA, 2020).

Em um estudo não regulatório de toxicidade oral subcrônica, conduzido em ratos, relatou-se que a exposição ao CBZ (150, 300 e 600 mg/kg/dia; via gavagem por 15 semanas) induziu alterações histopatológicas (fibrose e edema) e redução dose-dependente no peso absoluto/ relativo do timo (≥ 150 mg/kg/dia), além de aumento na marcação de fibronectina (FN) (≥ 300 mg/kg/dia) (Songur et al., 2004). Adicionalmente, foram verificadas reduções significativas na contagem de leucócitos e linfócitos em roedores (Selmanoglu et al., 2001; Janardhan et al., 1987; Salihu et al., 2015) e em cães (Janardhan et al., 1988), em doses ≥ 16 mg/kg p.c./dia (Tabela 1).

Um estudo *in vitro* relatou inibição concentração-dependente da atividade enzimática lisossomal e da produção de óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β , em macrófagos peritoneais isolados de camundongos *Swiss*, a partir da concentração de 1 μ M de CBZ. Esse efeito foi considerado pelos autores um potencial mecanismo imunossupressor, por meio do qual esse IA inibe a função pró-inflamatória dos macrófagos (Helali et al., 2016).

A partir desses dados, verifica-se que uma possível imunotoxicidade associada ao CBZ, indicada pelos estudos da literatura, ocorreria somente em níveis de dose superiores àqueles responsáveis pela toxicidade para órgão-alvo (detalhada nos itens 3. e 4.). Alterações em parâmetros hematológicos, como redução de leucócitos e linfócitos, parecem ocorrer em doses inferiores, mas ainda cobertas pelos valores estabelecidos para toxicidade para órgão-alvo.

7. CONCLUSÃO

Com base nas informações apresentadas no relatório da FT e de outras agências reguladoras de agrotóxicos, bem como nos estudos obtidos na busca sistemática, conclui-se que:

- O CBZ sofre rápida absorção pelo TGI (biodisponibilidade de 85% após dose única via oral) e rápida distribuição para o fígado e os rins (dez minutos após administração oral), além de outros órgãos, porém com baixo potencial de acumulação tecidual. Embora os testículos sejam um órgão-alvo do CBZ, não houve detecção de resíduos nesse órgão. O principal metabólito é o 5-HBC (5,6-di-hidroxi-carbendazim e 2-AB, em menor escala). Não foram observadas diferenças significativas entre ratos e camundongos com relação ao metabolismo, mas o conteúdo residual no fígado foi menor em ratos, o que indica uma saturação da capacidade de detoxificação em camundongos mais rapidamente que em ratos. A excreção ocorre predominantemente pela urina (em baixas doses) e fezes (com aumento da dose), com taxa de eliminação superior a 98% em 72 horas, após administração de dose única. A excreção ocorre de forma bifásica, semelhante em machos e fêmeas e de modo dose-dependente.
- Estudos de dose única indicaram baixa toxicidade aguda pelas vias oral, cutânea e inalatória, além de ausência de potencial para irritação cutânea/ocular ou sensibilização cutânea.
- O CBZ se enquadra na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição única, em razão da toxicidade testicular observada em doses ≥ 50 mg/kg p.c..

- Não foram verificados efeitos neurotóxicos agudos, tampouco neurotoxicidade tardia após exposição aguda, associados à exposição ao CBZ. Entretanto, foram relatadas evidências relevantes de DNT, cuja discussão é objeto do parecer de toxicidade para o desenvolvimento (Parecer SEI nº [1505782](#)).
- Nenhuma agência internacional relatou a ocorrência de imunotoxicidade, mas a USEPA discutiu um estudo não regulatório, no qual foram verificados efeitos adversos no timo e na contagem de linfócitos e leucócitos, porém em um nível de dose superior àquele associado à toxicidade para órgão-alvo após exposição repetida (toxicidade hepática com NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia para cães e de 15 mg/kg p.c./dia para ratos).
- Após exposição repetida, foram relatadas alterações relevantes no fígado, rins, tireoide e testículos, em roedores e cães. A discussão de toxicidade testicular será aprofundada no parecer específico de toxicidade reprodutiva, por se tratar de um desfecho proibitivo de registro.
- O CBZ se enquadra na Categoria 2, em função da toxicidade para órgão-alvo específico por exposição repetida, com base na toxicidade hepática evidenciada nos estudos em ratos de 90 dias pela via oral, com menor LOAEL de 16 mg/kg p.c./dia.

8. ENCAMINHAMENTO

- Incluir na monografia a classificação do CBZ na Categoria 1 em função da toxicidade para órgão-alvo específico após exposição única, conforme o Anexo IV, Quadro 2, da RDC nº 294/2019, e a indicação da seguinte frase de perigo “Provoca danos aos testículos”, conforme o Anexo III da RDC nº 296/2019.
- Incluir na monografia do IA a classificação do CBZ na Categoria 2 em função da toxicidade para órgão-alvo específico após exposição repetida, conforme o Anexo IV, Quadro 3, da RDC nº 294/2019, e a indicação da seguinte frase de perigo “Pode provocar danos ao fígado por exposição repetida ou prolongada”, conforme o Anexo III da RDC nº 296/2019.

9. REFERÊNCIAS

Abolaji A.O., Awogbindin I.O., Adedara I.A., Farombi E.O.. **Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats.** Hum Exp Toxicol. 36(5):483-493. doi: 10.1177/0960327116652459. Epub 2016 Jun 6. PMID: 27268782. 2017.

Akbarsha, M.A., Vijendrakumar, S., Kadalmani, B., Girija, R., Faridha, A. **Curative property of Withania somnifera Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat.** Phytomedicine, Volume 7, Issue 6, 2000, Pages 499-507, [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80036-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80036-7).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia C-24, do ingrediente ativo Carbendazim.** 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/c24.pdf/a019eb91-b52d-492d-8140-ae82f54d5698>. Acessado em 26/09/2019.

APMVA, 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Australia Chemical Review Program. **Human Health Risk Assessment of Carbendazim.**

Barlas, N., Selmanoglu, G., Kockaya, A., Songür, S. **Effects of carbendazim on rat thyroid, parathyroid, pituitary and adrenal glands and their hormones.** Human & Experimental Toxicology. 2002;21(4):217-221. doi:10.1191/0960327102ht187oa

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. **The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ)**

following short-term repeat dosing in the male rat. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Dere, E., Wilson, S., Anderson, L., Boekelheide, K. **Sperm Molecular Biomarkers Are Sensitive Indicators of Testicular Injury Following Subchronic Model Toxicant Exposure.** Toxicological Sciences. 153. kfw137. 10.1093/toxsci/kfw137. 2016.

Dikić, D.; Landeka, I.; Knežević, F.; Mojsović-Čuić, A.; Benkovic, V.; Horvat, K.A.; Lončar, G.; Teparic, R.; Rogic, D. **Carbendazim Impends Hepatic Necrosis when Combined with Imazalil or Cypermethrin.** Basic & clinical pharmacology & toxicology. 110. 433-40. 10.1111/j.1742-7843.2011.00831.x. 2011.

EFSA. **Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim.** 2010.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. **Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry.** J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

GHS. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. ST/SG/AC.10/30/Rev.7. United Nations, 2017.

Goldenthal, E.I. (1978) **Neurotoxicity in hens.** Unpublished report from International Research and Development Corporation, Mattawan, Michigan, USA. Submitted to WHO by E.I. DuPont de Nemours and Co., Inc.

Gray LE Jr, Ostby J, Ferrell J, Sigmon R, Cooper R, Linder R, Rehnberg G, Goldman J, Laskey J. **Correlation of sperm and endocrine measures with reproductive success in rodents.** Prog Clin Biol Res. 302:193-206; discussion 206-9. PMID: 2666989. 1989.

Helali I, Ferchichi S, Maaouia A, Aouni M, Harizi H. **Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim pesticides.** J Immunotoxicol. (5):745-50. doi: 10.1080/1547691X.2016.1181124. Epub 2016 Jul 18. PMID: 27429139. 2016.

IPCS, 1993. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 149. **Carbendazim.**

Janardhan, A., Rao, A.B. & Sisodia, P. **Sub-chronic toxicity of methyl benzimidazole carbamate in rats.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 38, 890–898 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF01616717>

Janardhan, A., Bhaskar Rao, A. & Sisodia, P. **Short-term toxicity of methyl benzimidazole carbamate in dogs.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 41, 704–711 (1988). <https://doi.org/10.1007/BF02021022>

Jin Y, Zeng Z, Wu Y, Zhang S, Fu Z. **Oral Exposure of Mice to Carbendazim Induces Hepatic Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis.** Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology. 147(1):116-126. DOI: 10.1093/toxsci/kfv115. 2015.

Jin C, Zeng Z, Wang C, Luo T, Wang S, Zhou J, Ni Y, Fu Z, Jin Y. **Insights into a Possible Mechanism Underlying the Connection of Carbendazim-Induced Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis in Mice.** Toxicol Sci. 1;166(2):382-393. doi: 10.1093/toxsci/kfy205. PMID: 30496565. 2018.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR). **Pesticide residues in food - 1998.** Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Part I, residues, volume I.

Krechaniak, J. & Klosowska, B. (1986) **The fate of ¹⁴C-carbendazim in the rat.** Xenobiotica, 16: 809-815.

Lee, J., Wang, Y. Mark, G., Steve, D. **Carbendazim: Disposition, Cellular Permeability, Metabolite Identification, and Pharmacokinetic Comparison with Its Nanoparticle.** Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 92, no. 1, january 2003

Li, H., Zhang, P., Zhao, Y., Zhang, H.. **Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse spermatogenesis through epigenetic pathways.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 188, 109908, ISSN 0147-6513, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109908>. 2020.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. **Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation.** *Ecotoxicol Environ Saf.* 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Matsuo, F., Nakai, M. & Nasu, T. (1999) **The fungicide carbendazim induces meiotic micronuclei in the spermatids of the rat testis.** *J. Vet. Med. Sci* 61: 573-576.

Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. **Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetrorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats.** *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology.* 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.

Nakai, M. et al (1992). **Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat.** *J. Androl.*, 13: 507–518.

Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. **Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the Fischer 344 rat.** *PLoS One.* 7(8):e44280. doi: 10.1371/journal.pone.0044280. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22952946; PMCID: PMC3432073. 2012.

PMRA, 2011. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision PRD2011-04.** Carbendazim

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products.** PRVD2019-07. 28 June 2019.

Rajeswary, S., Kumaran, B., Ilangovan, R., Yuvaraj, S., Sridhar, M., Venkataraman, P., Srinivasan, N., Aruldas, M.M.. **Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats.** *Reproductive Toxicology*, Volume 24, Issues 3–4, Pages 371-380, ISSN 0890-6238, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.03.010>. 2007.

Sakr SA, Shalaby SY. **Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract.** *Toxicology and Industrial Health.* 30(3):259-267. doi:10.1177/0748233712456059. 2014.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. **6-Gingerol-Rich Fraction from Zingiber officinale Prevents Hematotoxicity and Oxidative Damage in Kidney and Liver of Rats Exposed to Carbendazim.** *J Diet Suppl.* 13(4):433-48. doi: 10.3109/19390211.2015.1107802. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26673969. 2016.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, de Souza D, Rocha JBT, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction from Zingiber officinale ameliorates carbendazim-induced endocrine disruption and toxicity in testes and epididymis of rats.** *Andrologia.* Jun;49(5). doi: 10.1111/and.12658. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546232. 2017b.

Selmanoğlu, G., Barlas, N., Songür, S., Koçskaya, E.A.. **Carbendazim-induced haematological, biochemical and histopathological changes to the liver and kidney of male rats.** *Human & Experimental Toxicology.* 2001;20(12):625-630. doi:10.1191/096032701718890603

Songür, S.H., Koçkaya, E., Selmanoğlu, G. and Barlas, N. (2005), **Dose-dependent effects of carbendazim on rat thymus.** *Cell Biochem. Funct.*, 23: 457-460. doi:[10.1002/cbf.1181](https://doi.org/10.1002/cbf.1181)

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-methyl and Carbendazim (MBC). Human health assessment scoping document in support of registration review.** 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment.** Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.

Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. **Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats.** *Toxicol Ind Health.* 25(1):41-7. doi: 10.1177/0748233709103033. PMID: 19318503. 2009.

Zari TA, Al-Attar AM. **Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 15(4):413-426. 2011.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 09/07/2021, às 20:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1463526** e o código CRC **5FBE6E49**.

Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1463526

Criado por [larissa.aguiar](#), versão 32 por [larissa.aguiar](#) em 09/07/2021 20:32:17.

PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise do potencial mutagênico do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia os estudos científicos, o relatório de Carbendazim e os de outras agências reguladoras acerca do potencial mutagênico do Carbendazim, a reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo estabelecido na RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AB: 2-aminobenzimidazol

AC: Aberração cromossômica

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AHP: Aminohidroxifenazina

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

CBZ: Carbendazim

CitoB: Citocalasina B

CHO: *Chinese hamster ovary* (ovário de hamster chinês)

CHL: *Chinese hamster lung* (pulmão de hamster chinês)

Creav: Coordenação de Reavaliação

DAP: Diaminofenazina

DG: Dia gestacional

DMT: Dose máxima tolerável

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FISH: Hibridação fluorescente *in situ*

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo

ip: Via intraperitoneal

it: Via intratesticular

LOAEL: *Lowest observed adverse effect level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável)

MN: Micronúcleo

MO: Medula óssea

NOAEL: *No observed adverse effect level* (Dose sem efeito adverso observável)

NOEL: *No Observed Effect Level* (Nível sem Efeito Observável)

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

PT: Produto técnico;

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint* (Ponto de checagem da formação de fuso)

sg: Significativo

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

WoE: *Weight of Evidence* (Peso da evidência)

vo: Via oral

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular. Na avaliação do potencial de mutagenicidade do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica obtidos mediante revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que o CBZ não provoca danos diretos ao DNA, tampouco mutações pontuais *in vitro* em células bacterianas (teste de Ames) e em células de mamíferos, exceto na presença de impurezas com relevância toxicológica, para as quais ficou estabelecido como limite as concentrações de 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP) para os produtos registrados no Brasil. Verificou-se ainda, nos estudos *in vitro* em células de mamíferos, que o CBZ não induz aberrações estruturais, mas causa aberrações numéricas em concentrações $\geq 0,2 \mu\text{g/mL}$ (NOEL = $0,1 \mu\text{g/mL}$). Os dados *in vivo* foram consistentes com os obtidos *in vitro* (ausência de mutações pontuais e clastogênese, com ocorrência de micronúcleo, poliploidia e aneuploidia), o que confere maior força ao peso da evidência quanto ao potencial de aneugenicidade do CBZ. Por fim, estudos *in vivo* em células germinativas de mamíferos (espermatozoides e ovócitos) também indicaram indução de aneuploidia, em doses $\geq 50 \text{ mg/kg/dia}$. Assim, considerou-se que essa dose não pode ser utilizada como um limiar adequado para derivar doses seguras para proteger a saúde de humanos, uma vez que: I) esse valor corresponde ao LOAEL, sendo desconhecida a dose sem efeito mutagênico para o CBZ (NOAEL); II) há evidências robustas demonstrando maior susceptibilidade dos ovócitos humanos à aneuploidia, em comparação aos espermatozoides e às células somáticas humanas e a roedores; III) espera-se agravamento decorrente do processo de envelhecimento característico desse tipo celular e polimorfismos de subpopulações. Ainda, cabe mencionar que os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com o CBZ, somados aos estudos mecanísticos avaliados, claramente indicam a indução do evento iniciador (ligação à tubulina) e de eventos-chave (despolimerização da tubulina, desorganização de fuso mitótico e indução de ovócitos aneuplóides) de uma Via de Efeito Adverso (AOP) já internacionalmente caracterizada - AOP 106 (ligação química à tubulina em ovócitos, levando a uma prole aneuplóide). Portanto, a referida AOP corrobora a classificação do CBZ como mutagênico para células germinativas. A descrição dessa AOP e de seus eventos-chaves aponta incertezas quantitativas que podem estar associadas a essa via e que interferem na escolha de um limiar adequado. A partir do conjunto de dados de mutagenicidade, associado aos estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva também analisados, conclui-se que o CBZ é um agente aneugênico e que não há evidência que permita estimar adequadamente uma dose *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células

germinativas em humanos. Isto é, não é possível definir um limiar de dose adequado, capaz de prevenir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ. Portanto, com base na avaliação do peso das evidências disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade, conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características mutagênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

1. INTRODUÇÃO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial mutagênico do ingrediente ativo CBZ, a partir do conjunto de evidências – *in vitro* e *in vivo* – relevantes disponíveis, quais sejam: estudos de mutagenicidade (mutações gênicas e aberrações cromossômicas), outros estudos de genotoxicidade, estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva. Foram também considerados relevantes os estudos realizados com o ingrediente ativo Benomil, cujo principal produto de degradação é o Carbendazim. Todos os estudos aqui discutidos foram obtidos do relatório apresentado pela FT, dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais e da revisão sistemática da literatura científica conduzida pela Coordenação de Reavaliação (CREAV).

Então, como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos que relatam toxicidade associada à exposição ao CBZ (Parecer nº 07/2021), a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE).

A análise do potencial mutagênico do CBZ foi efetuada com a utilização da abordagem de WoE, seguindo critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão, conforme será detalhado a seguir.

2. ANÁLISE

2.1 Estudos *in vitro*

2.1.1 Mutação pontual em bactérias

A FT avaliou 26 estudos de mutagenicidade em células procariotas com diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium* e um estudo que empregou também uma linhagem de *Escherichia coli* (Innvitro, 2020). Desse total, 24 estudos foram conduzidos para os produtos das empresas registrantes, todos eles negativos para mutação em procariotos. Ainda, a FT também incluiu em sua análise dois outros estudos regulatórios de mutagenicidade com base em relatórios de outras agências, ambos com CBZ de pureza elevada, os quais também apresentaram resultados negativos para mutagenicidade em diferentes linhagens de *S. typhimurium* e uma linhagem de *E. coli* (Ranzini et al., 2001; Ming et al., 2001 apud Innvitro, 2001). Esses estudos foram adequadamente analisados pela APVMA (2009) e por isso não foram descritos em detalhes neste parecer. Embora todos os resultados tenham sido negativos, destacou-se no relatório entregue que o CBZ possui duas impurezas consideradas relevantes

do ponto de vista toxicológico: 3-Amino-2-hydroxyphenazine (AHP) e 2,3-Diamino-phenazine (DAP), ambas com resultados positivo para mutagênese pelo teste de Ames.

Dos 24 estudos conduzidos para os produtos das empresas registrantes, considerou-se apenas seis como relevantes para a reavaliação toxicológica do CBZ, pois foram realizados com o produto técnico. As análises desses estudos foram incluídas no Quadro 1 (Vargas, 1995; Moura, 200; Miyaji, 2005; Miyaji, 2008; Miyaji, 2009; Miyaji, 2012). Ainda, foi analisado mais um estudo com produto técnico, protocolado pela empresa Bayer S.A., que não faz parte da FT (Stammler, 1992). Todos esses estudos foram negativos para mutação pontual.

Outras autoridades reguladoras internacionais também avaliaram uma grande quantidade de estudos de mutação pontual em bactérias. A agência australiana avaliou cinco estudos de Ames (Ranzini et al., 2001a, 2001b; Yang et al., 1997; Ming et al., 2001; Adams et al. 1996 apud APVMA, 2009) e considerou os resultados consistentemente negativos (APVMA, 2009). Já a USEPA (2014; 2020) verificou um estudo regulatório positivo e cinco estudos regulatórios negativos.

A EFSA (2009a), por sua vez, após um maior aprofundamento das análises com utilização de mais estudos, também concluiu que os resultados dos estudos regulatórios com CBZ puro foram consistentemente negativos (Gericke, 1977; Gericke, 1979; Reynolds, 1989; Stammler, 1992; Zdzienicka, 1983; Arce et al., 1983; Arce e Sarrif, 1983; Donovan e Irr, 198; Russel et al., 1983; Donovan et al., 1983; Gelbke e Engelhardt 1983; Gelbke e Engelhardt, 1984; Reynolds e Sarrif, 1993 apud EFSA, 2009a). Entretanto, a agência europeia verificou ensaios de Ames positivos para mutações de janela de leitura com *S. Typhimurium* (Donovan et al., 1983; Gelbke e Engelhardt, 1983; Gelbke e Engelhard, 1984; Jung e Weigand, 1983; Reynolds e Sarrif, 1993 apud EFSA, 2009a). Investigações subsequentes compararam diferentes bateladas de CBZ com diferentes concentrações de impurezas e indicaram que esses efeitos positivos, provavelmente, foram decorrentes das impurezas DAP e AHP. Diante disso, a EFSA (2009a) estabeleceu limites para essas impurezas com base nos resultados dos estudos de Ames, nos quais não se observou aumento de colônias revertentes para concentrações de 0,004 g/kg de AHP e de 0,0006 g/kg de DAP. Logo, para a DAP, foi estabelecido como aceitável o valor máximo de 0,6 ppm nos produtos técnicos. Para a AHP, embora os estudos de Ames não tenha sido positivo para concentrações acima de 0,004 g/kg, a EFSA optou por manter a proposição da FAO de 0,0005 g/kg como limite máximo para esta impureza.

A agência canadense também avaliou uma grande quantidade de ensaios de mutação reversa em bactérias, sendo mais da metade deles com resposta positiva (15 estudos), geralmente após ativação metabólica (PMRA, 2011). Entretanto, os estudos com o CBZ de elevado grau de pureza apresentaram resultados geralmente negativos (14 estudos). Isso também levou à PMRA (2011) a concluir que os resultados positivos para mutagenicidade nesses ensaios decorrem da presença de impurezas. Amostras de CBZ contendo aminofenazinas foram mutagênicas em 8 estudos. Adicionalmente, um metabólito de menor importância em ratos, 2-amino-benzimidazole (2-AB), também foi positivo em ensaio de Ames. Por outro lado, o CBZ puro (99,5%) e seu principal metabólito (5-OH Carbendazim) não apresentaram mutagenicidade. A partir da avaliação em conjunto de todos esses resultados, a PMRA (2011), assim como a EFSA, concluiu que há evidência de que os resultados positivos nos ensaios de Ames decorrem da presença de DAP e a AHP.

A partir das análises dos estudos protocolados pelas empresas registrantes, dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias

internacionais, conclui-se que o CBZ não provoca mutações pontuais em células bacterianas, exceto quando há a presença das impurezas toxicologicamente relevantes DAP e AHP. Embora os estudos positivos com essas impurezas não tenham sido entregues à Anvisa, as discussões internacionais a respeito de seus potenciais mutagênicos são consistentes. Portanto, com base nos estudos de Ames e nas avaliações internacionais, deve-se limitar a concentração dessas impurezas nos produtos registrados no Brasil a 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP).

Quadro 1. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ <i>in vitro</i> em células procariontas (teste de Ames).				
Referência (Patrocinador)	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Vargas, 1995 Adama	Pureza: 95% Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA1535. Delineamento: 1, 10, 100, 1000 e 5000 µg/placa, S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose-dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Miyaji, 2005 UPL	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	↑ sg revertentes apenas na dose de 0,1 mg/placa para TA97a, sem resposta dose-dependente ou aumento na RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Miyaji, 2008 Ourofino	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
Miyaji, 2009 UPL	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535. Delineamento: 0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
Miyaji, 2012 Nortox	Pureza: PT (%NI) Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535 Delineamento: 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3 ; 5 mg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada para algumas linhagens.	NEGATIVO
Stammberger, 1992 Bayer	Pureza: 97,7% Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538 e <i>E. coli</i> WP2uvrA. Delineamento: 4, 20, 100, 500, 2500, 5000 µg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	Não houve aumento sg nem dose dependente de revertentes ou alteração da RM.	Ausência de citotoxicidade na maior dose testada.	NEGATIVO
Moura, 2000 Sumimoto	Pureza: PT (%NI)	Não houve aumento sg nem dose dependente de	Ausência de citotoxicidade na maior	NEGATIVO

	Linhagem: S. <i>Typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535 e TA1538. Delineamento: 648, 1080, 3000, 5000 µg/placa; S9 ⁺ e S9 ⁻ .	revertentes ou alteração da RM.	dose testada para algumas linhagens.	
S9 ⁺ : com ativação metabólica; S9 ⁻ : sem ativação metabólica; RM: razão de mutagenicidade; sg: significativo; PT: produto técnico; NI: não informada.				

2.1.2 Mutação pontual em células de mamíferos

A FT apresentou apenas um estudo regulatório para mutação gênica em células de mamífero (células L5178Y), o qual foi considerado negativo (Adams, 1996). A APVMA (2009) também avaliou somente esse estudo em relação ao potencial de mutação gênica para células de mamíferos. No Quadro 2, há um detalhamento da análise desse estudo pela Anvisa. Adicionalmente, também foi incluída a análise de um artigo na literatura científica (Ermler et al., 2013), identificado na revisão sistemática.

Outros estudos regulatórios foram avaliados pelas demais agências internacionais. A USEPA (2020) verificou resultados positivos em dois estudos regulatórios de mutação gênica com linfócitos de camundongos e um negativo em células de ovário de hamster chinês. Já a PMRA (2011) concluiu que o CBZ foi negativo em três dos ensaios *in vitro* em células de mamíferos (dois deles utilizaram CBZ com alta pureza); e foi positivo em outros três estudos, dos quais um foi efetuado com CBZ de pureza desconhecida e outro foi conduzido em concentração extremamente tóxica.

A EFSA (2009a) considerou que os estudos *in vitro* para avaliação do potencial de indução de mutações pontuais em células de mamíferos foram consistentemente negativos em diferentes tipos celulares (McCooey et al., 1983, Cifone & Brusick, 1983; Adams & Sacammel, 1996 apud EFSA, 2009a). Somente em um estudo (McCooey et al., 1983 apud EFSA, 2009a) se verificou aumento estatisticamente significativo na frequência de mutações em células de linfoma de camundongos. Entretanto, a EFSA (2009a) contestou a sua relevância biológica, uma vez que ficou constatada alta citotoxicidade (redução do crescimento relativo a um valor $\leq 10\%$), além do grau de pureza questionável do CBZ utilizado. Por outro lado, numa amostra de CBZ com elevada pureza (< 5ppm e 3ppm de impurezas DAP e AHP, respectivamente) verificou-se resultado claramente negativo nesse mesmo tipo de ensaio (EFSA, 2009a).

A partir das análises dos estudos protocolados pelas empresas registrantes, dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias internacionais, conclui-se que o CBZ não induz mutações pontuais em células de mamíferos *in vitro*, exceto quando há a presença das impurezas toxicologicamente relevantes (DAP e AHP). Embora os estudos positivos com essas impurezas não tenham sido entregues à Anvisa, as discussões internacionais a respeito de seus potenciais mutagênicos são consistentes e, conforme abordado no item 2.1.1, deve-se limitar a concentração dessas impurezas nos produtos registrados no Brasil.

Quadro 2. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vitro* em células de mamíferos (mutação pontual).

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
------------	-----------	--------------------------	--	-----------

Adams, 1996	Pureza: 99,5%; Linhagem: células de linfoma murino (L5178Y); Delineamento: 1, 5, 10, 25, 50, 100 mg/mL (teste 1) e 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL (teste 2); S9 ⁺ e S9 ⁻ por 3 horas; 48 horas para expressão fenotípica (Ensaio HPRT).	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve aumento significativo na frequência de mutação. • Citotoxicidade celular excessiva a partir de 50 mg/mL. 	<ul style="list-style-type: none"> • 2x10⁵ células tratadas (RD OECD 476: 6x10⁶ células); • Eficiência de clonagem <65% no teste 1. Por isso, no teste 2, a dose máxima foi 50 mg/mL. 	NEGATIVO
S9 ⁺ : com ativação metabólica; S9 ⁻ : sem ativação metabólica; RD OECD: Recomendação da diretriz OECD.				

2.1.3 Aberração cromossômica em células de mamíferos

A FT incluiu em sua avaliação oito estudos *in vitro* de aberrações cromossômicas em células de mamíferos, provenientes da literatura científica, sendo 7 deles em células somáticas e somente um em células germinativas. Esses estudos foram detalhados no Quadro 3, com exceção de um estudo mecanístico (Can & Albertini, 1997) que foi incluído no item 2.4, Quadro 7. A FT concluiu que os estudos analisados foram negativos para clastogenicidade e positivos para aneugênese (indução de micronúcleos), sendo os efeitos positivos observados em doses $\geq 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ (limiar para atividade aneugênica *in vitro*). Houve divergência entre a análise da Anvisa e da FT para um estudo (Van Hummelen et al., 1995), considerado positivo pela FT e inconclusivo pela Anvisa, devido à grande quantidade de limitações.

As demais autoridades regulatórias internacionais avaliaram uma menor quantidade de estudos. Essa diferença decorreu principalmente do enfoque dado aos estudos regulatórios ou da ausência de inclusão de estudos mais recentes da literatura científica. A USEPA (2014), por exemplo, avaliou apenas um estudo *in vitro* com célula de ovário de hamster chinês, no qual o CBZ foi negativo para aberração. Já a CREAV realizou uma revisão sistemática, incluindo quatorze estudos científicos na análise (Quadro 3). Um desses estudos, Takeshita e colaboradores (2016), foi considerado não relevante para avaliação do peso da evidência sobre mutagenicidade, pois avaliou apenas edema nuclear após exposição ao CBZ.

A EFSA (2009a) avaliou três ensaios *in vitro* em células de mamíferos. O estudo de Bandhun (1985) com linfócitos humanos foi negativo para aberração cromossômica e para troca de cromátides-irmãs. Já o estudo de Kitching (1996b), embora também negativo para aberrações cromossômicas *in vitro* em linfócitos humanos, evidenciou um aumento na incidência de poliploidia nas células expostas ao CBZ. Ainda, segundo a EFSA, o estudo de Myhr e Galloway (1984) corroborou o resultado negativo *in vitro* para troca de cromátides-irmãs em células de ovário de hamster chinês (CHO), porém evidenciou tetraploidia. Diante desses resultados nos ensaios citogenéticos *in vitro* com células de mamíferos, a EFSA (2009a) concluiu que o CBZ não induziu aberrações cromossômicas estruturais e nem troca de cromátides irmãs. Entretanto, foram verificados cromossomos contraídos após exposição ao CBZ, efeito característico de inibidores do fuso mitótico. Logo, a agência europeia concluiu que esse IA causou arranjos desorganizados de cromossomos hipercontraídos, poliploidias e micronúcleos, como consequência da perturbação do fuso mitótico. Ou seja, ele apresentou atividade aneugênica *in vitro* em células de mamíferos (EFSA, 2009a).

A EFSA (2009a) discutiu ainda que, para agentes aneugênicos desse tipo, seria possível determinar um limiar para mutagenicidade. Assim, com base nos dados disponíveis e considerando a não-disjunção cromossômica como o efeito mais sensível, essa agência estimou

um limiar *in vitro* de 0,2 - 0,6 µg/mL para a atividade aneugênica do CBZ em linfócitos humanos (Elhajouji et al, 1997; Marshall, 1996).

A APVMA (2009) também avaliou ensaios *in vitro* em células de mamíferos. Dois estudos de Kitching e colaboradores (1996a, 1996b) – com culturas de CHL (células pulmonares de hamster chinês) e linfócitos humanos, respectivamente – apresentaram resultados negativos para atividade clastogênica e positivos para poliploidia (em todas as doses testadas). Outros quatro estudos em culturas de linfócitos humanos investigaram a atividade aneugênica associada ao CBZ (Marshall et al., 1996; Bentley et al., 2000; Elhajouji et al., 1995, 1997). A partir desses estudos, a agência australiana também considerou que o CBZ causa aneugênese nas concentrações ≥ 0,2 µg/mL (Elhajouji et al., 1995, 1997).

A PMRA (2011) concordou com essa avaliação e concluiu que o CBZ induziu aneuploidia, poliploidia e aumento de formação de micronúcleos em cultura de linfócitos humanos e de células de camundongos, após avaliação de nove ensaios *in vitro* com células de mamíferos, os quais foram predominantemente positivos para aneuploidia. A JMPR/ FAO (2005) avaliou quatro ensaios *in vitro* em células de mamíferos, referentes à indução de aneuploidia em linfócitos humanos (Marshall et al., 1996; Bentley et al., 2000; Elhajouji et al., 1995, 1997), e obteve a mesma conclusão quanto ao potencial aneugênico e limiar de dose *in vitro* para o CBZ.

A partir das análises dos estudos da literatura científica e dos estudos avaliados por autoridades regulatórias internacionais, conclui-se que o CBZ não provoca aberrações estruturais *in vitro* em células de mamíferos, mas induziu aberrações numéricas em concentrações ≥ 0,2 µg/mL (NOEL de 0,1 µg/mL). Portanto, o CBZ é considerado uma substância aneugênica.

Quadro 3. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vitro* em células de mamíferos (aberração cromossômica).

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Lamb et al., 1980	<p>Pureza: Não informada. Linhagem: Cultura de linfócitos humanos de sangue periférico; Delineamento: Teste de aberração cromossômica. Exposição das células ao CBZ (0,5 mg/mL), S9⁻, em 4h após adição do agente mitógeno, até amostragem, após 44h de incubação.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Observação de aberrações cromossômicas do tipo cromatídica, sem aumento significativo na frequência, em relação ao grupo controle. 	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de controle positivo; Apenas uma alta concentração testada; Ausência de análise de citotoxicidade; Somente uma condição experimental testada (não foram efetuadas as exposições de curto prazo (3-6 horas), S9⁺ e S9⁻ ; Análise de 100 metáfases (RD 	INCONCLUSIVO

			<p>OECD 473: ≥ 300);</p> <ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de análise cega: intensa condensação de cromossomos no grupo tratado. 	
Banduhn et al., 1985	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico; Delineamento: Exposição das células ao CBZ, S9⁺ e S9⁻. 1) análise de aberrações cromossômicas (10^{-7}; 10^{-6}; 10^{-5}; $2,5 \times 10^{-5}$; 5×10^{-5}; $7,5 \times 10^{-5}$; 10^{-4} M); 2) teste de MN sem citoB, com coloração para heterocromatina centromérica (5×10^{-7}; 10^{-6}; 5×10^{-6}; 10^{-5}; 5×10^{-5} M).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência aberrações estruturais S9⁺ e S9⁻; • Indução de C-mitose (metáfase com morfologia idêntica à induzida pelo controle positivo – colcemid), poliploidia e MN (presença de centrômero –aneugênese em concentrações $\geq 1 \times 10^{-6}$ M); • Indução de danos de longa duração ao fuso, resultando em elevada frequência de poliploidias nas mitoses subsequentes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de informações sobre os doadores da amostra de sangue; • Aberração estrutural e numérica (2n, 4n e 8n) avaliadas em 100 e 200 metáfases, respectivamente (RD OECD 473: ≥ 300); • Análise de MN em 1000 células (RD OECD 487: ≥ 2000); • No teste de aberração cromossômica, não foi efetuada S9⁻; • No teste de MN, o período de exposição não foi informado; • Avaliação da citotoxicidade pelo IM. 	<p>POSITIVO Aneugênese ($\geq 0,2 \mu\text{g/ml}$ NOEL=$0,1 \mu\text{g/ml}$)</p>
Van Hummelen et al., 1995a	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico e cultura de sangue total; Delineamento: Teste de MN com FISH: Exposição das células ao CBZ, S9⁻, em 24h pós-estimulação, até o término da incubação (72h); adição de citocalasina B 44h pós-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • \uparrowsg dose-dependente na frequência de linfócitos binucleados com MN: em linfócitos isolados (10 e $15 \mu\text{M}$); e no sangue total ($5-20 \mu\text{M}$); • \uparrow frequência de MN com centrômero: 	<ul style="list-style-type: none"> • RD OECD 487: início da exposição em 44-48h pós-estimulação; • Análise de 1000 linfócitos binucleados (RD OECD 487: ≥ 2000 células, mas o estudo já obteve resultado sg com 1000); 	<p>POSITIVO Aneugênese ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$)</p>

	<p>estimulação. I) para linfócitos isolados: 10, 15 e 20µM; II) para sangue total: 5, 10, 15, 20 e 25µM.</p>	<p>79% (5µM) e 89% (10µM),</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indica efeito aneugênico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação da citotoxicidade pelo IR; • Na cultura de linfócitos isolados (20µM), baixo rendimento de linfócitos binucleados, impossibilitando a análise de MN; • Ausência de controle positivo. 	
<p>Van Hummelen et al., 1995b</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico; Delineamento: Teste de MN. Exposição das células a raios γ (agente clastogênico) e ao CBZ (2µg/ml), S9⁻, em 24h pós-estimulação, até o término da incubação (72h). Dois protocolos: (I) Cultura sem citoB: separação das frações celulares em G1 e G2 (citometria de fluxo); II) Cultura com citoB (44h pós-estimulação). Para ambos: análise de imagem quanto ao conteúdo e área do DNA (macro e micronúcleos).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para os dois protocolos: conteúdo de DNA dos MN nas células G2 foram 2x maior do que G1. • MN em células G1 com ↑sg no conteúdo de DNA, área absoluta e relativa à célula total (P<0,0001), comparado à indução por raios γ (em cultura com citoB); • ↑sg no conteúdo de DNA entre macronúcleos de linfócitos tratados com CBZ com (P <0,0001) ou sem (P = 0,03) MN, em comparação ao controle. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo; • RD OECD 487: início da exposição em 44-48h pós-estimulação; • Número total de células analisadas inferior ao RD OECD 487 (2000 células binucleadas); • Não foi relatada comparação entre n° MN nas células expostas e controle; • Não foi relatada avaliação da citotoxicidade; • Utilização de somente uma concentração de CBZ. 	<p>INCONCLUSIVO</p>
<p>Kithcching et al., 1996a¹ apud APVMA (2009)</p>	<p>Pureza: 99,5%. Linhagem: CHL. Delineamento: Teste de MN, S9⁺ e S9⁻ (0,78-100µg/ml).</p>	<p>Indução de poliploidia em todas as doses testadas, mas sem efeito clastogênico.</p>	<p>-</p>	<p>POSITIVO Aneugênese (≥0,78µg/ml)</p>
<p>Kithcching et al., 1996b¹ apud</p>	<p>Pureza: 99,5%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos.</p>	<p>Indução de poliploidia, em todas as doses</p>	<p>-</p>	<p>POSITIVO Aneugênese (≥0,78µg/ml)</p>

APVMA (2009) e EFSA (2009a)	Delineamento: Teste de MN, S9 ⁺ e S9 ⁻ (0,78-100µg/ml).	testadas, mas sem efeito clastogênico.		
Elhajouji et al., 1995, 1997 ¹ apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005) ¹	Pureza: 99,5%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição ao CBZ (0-2 µg/ml), S9 ⁺ e S9 ⁻ . I) Análise de não-disjunção em linfócitos binucleados bloqueados em citocinese (sondas centroméricas para cromossomos 1 e 17). II) Análise de perda cromossômica pela identificação de MN com centrômeros (sonda pan-centromérica).	<ul style="list-style-type: none"> • 1ª concentração na qual ocorreu um ↑sg foi superior para a perda cromossômica, quando comparada à não-disjunção; • Indução de aneuploidia em concentrações ≥0,2 µg/ml. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limiar modelado. 	POSITIVO Aneugênese (≥0,2 µg/ml NOEL = 0,1µg/ml)
Marshall et al., 1996 apud ¹ APVMA (2009); JMPR/FAO (2005); EFSA	Pureza: 99,7%. Linhagem: Culturas de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição de linfócitos humanos ao CBZ (0-5 µg/ml), S9 ⁺ e S9 ⁻ . Análise de linfócitos humanos binucleados com bloqueio da citocinese, com uso de FISH e marcação de centrômeros/cinetócoros.	<ul style="list-style-type: none"> • Desfecho de não-disjunção ocorreu com maior frequência e, geralmente, em concentrações inferiores àquelas associadas à perda e ao ganho cromossômico, sendo o evento aneugênico mais sensível para a determinação de limiar. • Formato quase idêntico das dose-resposta para os seis cromossomos para os diferentes desfechos investigados; • Limiares para não-disjunção: 600 ng/ml – cromossomos 17 e X; 700 ng/ml – cromossomo 1; 	<ul style="list-style-type: none"> • Lâminas hibridizadas com sondas de DNA centroméricas específicas para seis cromossomos humanos: 1 e 8 (trissomias associadas a vários tipos de tumor), 11 (associado ao tumor de Wilm), 17 (associado ao gene p53 e predisposição ao câncer de mama) e X e 18 (frequentemente e associados a aneuploidias). • Análise de 1000 células, em duplicata, com classificação das anormalidades numéricas em: perda ou ganho cromossômico, não-disjunção ou poliploidia. 	POSITIVO Aneugênese (≥0,6 µg/ml NOEL = 0,5 µg/ml)

		e 800 ng/ml – cromossomos 8, 11 e 18.		
Vigreux et al., 1998	<p>Pureza: >99%</p> <p>Linhagem: CHO-K1.</p> <p>Delineamento: Aberração cromossômica (estrutural e numérica). Exposição de células CHO ao CBZ (0, 25, 50 e 100 µM) por 4h, com posterior incubação por 18h até a amostragem. Uso de controle positivo (Etoposida) e negativo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de aberrações estruturais (cromossomos/ cromátides); Presença de poliploidias: ↑sg em todas as doses testadas, com ausência de citotoxicidade. 	<ul style="list-style-type: none"> Análise de 100 metáfases (RD OECD 473: ≥300), mas pode ser reduzido pelo grande nº de células com aberração; Aberrações estruturais: tipo cromossômica e cromatídica (quebras e trocas). Autores relatam aberrações numéricas (poliploidia); Citotoxicidade avaliada pelo método XTT, em 2d pós-tratamento (RD OECD 473 cita métodos RPD e RICC); Citotoxicidade < 50% na maior dose; Dose mais alta de 250 µM, por insolubilidade em DMSO. 	POSITIVO Aneugênese (≥5 µg/ml)
Elhajouji et al., 1998	<p>Pureza: Alta (%NI)</p> <p>Linhagem: Cultura de linfócitos humanos de sangue periférico;</p> <p>Delineamento: Ensaio de MN. Exposição das células ao CBZ (0,03-2,0 µg/ml), S9⁻, 24h após a estimulação mitógena (PHA), com duração de 48h; adição de cito B em 44h e amostragem em 72h de incubação.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↑ dose-dependente na frequência de MN em células mononucleadas, com ↑sg nas maiores concentrações; Maior frequência de MN em células binucleadas (dados de Elhajouji et al., 1995), do que em mononucleadas: MN encontrados 	<ul style="list-style-type: none"> Estudo não relata método para avaliação da citotoxicidade; Ausência de comparação com o controle negativo; Ensaio em duplicata e análise de 1000 linfócitos mononucleados; Autores discutiram que o ↑MN em mononucleados 	INCONCLUSIVO

		<p>nos mononucleados contêm essencialmente cromossomos perdidos, ao invés de fragmentos acêntricos característicos de clastogenicidad e;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Não-disjunção é o desfecho mais sensível para aneuploidia induzida por CBZ. 	<p>ocorre mais tardiamente, em comparação aos binucleados. Logo, esse desfecho não pode ser usado como marcador precoce. Entretanto, a análise de simultânea permite discriminar MN recém-formados (em binucleados) daqueles persistentes a efeitos iniciais dos compostos (em mononucleados).</p>	
<p>Bentley et al., 2000¹ apud APVM A (2009); JMPR/FAO (2005)</p>	<p>Pureza: Benomil (95%) e CBZ (97%). Linhagem: Cultura de linfócitos humanos. Delineamento: Teste de MN. Exposição de linfócitos humanos ao Benomil e ao CBZ (0-500 µM), S9. Análise de linfócitos humanos binucleados com bloqueio da citocinese, com uso de FISH e marcação de centrômeros/cinetócoros. Investigação de 6 cromossomos humanos (pares 1 e 8; 11 e 18; X e 17).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não disjunção foi o desfecho mais sensível para detecção de aneuploidia, com limiares de dose consistentes entre os seis cromossomos analisados; • Indução de aneuploidia (inibição do fuso mitótico) por ambos os compostos testados, com dose-resposta e faixa de limiar de dose quase equimolar: 3,2 – 4,3 e 3,8 – 4,1µM para CBZ e Benomil, respectivamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Em meio aquoso, a meia-vida do Benomil foi relatada como sendo ~2h. Portanto, presumiu-se que, nas condições do estudo, o Benomil se dissociou em CBZ e n-butylisocianato; • Anormalidades classificadas como perda ou ganho de cromossomo, não disjunção ou poliploidia. 	<p>POSITIVO Aneugênese (≥0,6 µg/ml NOEL= 0,5 µg/ml)</p>
<p>De Stoppelaar et al., 2000.</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Fibroblastos da pele de ratos wistar ♂;</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de clastogênese; • ↑sg aneuploidia, 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo; • GPA usado no ensaio de MN: 	<p>POSITIVO (≥ 2,5 mg/ml)</p>

	<p>Delineamento: Teste de MN <i>in vitro</i> com GPA: após 72h da indução da bolsa de granuloma (n=10) – coleta de fibroblastos, exposição ao CBZ, incubação na presença (CBZ 0; 0,5; 1; 2,5; 5 µg/ml) e ausência de citoB (CBZ 0; 1; 2,5; 5; 10; 20 µg/ml). Preparo das lâminas e análise por FISH (sonda centromérica geral e combinações de sondas para cromossomos específicos (19p + 19q, 4q + Yq) – verificação de não disjunção, poliploidia, perda cromossômica.</p>	<p>sendo não-disjunção o erro prevalente;</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑sg e dose-dependente na frequência MN em células binucleadas (≥ 2,5 mg/mL); • ↑sg perda cromossômica (1 e 2,5 µg/ml) e ↑ não-disjunção (2,5 µg/ml), em células binucleadas; • ↓sg poliploidia no ensaio com citob e ↑sg dose-dependente no ensaio sem cito b (≥2,5 µg/ml - para células mono e binucleadas), indicando que citob interfere na indução de poliploidia pelo CBZ. 	<p>injeção subcutânea de ar estéril nas costas dos ratos, com formação de bolsa na qual ocorre proliferação transitória de fibroblastos; injeção de CBZ na bolsa; coleta de fibroblastos e avaliação de aneuploidia;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Análise de 1000 células binucleadas (ensaios <i>in vitro</i>); • Foi observado ↑MN e toxicidade (↓% células binucleadas) em 5µg/ml. Por isso, efetuou-se avaliação apenas na faixa de dose 0-2,5 µg/ml. 	
<p>Ermler et al., 2013</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: CHO-K1. Delineamento: Teste de MN. Benzimidazóis (inclusive CBZ) testados individualmente e em mistura para avaliar efeito aditivo. Testadas 8 concentrações de cada IA, com bloqueio de citocinese. Contagem de MN automatizada. Citotoxicidade avaliada por ensaio de MTT.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ dose-dependente de MN para CBZ e outros IA, com limiar. Mistura com efeito aditivo (proporcional à concentração); • Limiar modelado CBZ: $1,81 \times 10^{-6} M$ (IC: $1,4 - 2,34 \times 10^{-6} M$). 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo; • N° de células contabilizadas >1000 (RD OECD: ≥ 2000); • Sistema automatizado subestimou a contagem de MN (avaliação conservadora para reduzir contagem de falsos-positivos); • Doses não claramente relatadas; 	<p>POSITIVO (NOEL=0,27 µg/ml)</p>
<p>S9⁺: com ativação metabólica; S9⁻: sem ativação metabólica; CBZ: Carbendazim; MN: micronúcleo; CHO: células de ovário de hamster chinês; CHL: células de pulmão de hamster chinês; sg: significativo; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD; NOEL: Nível sem Efeito Observável (<i>No Observed Effect Level</i>); IR: Índice de replicação; citoB:</p>				

citocalasina b; IM: Índice mitótico; PHA: fito-hemaglutinina; RICC: Aumento relativo na contagem de células; FISH: hibridação fluorescente *in situ*; GPA: Ensaio de bolsa de granuloma (*granuloma pouch assay*); MTT: ensaio de redução de tetrazolium; NI: não informada.

¹ As abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa, sem haver necessidade de avaliação direta do estudo original.

2.2 Estudos *in vivo*

2.2.1 Mutação pontual em células somáticas de mamíferos

Foram identificados apenas três estudos regulatórios de mutação pontual *in vivo* em células somáticas no relatório da EFSA (2009a) e PMRA (2011). Nesses estudos, o CBZ não induziu recombinação somática, mutações pontuais, quebra ou perda de cromossomos em *Drosophila melanogaster* (Mollet, 1976; Lamb e Lilly, 1980 apud EFSA, 2009a e PMRA, 2011). A EFSA concluiu ainda que a esterilidade observada nas ninhadas é compatível com o efeito do CBZ de inibição dos fusos mitóticos. Em um ensaio de mancha em camundongo (Fahring & Seiler, 1978 apud EFSA, 2009a), observou-se fraca atividade mutagênica. Porém, devido à ausência de reprodutibilidade desse efeito e à incerteza quanto à pureza da amostra, a EFSA (2009a) considerou duvidosa a relevância biológica dessa evidência.

Embora os estudos disponíveis *in vivo* para mutação pontual não sejam tão adequados, por não terem sido realizados em mamíferos ou pela quantidade de limitações, não há qualquer evidência de que o CBZ seja capaz de induzir mutações gênicas, o que é corroborado pelos resultados consistentemente negativos *in vitro*, tanto nos ensaios de Ames quanto em células de mamíferos (itens 2.1 e 2.2).

2.2.2 Aberração cromossômica em células somáticas de mamíferos

A FT avaliou 31 estudos *in vivo* em roedores que investigaram o potencial de dano cromossômico do CBZ em células somáticas, por meio do ensaio de MN. Entretanto, foram incluídos estudos conduzidos com produtos formulados, os quais não são objeto desta reavaliação e, por isso, não foram abordados nesse parecer. Ainda, a FT adicionou 9 estudos da literatura científica e concluiu que 5 deles evidenciaram a indução de MN após exposição oral ao CBZ, indicando como LOAEL o valor de 62,5 mg/kg p.c..

No Quadro 4, foram detalhados os estudos relevantes mencionados pela FT (conduzidos com produtos técnicos), como também aqueles selecionados na busca sistemática realizada pela CREAV. Houve divergência na análise de alguns estudos (Costa, 2001; Costa, 2009; Bastelli, 2012), considerados negativos pela FT, porém classificados como inconclusivos pela CREAV, devido às limitações encontradas. Vale ressaltar que foi verificado nesses estudos um aumento na frequência de MN, o qual, embora não significativo pela análise estatística empregada no próprio estudo, ocorreu acima do controle histórico, foi duas vezes superior ao controle concorrente ou compatível com os valores observados no estudo regulatório positivo de Bentley (1992). Os estudos regulatórios mencionados pela FT (Meyer et al., 1980, Muller, 1990; Ashby & Tinwell, 2001; Yu, 1997) não foram analisados pela CREAV, pois não fazem parte dos documentos das empresas registrantes no Brasil. Porém, foram incluídos nas análises das demais autoridades internacionais discutidas neste parecer. As abordagens utilizadas pelas

principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa.

Após a análise de todos os estudos do Quadro 4, bem como dos relatórios das agências internacionais, resta claro que o CBZ induz aberrações cromossômicas *in vivo* (micronúcleo) em mamíferos. Vários estudos investigaram a indução de MN, após administração oral de CBZ, que é a via mais relevante para humanos, utilizando diferentes tipos celulares. Observou-se consistentemente aumento na frequência de MN em eritrócitos do sangue periférico (200 mg/kg p.c.), além de células epiteliais (500 mg/kg p.c.), hepáticas (62,5 mg/kg p.c.) e duodenais (500 mg/kg p.c.). Os estudos de Bentley et al. (1992) e Sarrif et al. (1994) – conduzidos com CBZ e Benomil, respectivamente – mostram ainda que esse aumento na frequência de MN decorre, predominantemente, da indução de aneuploidia e não de aberrações cromossômicas estruturais.

Com uma análise semelhante, mas avaliando outros estudos regulatórios, a APVMA (2009), a JMPR/ FAO (2005) e a EFSA (2009a) concluíram que houve indução de MN em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos e ratos expostos a doses superiores a 50 mg/kg p.c. pela via oral (Mayer & Kramer, 1980; Mayer et al., 1980; Seiler, 1976; Seiler, 1980; Bentley, 1992 apud EFSA, 2009a; Ashby & Tinwell, 2001 apud APVMA, 2009). Ainda, um estudo de MN em células epiteliais do cólon de camundongos (Vanhouwaert et al., 2001), com dose única via oral (gavagem), também constatou a formação de MN, em doses \geq 500 mg/kg p.c.. Por outro lado, três estudos de MN na medula óssea de camundongo, após dose única via gavagem, apresentaram resultados negativos (Yu, 1997a, 1997b; Mueller, 1990 apud APVMA, 2009 e FAO, 2005). O estudo de Muller (1990) foi considerado inadequado pela EFSA (2009a) devido às suas limitações. Ainda, os estudos de Bentley et al. (1992), Sarrif et al. (1994) e Ashby & Tinwell (2001) confirmaram a indução de aneuploidia nas células somáticas de roedores (APVMA, 2009; JMPR/ FAO, 2005; EFSA, 2009a).

Adicionalmente, a EFSA (2009a) concluiu que esses resultados *in vivo* foram consistentes com aqueles obtidos *in vitro*, nos quais também foram observados MN, poliploidia e aneuploidia, o que confere maior força ao peso da evidência sobre o potencial do CBZ de causar aberrações cromossômicas numéricas.

Segundo a EFSA (2009a), os dados experimentais *in vivo* indicaram uma dose oral bem superior àquela obtida *in vitro* para se atingir concentrações teciduais ou sanguíneas efetivas, já que uma única exposição oral de 50 mg/kg p.c. não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados na medula óssea. Na discussão da USEPA (2014; 2020), há um alinhamento quanto à indução de MN em doses superiores a 100 mg/kg p.c. (ausência de efeitos na dose de 50 mg/kg p.c. em estudo de MN na medula óssea de mamífero), como também ao fato de que esses efeitos decorrem de aneuploidia. Similarmente, a PMRA (2011) considerou o CBZ como um agente aneugênico, com base em evidências obtidas em sete estudos de MN *in vivo*. Por outro lado, o seu potencial clastogênico foi excluído a partir dos resultados negativos obtidos nos oito estudos *in vivo* avaliados.

A partir da análise dos estudos regulatórios, da literatura científica e das discussões feitas pelas autoridades regulatórias internacionais, verifica-se que há evidência suficiente de que o CBZ é um agente aneugênico, capaz de induzir aberrações cromossômicas numéricas não apenas *in vitro*, em células de mamíferos, mas também *in vivo* em mamíferos, em doses superiores a 50 mg/kg p.c. nos protocolos experimentais utilizados.

Quadro 4. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vivo* em células somáticas de mamíferos (aberração cromossômica).

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Bentley, 1992 (Bayer)	<p>Pureza: PT (%NI)</p> <p>Linhagem: camundongos B6D2F1/Cr-1BR;</p> <p>Delineamento: Administração vo (66, 1646 e 3293 mg/kg p.c.); n = 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 48h após última dose (coleta de células da medula óssea). Teste de MN com imunofluorescência para cinetocoro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg e dose-dependente de MN e de MN com cinetócoros em 1646 e 3293 mg/kg em fêmeas e em 3293 mg/kg em machos. • Indução de MN predominantemente com cinetócoro, indicando presença de cromossomos intactos - indução de aneuploidia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior dose: toxicidade à medula óssea (redução da proporção de PCE/ 1000 eritrócitos); • Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Dados do controle concorrente dentro do controle histórico; 	<p>POSITIVO Aneugênese (LOAEL = 1646 mg/kg p.c.)</p>
Barale et al., 1993	<p>Pureza: Benomil 99% e CBZ 95%;</p> <p>Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i>;</p> <p>Delineamento: Administração vo (1000 mg/kg p.c.); n = 4 ou mais animais/grupo. Amostragem em 6 – 48h pós-tratamento (coleta de células da medula óssea). Teste de MN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg MN, aneuploidia, hiperdiploidia e poliploidia, principalmente em 30, 38 e 40h. • Indução menos evidente de quebras cromossômicas e lacunas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo; • Dose única; • 3000 PCE contabilizados (RD OECD 474: 4000); • Nº animais abaixo do RD OECD 474 (5). 	<p>POSITIVO Micronúcleo (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)</p>
Sarrif et al., 1994 ¹ Apud JMPR/FAO (2005)	<p>Pureza: Benomil 99,3%.</p> <p>Linhagem: Camundongos B6D2F1/Cr-1BR ♂ e ♀;</p> <p>Delineamento: Teste de MN. Administração em dose única (gavagem; 66, 1646 ou 3293 mg/kg p.c.). Eutanásia após 48h; análise de MN em PCE da medula óssea, com marcação de anticorpos imunofluorescentes anti-cinetocoro.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg com dose-resposta de MN-PCE totais e MN-PCE com cinetócoro, em fêmeas (1646 e 3293 mg/kg p.c.) e em machos (3293 mg/kg p.c.); • MNPCE c/ cinetócoro >80%; • ↑sg MN-PCE s/ cinetócoro em fêmeas (3293 mg / kg p.c.) não considerado evidência de clastogenicidade (↑similar ao controle positivo aneugênico); 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciclofosfamida e sulfato de vincristina usados como controles clastogênicos e aneugênicos positivos, respectivamente; • Seleção de doses: estudo preliminar com toxicidade da medula óssea (↓PCE/1000 eritrócitos nos maiores níveis de dose); 	<p>POSITIVO Aneugênese (LOAEL=1646 mg/kg p.c.)</p>

		<ul style="list-style-type: none"> • ↓sg proporção de PCE/1000 eritrócitos em fêmeas (1646 e 3293 mg/kg p.c.). 		
Vargas, 1995 (Adama)	<p>Pureza: PT (95%);</p> <p>Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂;</p> <p>Delineamento: Teste de MN. Administração ip (390, 780 e 1170 mg/kg p.c.); 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem ↑sg de MN nas doses testadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior dose: 75% da dose letal; • Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Sem dados de controle histórico. 	INCONCLUSIVO
Costa, 2001 (UPL)	<p>Pureza: PT (98%).</p> <p>Linhagem: camundongos Swiss ♀ e ♂.</p> <p>Delineamento: Administração ip (1000, 2000 e 3000 mg/kg p.c.); 2 aplicações com intervalo de 24h; 5♀ e 5♂/grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da MO). Teste de MN.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem ↑sg de MN. • Porém, ↑ aparentemente dose-dependente e maior do que o dobro do controle negativo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior dose: 75% da dose letal; • Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Sem dados de controle histórico; • Não foi feito teste de tendência. 	INCONCLUSIVO
Vanhauwaert et al., 2001 ¹ Apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005)	<p>Pureza: 97%.</p> <p>Linhagem: Camundongos Swiss.</p> <p>Delineamento: Administração em dose única (vo; 500 ou 1000 mg/kg p.c.). Eutanásia em 24 ou 48h. Análise de MN em amostras de células epiteliais intestinais e de medula óssea.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg MN em ambas as doses e intervalos de amostragem (em células epiteliais), sem efeito dose-dependente; • Apesar de o estudo ter relatado ausência de ↑sg MN na MO, os dados apresentados mostram ↑ de 5x e 3x de MN em PCE, em 24h, nas doses de 500 e 1000 mg/kg p.c., respectivamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de 1000 células epiteliais intestinais. Tipo de célula não previsto na RD OECD 474. 	POSITIVO Micronúcleo em células epiteliais (LOAEL=500 mg/kg p.c.)
Igarashi et al., 2007	<p>Pureza: Alta;</p> <p>Linhagem: Camundongos ddY ♂;</p> <p>Delineamento: Teste de MN. Administração única vo (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) 1 dia antes ou</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Efeitos sg somente com administração após HP; • ↑sg MN (todas as doses); ↑sg células binuclead 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo; • Grupos de 3-5 machos (RD OECD 474: 5); 	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 125 mg/kg p.c.)

	<p>depois de HP, com amostragem de hepatócitos no dia 6. Avaliação da incidência de hepatócitos micronucleados, número de núcleos, índice de proliferação hepatócitos (HPI) e pesos relativos do fígado.</p>	<p>as (1000 mg/kg) e multinucleadas (250, 500 e 100 mg/kg); ↑ HPI;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Indução de fragmentação nuclear (apoptose) nas doses de 250 (0,3%), 500 (11,8%) e 1000 mg/kg (0,7%). 	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação de 2000 hepatócitos intactos (tipo de célula não previsto na RD OECD 474); • Cálculo do HPI pela mesma fórmula do Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocinese; 	
Costa, 2008 (Ourofino)	<p>Pureza: PT (98%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂. Delineamento: Teste de MN. Administração ip (125, 250 e 500 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem ↑sg de MN nas doses testadas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Dados dentro do controle histórico. 	NEGATIVO
Costa, 2009 (UPL)	<p>Pureza: PT (>98%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração ip (2000 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24 horas; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem ↑sg de MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo, acima do controle histórico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); • Uma única dose testada. 	INCONCLUSIVO
Coffing et al., 2011	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos <i>Sprague Dawley</i>; Delineamento: Modificação do protocolo de MN para avaliação da mutagenicidade em células do cólon e duodeno de ratos. Administração diária (2 dias – 500, 1000 e 2000 mg/kg; vo e ip, n=4). Coleta de células da medula óssea, duodeno e cólon.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg PCE no ensaio com células da medula óssea, indicando ocorrência de toxicidade, com ↑sg MN na maior dose; • No cólon, não houve alteração sg em nenhuma dose. No duodeno, observou-se ↑sg MN em todas as doses. 	<ul style="list-style-type: none"> • Nº animais abaixo do recomendad o pela RD OECD 474 (5); • Protocolo proposto mostrou que uso de células do TGI pode ser uma alternativa para a avaliação de MN. 	<p>POSITIVO Micronúcleo; eritrócitos (ip - LOAEL=2000 mg/kg p.c.)</p> <p>TGI (vo - LOAEL=500 mg/kg p.c.)</p>

		<ul style="list-style-type: none"> Diferenças na formação de MN nos diferentes tecidos. 		
Bowen et al., 2011	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ Han-Wistar; Delineamento: Ensaio de MN em eritrócitos de medula óssea e reticulócitos. Administração repetida vo (gavagem – 1000, 1500 e 2000 mg/kg p.c.) em 0, 24h e 45h. Amostragem: I) Grupo principal (n = 6): coleta em 24h após 2ª dose (T₄₈); II) Grupo satélite (n = 5): coletas em 24h (T₆₉) e 44h (T₈₉) após 3ª dose.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou ↓ ganho de peso; 1500 e 2000 mg/kg p.c.: citotoxicidade na medula óssea (↓sg PCE) e sangue periférico (↓sg reticulócitos); ↑sg e dose-dependente MN em reticulócitos (2x maior que controle, acima do intervalo de confiança de 95% do controle histórico); ↑sg MN-PCE, nas 3 doses testadas. 	<ul style="list-style-type: none"> Maior dose: DMT; Ausência de controle positivo; Registro diário de peso corporal e sinais clínicos; Citometria de fluxo para separação de reticulócitos no sangue periférico; Análise de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000) e de MN em reticulócitos em 20000 reticulócitos/amostra. 	POSITIVO Micronúcleo em eritrócitos de MO e reticulócitos (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)
Bastelli, 2012 (Nortox)	<p>Pureza: PT (99%); Linhagem: Camundongos Swiss ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN. Administração ip (2000 mg/kg p.c.), 2 aplicações com intervalo de 24h; 5♀ e 5♂/ grupo. Amostragem em 24h após última dose (coleta de células da medula óssea).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sem ↑sg MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo para machos, acima do controle histórico. 	<ul style="list-style-type: none"> Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000); Uma única dose testada. 	INCONCLUSIVO
Itoh et al., 2012a	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos F344/DuCrjCrlj ♀ e ♂; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração única vo (gavagem – 62,5 e 125 mg/kg; n = 4) logo após hepatectomia parcial (D₁), com eutanásia e coleta de hepatócitos no D₄; análise de HMN por microscopia de fluorescência. Controle positivo: colchicina.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↑sg dose-dependente HMN (nas duas doses), com maior incidência em ♂ que em ♀; Sem alteração no peso relativo do fígado, na frequência de células mono e multinucleadas, bem como de células em metáfase e com 	<ul style="list-style-type: none"> 2 níveis de dose utilizados ao invés de 3; Análise de 2000 hepatócitos; Registro do nº células metafásicas e com fragmentos nucleares. 	POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5mg/kg)

		<p>fragmentos nucleares;</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↑ células binucleadas, nos dois níveis de dose, apenas em machos. 		
Itoh et al., 2012b	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ F344; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração vo (gavagem – 62,5; 125; 250 mg/kg, n = 4) no dia anterior ou posterior à HP, com eutanásia e coleta de hepatócitos no D₄.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ não induziu MN quando administrado antes da HP, mas houve ↑sg MN na menor dose para exposição após HP. (resultado semelhante à Colchicina). • Demonstrou-se que, em ratos, assim como camundongos (estudo prévio), é necessária a dosagem após HP para detecção de MN. 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo para validação do ensaio.; • Pequeno grupo amostral (4 animais/grupo). 	<p>POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5 mg/kg)</p>
Itoh et al., 2015a	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos ♂ F344; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos. Administração vo (gavagem - 0; 62,5; 125; 250 mg/kg; n = 4, 5, 5, 4 animais, respectivamente) nos dias anterior e posterior à HP, com eutanásia e coleta de hepatócitos em 3 dias após a 2ª dose, ou seja, no D₄. Grupo controle positivo: colchicina (0; 0,5; 1; 2 mg/kg; n = 5). 1ª dose no D₁, com HP no D₂; 2ª dose no D₃; remoção do fígado em regeneração no D₆.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ e Colchicina: ↑ sg e dose-dependente de MN nos hepatócitos, a partir da menor dose testada, sem ↑ no peso relativo do fígado; • Incidência de células binucleadas em 125 e 250 mg/kg CBZ foi maior do que no controle, sugerindo a inibição da regeneração hepática; • Ocorreu incidência relativamente alta de células em metáfase, células multinucleadas e fragmentos nucleares na maior dose de CBZ, respostas típicas de 	<ul style="list-style-type: none"> • 2000 hepatócitos analisados; • Anteriormente, mostraram que, no ensaio de MN em hepatócitos, as substâncias clastogênicas precisam ser administradas antes da HP e as aneugênicas após a HP; • Nesse estudo, foi demonstrado que substâncias clastogênicas e aneugênicas podem ser avaliadas num mesmo ensaio e com o mesmo regime de dose; 	<p>POSITIVO Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5 mg/kg p.c.)</p>

		<p>indutores de aberrações cromossômicas numéricas;</p> <ul style="list-style-type: none"> • A exposição anteriormente e posteriormente à hepatectomia produz resultados semelhantes a quando o composto é administrado antes ou depois da hepatectomia (Itoh et al., 2012b). 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral (CBZ teve perda de animal no controle, por erro na HP; e de dados de um animal na menor dose, por falha na perfusão); • CBZ usado como modelo. 	
Itoh et al., 2015b	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos F344/DuCrjCrlj ♂; Delineamento: Teste de MN em hepatócitos (n = 4), adaptado de estudo prévio (Itoh et al., 2012), com objetivo de avaliar o impacto da administração concomitante de CBZ com analgésico buprenorfina. Administração única de CBZ vo (gavagem - 125 mg/kg) pós- HP (D₁); administração concomitante de buprenorfina (15 e 30 µg/kg; 2x dia por 2d pós-HP). Eutanásia e coleta de hepatócitos no D₄; análise de HMN por microscopia de fluorescência.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alteração significativa no peso corporal; • Administração concomitante de CBZ e buprenorfina (duas doses testadas) induziu ↑sg na frequência de HMN, em comparação ao tratamento com CBZ isoladamente; bem como induziu ↑ na toxicidade geral; • Conclusão do estudo: Administração de buprenorfina (destinada à redução da dor provocada pela HP) é contraindicada para esse tipo de ensaio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Somente um nível de dose utilizado; • Contagem de 2000 hepatócitos; • A conclusão como positivo se refere ao resultado já descrito no estudo prévio (Itoh et al., 2012): ↑sg frequência de HMN na dose de 125 mg/kg em comparação ao veículo), uma vez que não foram relatados, no presente estudo, análises estatísticas referentes à exposição somente ao CBZ. 	NÃO RELEVANTE
Hashem et al., 2017	<p>Pureza: 98%. Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♀. Delineamento: Administração vo (gavagem – 200 mg/kg p.c., n=8) por 2 semanas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg MN, fragmentação de DNA e aberração cromossômica (d eleção, quebras, lacunas, associação, fragmentação, 	<ul style="list-style-type: none"> • Somente um nível de dose utilizado; • Citotoxicidade não relatada; • CBZ usado como modelo; 	POSITIVO Micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico; aberração cromossômica na MO

	<p>Amostragem em 0 e 15d após a última dosagem; I) Teste de MN: n=8, triplicata, contagem de 1000 eritrócitos micronucleados; II) aberração cromossômica em medula óssea: n=5, análise de 200 metáfases/animal; III) Fragmentação de DNA: n = 8, extração de tecido hepático, eletroforese e análise.</p>	<p>formação de anéis; haploidia; poliploidia; monossomia;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retorno aos níveis próximos ao basal em 15 dias após tratamento (somente para aberração cromossômica). 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de MN em número inferior de células (RD OECD 474: 4000 PCE/animal); • Análise de aberração cromossômica com amostragem divergente da RD OECD 475: coleta da medula óssea 12-18h após tratamento e 24h após primeira amostragem. 	<p>(LOAEL = 200 mg/kg/p.c.)</p>
<p>De Stoppelaar et al., 2000.</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Fibroblastos da pele de ratos wistar ♂; Delineamento: Teste de MN <i>in vivo</i> com GPA (n=6): após 48h da indução da bolsa de granuloma (injeção subcutânea de ar estéril para proliferação de fibroblastos) – injeção simultânea de CBZ (0; 2,5; 5,0; 10 mg/bolsa) e citoB na bolsa, com coleta de fibroblastos em 48h pós-tratamento. Preparo das lâminas e análise por FISH (sonda centromérica geral e combinações de sondas para cromossomos específicos (19p + 19q, 4q + Yq) – verificação de não disjunção, poliploidia, perda cromossômica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de clastogênese; • ↑sg aneuploidia, sendo a não-disjunção o erro prevalente; • ↑sg e dose-dependente na frequência MN em células binucleadas (≥ 2,5 mg/mL); • ↑sg perda cromossômica; ↑dose-dependente de não-disjunção cromossômica; • ↓ frequência de poliploidia (dados <i>in vitro</i> indicaram que citob interfere na indução de poliploidia pelo CBZ). 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo; • Análise do maior n^o possível de células binucleadas em 2-3 três lâminas, em vez das 1000 células habituais (devido à baixa frequência de células binucleadas nas lâminas). 	<p>POSITIVO ≥ 2,5 mg/bolsa (equivalente a ~12 mg/kg p.c.)</p>
<p>PT: produto técnico; TGI: Trato gastrointestinal; vo: via oral (gavagem); MN: micronúcleo; sg: Significativo; PCE: Eritrócitos policromáticos; MN-PCE: Eritrócitos policromáticos com micronúcleo; LOAEL: Dose mais baixa de efeito adverso observável: (<i>Lowest observed adverse effect level</i>); ip: intraperitoneal; HP: hepatectomia parcial; HMN: Hepatócitos com micronúcleo; DMT: máxima dose tolerável; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD; NI: não informada.</p> <p>¹ As abordagens utilizadas pelas principais agências reguladoras internacionais foram similares e alinhadas ao racional seguido pela Anvisa, sem haver necessidade de avaliação direta do estudo original.</p>				

2.2.3 Mutagenicidade em células germinativas de mamíferos

A FT apresentou quatro estudos *in vivo* com células germinativas. Embora dois não tenham sido analisados diretamente pela CREA (Hofman e Peh, 1973; Costa et al., 2001), suas análises foram efetuadas por outras agências reguladoras e incluídas na discussão deste parecer. Os estudos *in vivo* com células germinativas, tanto regulatórios quanto da literatura científica, avaliados pela CREA, foram incluídos no Quadro 5.

A PMRA (2011) teve acesso a uma maior quantidade de estudos regulatórios (quatro ensaios de dominante letal em ratos e camundongos), sendo todos eles considerados negativos. Em um estudo com administração oral de CBZ (gavagem – doses de até 500 mg/kg p.c.) a camundongos machos, não foi observado efeito aneugênico em espermatozoides. Por outro lado, em dois outros estudos *in vivo* foram observadas aberrações cromossômicas em espermatozoides de rato, sendo um deles na dose única de 100 mg/kg p.c.. Ainda, a PMRA (2011) concluiu que houve aumento de aneuploidia em ovócitos de hamsters, a partir da análise de um outro estudo, no qual também foi evidenciado que altas doses agudas, administradas durante a meiose I (maturação do ovócito) ou meiose II (fertilização), podem ter acarretado perda embrionária precoce.

A APVMA (2009) relatou um aumento estatisticamente significativo de aneuploidia em espermátides de ratos, após administração única via oral de CBZ, somente no nível de dose intermediária (100 mg/kg p.c.) (Matsuo et al., 1999). Além disso, também foi relatada indução de aneuploidia em oócito de hamster sírio, após dose única via gavagem (1.000 mg/kg p.c.) (Costa et al., 2001). Ainda, no estudo de De Stopplaar e colaboradores (1999), verificou-se indução de espermatozoides diplóides em ratos pela exposição ao CBZ, na maior dose testada (800 mg/kg p.c.). Embora não tenha sido constatado aumento na frequência de MN em eritrócitos periféricos, a APVMA (2009) ressalta que a análise de amostras de sangue periférico de ratos para verificação de MN foi provavelmente prejudicada pelo tempo de amostragem selecionado, pois eritrócitos micronucleados podem ter sido removidos pelo baço.

Segundo a EFSA (2009a), aberrações cromossômicas ou mutações letais não foram induzidas pelo CBZ ou pelo Benomil, em células germinativas de roedores (Sarrif, 1991; Hoffman e Peh, 1973; Hofmann e Peh, 1974). Ainda, Mailhes & Aardema (1992) não observaram indução de aberrações estruturais após a exposição de camundongos ao Benomil, contudo houve atraso meiótico e aneuploidia em oócitos. A EFSA (2009a) discutiu ainda que o estudo de Matsuo e colaboradores (1999) corrobora a dose estimada como limiar *in vivo* em células somáticas para camundongos, uma vez que nele foi demonstrado o aumento na frequência de MN em espermátides de ratos, em doses a partir de 50 mg/kg p.c., valor que poderia ser escolhido como NOEL.

A JMPR/ FAO (2005) incluiu em sua análise esses mesmos estudos, alcançando conclusões similares sobre os seus resultados: ausência de evidência de anormalidades estruturais induzidas pelo CBZ, mas presença de resultados positivos indicativos da ocorrência de aneuploidia em células germinativas (Matsuo et al., 1999; Jeffay et al., 1996; de Stoppelaar et al., 1999). Por fim, a USEPA (2014; 2020) foi a única agência internacional consultada que não discutiu os resultados de estudos *in vivo* em células germinativas de mamíferos.

Verifica-se, a partir da análise dos estudos regulatórios e da literatura científica, que há evidência de indução de dano cromossômico (aneuploidia em células germinativas de mamíferos – espermatozoides e ovócitos) após exposição ao CBZ. Embora em alguns estudos os animais tenham sido previamente estimulados para superovulação (Mailhes & Aardde, 1992; Zuelke & Perreault, 1995), o que diminui sua força como evidência, os

resultados são consistentes com a ação do CBZ relatada em outros estudos *in vivo* e, desse modo, não devem ser completamente descartados. Ainda, considera-se que a dose de 50 mg/kg p.c., obtida no estudo de Matsuo (1999), não possa ser considerada um limiar para aneuploidia induzida pelo CBZ, tendo em vista que essa dose já induziu um sutil aumento na frequência de MN em espermátides e, portanto, deve corresponder ao LOAEL. Embora não significativo, tal aumento não pode ter sua significância biológica completamente descartada. Pacchierotti e colaboradores (2019) enfatizam a necessidade de não considerar apenas diferenças estatísticas nos estudos citogenéticos, pois isso pode subestimar o potencial aneugênico verdadeiro da substância. A APVMA, ao avaliar esse mesmo estudo, também considerou que os efeitos genotóxicos (MN) já ocorreram em 50 mg/kg p.c.. Em decorrência disso, esse valor foi definido como LOAEL pela agência australiana, sem o estabelecimento de NOAEL, já que essa foi a menor dose testada (APVMA, 2009). A ausência de limiar para este desfecho será detalhadamente discutida no item 4 deste parecer.

A evidência de indução de aneuploidia *in vivo* em células germinativas para o CBZ está em consonância com os resultados obtidos *in vitro*, com células de mamíferos, e *in vivo*, com células somáticas. Portanto, conclui-se que o CBZ é capaz de causar mutações do tipo aberrações cromossômicas numéricas em células germinativas de mamíferos.

Quadro 5. Avaliação da mutagenicidade do ingrediente ativo CBZ *in vivo* em células germinativas de mamíferos.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Tates, 1979	<p>Pureza: Não informada. Linhagem: Roedor <i>Microtus oeconomus</i>. Delineamento: Administração vo (gavagem, 250 mg/kg), 2x, intervalo de 24h. Amostragem após 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias: eutanásia, coleta de túbulos seminíferos e preparo de lâminas. Avaliação de não-disjunção cromossômica e espermátides diplóides.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg frequência de não-disjunção cromossômica em espermatócitos primários jovens no dia 10; • Sem evidência de indução de espermátides diploides; • Autor relata que são dados iniciais, obtidos em um n° reduzido de animais, sem análise em duplicata. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de 2000 núcleos esféricos de espermátides precoces/ animal para não-disjunção cromossômica (n+1) e diploidia (2n); • Não informa n° animais; • Somente um nível de dose utilizado; • Ausência de controle positivo e negativo concorrente; adoção de controle negativo não-concorrente (exposição à radiação). 	INCONCLUSIVO
Zuelke & Perreault, 1995	<p>Pureza: 95%. Linhagem: Hamsters sírios.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>: ↑sg 	<ul style="list-style-type: none"> • Indução de superovulação não detalhada; 	POSITIVO CBZ alcança ovário e causa

	<p>Delineamento: Exposição durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 µg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c., gavagem, n=6). Imunofluorescência de microtúbulos, cultura de zigotos e avaliação microscópica dos zigotos e embriões.</p>	<p>anormalidades morfológicas na cromatina materna de zigotos (6-8h; múltiplos corpos polares secundários, múltiplos pronúcleos e arrasto meiótico), e de embriões (26h; blastômeros micronucleados, múltiplos corpos polares secundários e arrasto na metáfase). ↓sg embriões que progrediram para 2 células;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Imunofluorescência confirmou danos aos fusos na fertilização <i>in vitro</i>; • Dose única de CBZ, na fertilização <i>in vivo</i>, induziu aneuploidia no zigoto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral; • Perda precoce na prenhez pode ser explicada por dois mecanismos: arrasto na meiose, sem clivagem do zigoto; ou indução de aneuploidia no zigoto, com subsequente arrasto no desenvolvimento. 	<p>dano aos fusos mitóticos, aneuploidia nos ovócitos e perda pré-implantação (1000 mg/kg)</p>
<p>Jeffay et al., 1996</p>	<p>Pureza: 95%. Linhagem: Hamsters sírios fêmeas. Delineamento: Administração única vo (gavagem, 1000 mg/kg p.c.; n=10). Eutanásia após a ovulação (D₁ pós-tratamento) para amostragem de oócitos e avaliação de aneuploidia; ou entre os dias gestacionais 1-5 (DG 1-5), para avaliar a fertilização e o desenvolvimento do embrião pré-implantação, bem como enumerar sítios de implantação precoces.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑sg ovócitos aneuplóides (37,2% CBZ x 13,5% controle), sem anormalidades estruturais; • Sem alteração na taxa de fertilização e no nº ovócitos recuperados; ↓sg nº médio de sítios de implantação; • Atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação: ↑sg embriões com menos de 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo; • Estudo anterior indicou que CBZ induziu perda gestacional precoce quando administrado na tarde do proestro ou no início da manhã do estro, mas não quando administrado após a fertilização; • No presente estudo, CBZ foi administrado na tarde do proestro, 	<p>POSITIVO CBZ alcança ovário e induz aneuploidia em oócitos, atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação. (1000 mg/kg p.c.)</p>

		<p>oito células (DG3) e embriões que não atingiram o estágio de blastocisto (DG4); ↓ implantação;</p> <ul style="list-style-type: none"> Dados indicam maior sensibilidade do oócito aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (maturação do ovócito) do que após esse processo. 	<p>coincidindo com a maturação meiótica dos oócitos;</p> <ul style="list-style-type: none"> 121 e 52 oócitos analisados, nos grupo CBZ e controle, respectivamente. 	
Matsuo et al., 1999	<p>Pureza: Não informada; Linhagem: Rato <i>Sprague-Dawley</i>; Delineamento: Administração vo (gavagem – 0, 50, 100 e 400 mg/kg; n=6). Teste de MN em espermátides, com imunocitoquímica (diferenciar aberrações numéricas e estruturais).</p>	<ul style="list-style-type: none"> 50 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística; 100 mg/kg: ↑sg espermátides redondas com MN nos estágios I e V, nos dias 1 e 4,5 pós-exposição. Cinetócoros em 68% dos MN; 400 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística; Indução de aberrações cromossômicas numéricas em espermátides, com alta incidência de aneuploidia. 	<ul style="list-style-type: none"> Contagem de 1500 espermátides na fase 1; É possível que em 400 mg/kg ocorra formação de MN nas espermátides, porém elas não sobrevivem (↓sg espermátides na fase 1 um dia após o tratamento – dados não apresentados). 	<p>POSITIVO Micronúcleo em espermátides; aneugênese (≥50 mg/kg)</p>
De Stoppelaar et al., 1999 ¹ Apud APVMA (2009) e JMPR/FAO (2005)	<p>Pureza: Não informada; Linhagem: Ratos <i>Wistar</i>; Delineamento: Administração dose única vo (gavagem – 50, 150, 450 ou 800 mg/kg p.c.; n=3-5). I) Amostragem de espermatozoides epididimários em 31d pós-tratamento (alterações cromossômicas numéricas por FISH - sondas</p>	<ul style="list-style-type: none"> Indução de espermatozoides diplóides (800 mg/kg p.c.) e ↑ espermatozoides hiperhaplóides em doses ≥ 150 mg/kg p.c. (maioria de espermatozoides diploides); 	<ul style="list-style-type: none"> Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/ animal, com categorização adicional de espermatozoides hiperhaplóides (44Y, 4YY, 44) por tamanho nuclear, a fim 	<p>POSITIVO Aneugênese (LOAEL = 150 mg/kg p.c.)</p>

	<p>cromossomos 4 e Y); II) Amostragem de eritrócitos periféricos em 48h pós-tratamento (ensaio de MN). Análise adicional subsequente (n=3): Administração CBZ (2,5 a 800 mg/kg p.c.) com análise por FISH (sondas cromossomos 4, 19 e Y).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sem ↑MN em eritrócitos periféricos. Autores sugeriram que indução de diploidia em espermatozoides poderia ocorrer em doses inferiores àquelas necessárias para a indução de MN em eritrócitos periféricos. Entretanto, ensaio de MN no sangue periférico provavelmente foi prejudicado pelo tempo de amostragem selecionado (eritrócitos com MN podem ter sido removidos pelo baço). 	<p>de se avaliar quais espermatozoides foram realmente diploides;</p> <ul style="list-style-type: none"> Análise de 2000 eritrócitos periféricos/ animal. 	
<p>Adler et al., 2001, 2002 Apud JMPR/FAO (2005)</p>	<p>Pureza: 99,1%. Linhagem: camundongos C3H ♂ Delineamento: Administração dose única (gavagem – 0, 20, 50, 150 ou 500 mg/kg p.c.). Amostragem de espermatozoides epididimários em 22D (controle negativo e tratado) e 24D (controle positivo) pós-tratamento. Análise de alterações cromossômicas numéricas: FISH (sondas cromossomos X, Y e 8).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Incidência de diploidia relatada como tendo sido induzida em um experimento anterior: 0, 3, 4, 2 e 4 (em aproximadamente 50.000 espermatozoides analisados) nas doses de 0, 20, 50, 150 e 500 mg/kg p.c., respectivamente ; Comparação das incidências agrupadas de espermatozoides anormais de todos os animais dentro de um grupo tratado com o grupo controle, 	<ul style="list-style-type: none"> Grupo controle positivo (colchicina); Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/ animal, com determinação dos seguintes fenótipos: haplóide normal (X8 ou Y8), hipohaplóide (O8, X0 ou Y0), hiperhaplóide (XX8, YY8, XY8, X88 ou Y88) e diploide (XY88, XX88 ou YY88), de acordo com a combinação de sinais fluorescentes em cada núcleo. 	<p>NEGATIVO</p>

		resultando em significância estatística. Na reanálise (considerando o animal como unidade experimental), não houve significância estatística, nem dose-resposta.		
--	--	--	--	--

vo: via oral; CBZ: carbendazim; MN: micronúcleo; LOAEL: *Lowest observed adverse effect level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável); D: dia; DG: dia gestacional; FISH: hibridação fluorescente *in situ*; NI: não informada.

2.3 Outros estudos de genotoxicidade

Foram avaliados alguns ensaios cometas identificados na revisão sistemática, os quais, de forma geral, apresentaram resultados negativos (Quadro 6). Outros estudos de genotoxicidade, como ensaios de troca de cromátides irmãs e de síntese não programada de DNA foram analisados pelas demais agências internacionais. A USEPA (2020) concluiu que o CBZ não induziu a troca de cromátides-irmãs *in vitro* em células de ovário de hamster chinês, porém, nesse mesmo estudo, verificou-se alta incidência de tetraploidia (57-100%). Ainda, a partir da análise de três estudos, verificou-se que o CBZ não induziu a síntese não programada de DNA em hepatócitos primários de ratos (USEPA, 2014). A EFSA (2009a) mencionou ainda o estudo de Tong (1981), que avaliou a ocorrência de síntese não programada de DNA em cultura primária de hepatócitos de rato e camundongo, para concentrações de CBZ de 0,0125 a 125 µg/mL; e o estudo de Stammberger (1992), que avaliou a síntese não programada de DNA em células humanas, em concentrações de 0,1 a 300 µg/mL. Ambos os estudos foram negativos. Já o resultado do estudo de Greim e Andreae (1981), para síntese não programada de DNA em cultura primária de hepatócitos de ratos, foi considerado equívoco e sem relevância biológica (limitada validade científica devido à descrição incompleta da metodologia e resultados, além da seleção inadequada de doses). Verifica-se que esses outros estudos de genotoxicidade avaliados pela CREAV e pelas agências internacionais, descritos no presente item, corroboram a ausência de evidência suficiente para considerar que o CBZ provoca mutação pontual em células de mamíferos.

Quadro 6. Avaliação de outros ensaios de genotoxicidade (ensaio cometa) com o ingrediente ativo Carbendazim.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Lebailly et al., 1997	Pureza: >99%; Linhagem: Linfócitos humanos de sangue periférico; Delineamento: Ensaio cometa – 1h de incubação com CBZ (25 a 500 mM). Avaliação de dano ao DNA imediatamente ou 24h pós-exposição. Uso de Etoposida como controle positivo.	<ul style="list-style-type: none"> CBZ não foi citotóxico (viabilidade >90%) e não induziu danos ao DNA, tanto imediatamente quanto em 24h pós-exposição. 	<ul style="list-style-type: none"> Análise de poucas células por imagem (25). Sem controle negativo. 	INCONCLUSIVO

<p>Dikić et al. 2012b</p>	<p>Pureza: 95%; Linhagem: Camundongos <i>Swiss</i> ♀/♂; Delineamento: Ensaio cometa – administração vo (20 mg/kg/dia) 1x dia por 28 dias (n=10, 5♀ e 5♂). Análise: pesagem corporal; coleta e pesagem do fígado, com preparo tecidual para ensaio cometa (comprimento, intensidade de cauda e cálculo do momento de cauda); e dosagens bioquímicas (ALT, AST, ALP, LDH-P).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓sg ganho de peso corporal, sem impacto significativo no peso corporal; sem alteração no peso do fígado; • ↑sg proteína total no fígado, atividade de AST, ALT; ↓sg atividade de ALP; • ↑sg comprimento de cauda s/ diferença sg no momento e intensidade da cauda (tratados x controle, com inclusão de ♀ e ♂); • ↑sg intensidade e momento de cauda em ♂ (tratados x controle); • Autores discutem que, embora a intensidade da cauda tenha sido semelhante ao controle, os fragmentos devem ter sido mais curtos e percorreram uma distância maior que em animais controle. 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 lâminas/ animal; • Análise de 100 cometas/ animal (RD OECD 489: 150) • N^o núcleos de cauda longa foi contado como um n^o células no percentil 95 do comprimento da cauda do cometa/ grupo/ sexo; • Ausência de controle positivo concorrente; • Dose única (RD OECD 489: 3 doses) • Não foi informado intervalo de amostragem (RD OECD 489: coleta em 2-6h). 	<p>NEGATIVO</p>
<p>Bowen et al., 2011</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Ratos Han-Wistar ♂; Delineamento: Ensaio cometa – administração repetida de CBZ vo (gavagem; 1000, 1500 e 2000 mg/kg/dia; n= 6), em 0, 24h e 45h. Amostragem: coleta de fígado, sangue periférico (leucócitos) e</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou redução no ganho de peso; • Níveis aceitáveis de citotoxicidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior dose: DMT; • Eletroforese com 3 lâminas/ animal/ tecido; • Ausência de controle positivo concorrente; 	<p>NEGATIVO</p>

	estômago em 3h após 3ª dose (T ₄₈).	<p>para o grupo controle (%<i>hedgehog</i> não superior a 30% e % células difusas não superior a 24%);</p> <ul style="list-style-type: none"> Sem diferença sg na intensidade de cauda (em relação ao controle) em todos os tecidos avaliados, exceto estômago, onde foi observado ↑sg apenas na maior dose, mas c/ citotoxicidade (%<i>hedgehog</i> > 70% em relação ao controle). 	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de controle histórico para sangue periférico; Análise de 100 células/ animal; 50 células/ gel (RD OECD 489: 150 células/ tecido/ animal); Citotoxicidade: frequência de "<i>hedgehog</i>" e m 100 células/ lâmina (RD 489: 150 células/ amostra). 	
Vigreux et al., 1998	<p>Pureza: >99%; Linhagem: CHO; Delineamento: Ensaio cometa, incubação por 1h, S9, controle negativo e positivo (Etoposida); Análise de 15 lâminas (25 células/ lâmina).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sem citotoxicidade na concentração limite de 250 µM; Ausência de danos ao DNA (proporção de células danificadas foi baixa em todas as concentrações testadas; s/ ↑sg do momento de cauda). 	<ul style="list-style-type: none"> Citotoxicidade avaliada pelo método XTT (2 dias após tratamento); Limite de dose mais alta testada (250 µM), por insolubilidade do CBZ. 	NEGATIVO
Rai & Mercurio, 2020	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Camundongo <i>Swiss</i>; Delineamento: Ensaio cometa – exposição vo (água; 20 µM; n = 5) com 2 protocolos: Grupo 1 (90d exposição); Grupo 2 (90d exposição + 45d s/ dosagem); coleta de linfócitos de sangue periférico. Controle positivo:</p>	<ul style="list-style-type: none"> Sem diferença de dano ao DNA entre controle negativo com linfócitos de camundongo não-expostos e 	<ul style="list-style-type: none"> A concentração usada é inferior à concentração encontrada em água superficial (apud Rajput et al., 2018); Uma única dose testada. 	POSITIVO

	Etoposida em células de linhagem comercial. Controle negativo: linfócitos de camundongos não expostos e linhagem comercial.	com linhagem comercial; <ul style="list-style-type: none"> • Grupo 1 e 2: verificação de maior dano ao DNA, em comparação aos controles negativos, e em níveis semelhantes ao do controle positivo (30%); • Sem alteração no consumo de água/ alimento ou ganho de peso corporal. 		
CBZ: Carbendazim; vo: via oral (gavagem); sg: significativo; ALT: Alanina aminotransferase; AST: Aspartato aminotransferase; MTT: ensaio de redução de tetrazolium; ALP: fosfatase alcalina; LDH-P: lactato desidrogenase plasmática; S9: sem ativação metabólica; SP: sangue periférico; “hedgehog”: nuvens, células-fantasma; RD OECD: Recomendação Diretriz OECD, DMT: dose máxima tolerada, XTT: ensaio de redução de tetrazolium; NI: não informada.				

2.4 Estudos mecanísticos

A FT incluiu no relatório de genotoxicidade um estudo mecanístico (Can et al., 1997), no qual foi constatado que o CBZ provoca a interrupção do ciclo celular por meio da indução de instabilidade dos microtúbulos e comprometimento da integridade dos fusos meióticos. Além desse, foram também incluídos no Quadro 7 outros estudos mostrando a ação desse IA na polimerização de microtúbulos, com consequente dano à divisão celular. Esses efeitos tóxicos estão claramente interligados à indução de aneuploidia pelo CBZ, conforme discutido nos tópicos anteriores. Assim, existe evidência suficiente para caracterizar o seguinte mecanismo de ação do CBZ: interação com a tubulina, o que compromete a polimerização dos microtúbulos e culmina em erros de segregação cromossômica durante a divisão celular. As demais autoridades regulatórias internacionais concordaram com essa avaliação e também concluíram que o CBZ deve ser considerado uma substância aneugênica, em decorrência do seu mecanismo de ação (EFSA, 2009; PMRA, 2011; APVMA, 2009; JMPR/FAO, 2005).

Quadro 7. Avaliação de ensaios sobre mecanismos de genotoxicidade com o ingrediente ativo CBZ.				
Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Can e Albertini., 1997	Pureza: 99,7%; Linhagem: Culturas primárias de células da granulosa humanas; Delineamento: Culturas de células	Efeito na proliferação celular: <ul style="list-style-type: none"> • ↑sg índice mitótico em todas as concentrações entre os dias 2-9. • >95% células com metáfase anormais 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ atua como agente mitostático por meio de interferência seletiva 	CBZ induziu efeitos na divisão celular e despolimerização de microtúbulos (≥ 0,2 µg/mL)

	(dia 3) expostas ao CBZ (0,06; 2; 6µg/mL) por 3, 6, 9, 12 e 15h, com posterior fixação, marcação imunofluorescente (avaliação da organização de MT, centrossomas, proteínas associadas ao fuso e DNA) e análise quantitativa.	(desorganização cromossômica com fusos bi, tri e multipolares); ausência de anáfase e/ou telófase (CBZ atua na transição metáfase-anáfase). Efeito sobre MT/ organização do fuso mitótico (exposição ≥9h): <ul style="list-style-type: none"> • Alteração na forma, simetria e nº polos do fuso (afeta integridade do centrossomo); • Ação seletiva em células na metáfase; • Alteração na composição de MT, com despolimerização de MT não acetilados. 	na organização de MT e centrossomo; <ul style="list-style-type: none"> • Embora os distúrbios do fuso sejam detectáveis, a progressão do ciclo celular é prejudicada devido aos efeitos seletivos na dinâmica dos MT, ao invés de despolimerização dos MT. 	
Lim et al., 1997b	Pureza: Benomil (>95%; contaminação 10% CBZ); CBZ (alta pureza, %NI); Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; Delineamento: <u>Estudo <i>in vivo</i></u> : parecer de toxicidade reprodutiva. <u>Estudo <i>in vitro</i></u> : Purificação de tubulina testicular (n=8) e análise da inibição da montagem de MT após incubação com Benomil (10, 50 e 100 µM) e CBZ (5 e 10µM – como contaminante do Benomil).	<ul style="list-style-type: none"> • Identificação de subunidades α e β-tubulina; • Inibição concentração-dependente na montagem de MT (n=3): IC50 de 75µM (Benomil) e 5µM (CBZ), indicando que o efeito da exposição ao Benomil foi quase que completamente decorrente do CBZ como contaminante. 	<ul style="list-style-type: none"> • Autores informaram que, apesar dos desfechos verificados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, tal estudo não comprova relação direta entre a inibição <i>in vitro</i> da polimerização dos MT e a descamação de células germinativas <i>in vivo</i>. 	POSITIVO CBZ induziu inibição da montagem de MT <i>in vitro</i> em níveis substancialmente inferiores (≥ 5 µM) àqueles que induziram danos testiculares <i>in vivo</i> (164 mg/kg ip e 262µg it)
Correa et al., 2001	Pureza: Alta (%NI) Linhagem: Cultura primária de células de túbulos seminíferos de ratos <i>Sprague-Dawley</i> ; Delineamento: Coleta e incubação de células de túbulos seminíferos de ratos	<ul style="list-style-type: none"> • Indução da despolimerização de MT nos túbulos seminíferos isolados: ↑sg % tubulina solúvel e ↓sg % tubulina polimerizada (30 e 60 min); sem perda sg total de tubulina quantificada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cada amostra de túbulo seminífero, utilizada para gerar as culturas controle, veículo e tratada, foi 	CBZ induziu despolimerização de MT, que parece estar associada à redução da tirosinação de tubulina, ao invés de perda de tubulina. (100 µM)

	<p>não-tratados. Exposição a CBZ (100µM). Análises: isolamento, quantificação (ELISA) e determinação da composição (<i>western blot</i>) de tubulina solúvel e polimerizada no epitélio seminífero.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem alteração no nível ou distribuição de proteínas α e β-tubulina acetiladas (frações solúvel e polimerizada). • \downarrow nível α- tubulina na fração de tubulina polimerizada, indicando que CBZ induziu \uparrow tubulina solúvel via despolimerização; • CBZ não induziu \downarrow ATP, (manutenção fisiologia normal dos túbulos seminíferos). 	<p>obtida a partir do testículo de um rato; não foi relatado o número total de animais utilizados;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ensaio de ELISA com n = 3-4. 	
<p>Winder et al., 2001</p>	<p>Pureza: Alta (%NI) Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> (100-103 dias). Delineamento: Obtenção de tubulina c/ e s/ proteínas associadas a microtúbulos (MAP) de cérebro e testículos. 1) Ensaio de associação de tubulina: c/ e s/ MAP, pré ou co-incubação com CBZ (100 µM). Avaliação por espectrofotometria. 2) Ligação de GTP à tubulina: incubação com CBZ por 20 min antes da adição de GTP. Avaliação por filtração. 3) Efeito de CBZ na hidrólise de GTP: CBZ adicionado após tubulina incubada com GTP. Avaliação por HPLC.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ensaio de tubulina s/ MAP: bastante sensível à inibição da polimerização pelo CBZ. Ensaio c/ MAP cerebral mais sensível à inibição da polimerização, que a MAP testicular. • Adição de albumina não alterou ação inibitória do CBZ (redução da inibição é específica para MAP). • CBZ afetou a iniciação da polimerização dos MT, mas não os MT já formados. • CBZ preveniu a associação de GTP à tubulina dose-dependente. Adição de GTP \downarrowsg a inibição da polimerização pelo CBZ. • Não houve diferença na formação de GDP com ou sem CBZ. • CBZ interferiu nos eventos iniciais da polimerização de MT, especificamente na ligação de GTP à tubulina. As MAPs moderam esse efeito e reduzem a inibição por CBZ. 	<ul style="list-style-type: none"> • Maioria dos resultados sem diferença estatística. 	<p>CBZ interfere nos eventos iniciais de polimerização dos microtúbulos. (100 µM)</p>

Markelewicz, 2004	<p>Pureza: Alta (%NI)</p> <p>Delineamento: <i>In vivo</i>: parecer de toxicidade reprodutiva. <i>Ex vivo</i>: Hexanodiona (HD) incubada com tubulina purificada por 16 horas. Inclusão de replicatas com adição de CBZ (70 e 140 μM).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • HD \downarrowtempo e \uparrowvelocidade máxima de formação de MT; • Normalização pela exposição concomitante de CBZ. 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como agente inibidor da polimerização de MT para avaliação da resposta de HD. 	<p>Tubulina+HD é resistente aos efeitos inibitórios do CBZ (70 μM)</p>
Lim and Miller, 1997a	<p>Pureza: > 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> pré- (23-28 dias) e pós-puberais (83-90 dias);</p> <p>Delineamento: <i>In vivo</i>: incluído no parecer de toxicidade reprodutiva. <i>In vitro</i>: Obtenção de tubulina testicular de ratos pós (n=5) e pré-puberais (n=10) para avaliação da montagem de MT (CBZ 5 e 10 μM pré-incubado com tubulina por 20 minutos).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da associação de MT pelo CBZ foi similar para tubulina de ratos pré (IC50 = 4,6 μM) e pós-puberais (IC50 = 4,9 μM). 	<ul style="list-style-type: none"> • Comparação da inibição pelo CBZ da associação de tubulinas de ratos pré e pós-puberais. 	<p>CBZ inibiu a polimerização de tubulina de ratos pré e pós-puberais de forma similar (4,6 μM)</p>
Zuelke e Perreault, 1995	<p>Pureza: 95%;</p> <p>Linhagem: Hamsters sírios.</p> <p>Delineamento: Exposição durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 μg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c.; gavagem, n=6). Imunofluorescência de MT, cultura de zigotos e microscopia dos zigotos e embriões.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Imunofluorescência confirmou danos aos fusos meióticos durante a fertilização <i>in vitro</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral; • Descrição completa desse estudo no Quadro 5. 	<p>CBZ induziu dano aos fusos mitóticos (6 μg/mL)</p>
Warr et al., 1982	<p>Pureza: Não informada.</p> <p>Linhagem: linhagem mutante CRM₇₉₅ de células CHO.</p> <p>Delineamento: investigação da viabilidade celular da linhagem mutante: plaqueamento de 5 x 10⁶ em CBZ 10⁻⁵M</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Linhagem CRM₇₉₅ é 2x mais resistente a CBZ, quando comparada à linhagem selvagem, o que sugere que uma alteração na proteína microtubular pode alterar esse nível de resistência e indica que o CBZ induz inibição do 	<ul style="list-style-type: none"> • Descrição incompleta da metodologia; • Análise em triplicata; • Colônias com mais de 50 células 	<p>INCONCLUSIVO</p>

	(dobro da concentração tóxica para linhagem selvagem).	crescimento em células de mamíferos por meio de um efeito nos microtúbulos.	foram contabilizadas; <ul style="list-style-type: none"> • Desvio padrão da triplicata <15. • Cada experimento feito em duplicata. 	
Tollstadius et al., 2019	Pureza: 97%; Linhagem: Células alveolares A549; Delineamento: 4,9 a 1046 µM por 24h: 1) monocamada celular (citotoxicidade por MTT e progressão do ciclo celular; EROs, atividade mitocondrial e caspase por citometria de fluxo); 2) sistema de cultura celular (3D) em interface ar-líquido (AIL) (citotoxicidade por MTT; citoqueratina, CD44, MUC-1, caspase, α-tubulina, Nrf2, E-caderina, EROs, atividade mitocondrial por fluorescência).	<ul style="list-style-type: none"> • Monocamada exposta a concentrações não citotóxicas mostrou apenas arrasto na fase G2/M. • Sistema 3D AIL: ↑sg expressão de Caspase 3, α-tubulina e EROs; ↓sg atividade mitocondrial. • CBZ é citotóxico para células pulmonares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliações feitas para dose que causou pouco impacto na viabilidade celular, ou seja com baixa citotoxicidade (12,5 µM). 	Arrasto na mitose e aumento da expressão de α-tubulina (12,5 µM)
MT: microtúbulos; CBZ: Carbendazim; sg: significativo; IC50: concentração que inibe a montagem do MT em 50%; MTT: ensaio de redução de tetrazolium; MAP: proteínas associadas a microtúbulos; NI: não informada.				

2.5 Estudos de toxicidade aos órgãos reprodutivos e às células germinativas

Conforme avaliação dos estudos de toxicidade reprodutiva (Quadro x, parecer REPROTOX), o dano testicular causado pelo CBZ decorre da inibição da associação de microtúbulos, o que acarreta falha na segregação cromossômica durante a meiose espermática, necrose dos espermatócitos meióticos, descamação de espermátides imaturas, atrofia do túbulo seminífero, anormalidades nas espermátides longas e alongadas (inclusive no acrossoma), com formação de magaespermátides e simplastos. Verifica-se que esse conjunto de efeitos adversos está associado à capacidade de interação do CBZ com elementos do citoesqueleto, como os microtúbulos, o que leva a aberrações cromossômicas numéricas, conforme já discutido neste parecer. Assim, pode-se concluir que, além de o CBZ ser um mutágeno aneugênico que provoca danos cromossômicos nas células somáticas (item 2.2.2), também há evidência suficiente indicativa do seu potencial mutagênico para as células

germinativas (item 2.2.3), inclusive com comprometimento da viabilidade embrionária dos animais expostos.

3. VIA DE EFEITO ADVERSO (AOP)

Uma via de efeito adverso (AOP) já foi caracterizada especificamente para explicar efeitos aneugênicos na prole decorrentes da ligação de químicos à tubulina (Marchetti et al., 2016), conforme pode ser observado na Figura 1 – AOP 106 (<https://aopwiki.org/aops/106>). O peso da evidência para esse AOP é considerado forte.

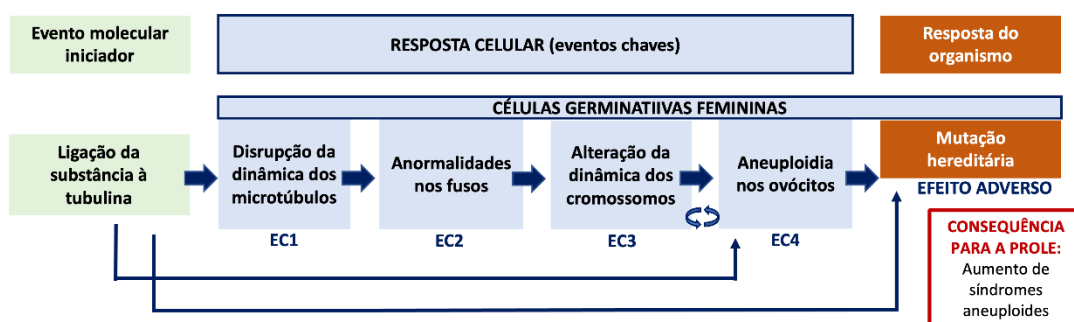


Figura 1. Via de Efeito Adverso para efeitos aneugênicos na prole decorrentes do evento molecular iniciador (ligação de substâncias químicas à tubulina). Setas azuis representam a relação entre os eventos-chaves (EC). Essa relação pode ser adjacente (um evento-chave desencadeia a ocorrência do evento seguinte) ou não-adjacente (um evento-chave desencadeia outros eventos-chaves paralelamente à via principal).

Adaptado de: <https://aopwiki.org/aops/106>

O aumento de aneuploidia pode afetar qualquer cromossomo e dados em roedores sugerem que aumento de aneuploidia em células germinativas leva a aumento de aneuploidia na prenhez. Nessa AOP, a ligação da substância à tubulina induz a sua despolimerização, com posterior desorganização do fuso mitótico, alteração da dinâmica cromossomal e, conseqüentemente, geração de ovócitos aneuplóides. Ovócitos aneuplóides podem ser fertilizados e gerar conceptos aneuploides. Vale ressaltar que a aneuploidia durante a meiose de células germinativas é a principal causa de abortos espontâneos em humanos e é a anormalidade cromossômica mais observada no nascimento (Pacchierotti et al., 2019).

O efeito molecular iniciador, ligação à tubulina (Evento denominado 718 na AOP), foi devidamente investigado para diversas substâncias, inclusive para o CBZ, que foi incluído na descrição da AOP 106 como exemplo de substância capaz de desencadear esse evento. O CBZ também foi identificado como capaz de promover outro evento-chave dessa AOP: alteração do número de cromossomos (aneuploidia) em ovócitos de hamsters (Evento 723). A janela de sensibilidade para a indução de aneuploidia é o período próximo à ovulação e, dependendo da dose e do tempo de exposição, a indução de aneuploidia pode alcançar quase

100%. Ou seja, a dinâmica dos fusos em células germinativas femininas é bastante sensível a sutis alterações e pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II. Vale ressaltar que não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP. Entretanto, estudos *in vivo* mostram que o período de exposição antes da divisão deve ser cuidadosamente considerado caso esse tipo de avaliação seja feita, já que as substâncias possuem diferentes meias-vidas de ligação à tubulina. De modo geral, sabe-se que substâncias que interferem na montagem de microtúbulos já em baixas concentrações *in vitro* tendem a ser fortes aneugênicos *in vivo*, entretanto, não foi determinada uma relação quantitativa especificamente para essa comparação (Marchetti et al., 2016).

Os estudos *in vitro* e *in vivo* com o CBZ neste parecer, somados aos estudos mecanísticos avaliados, claramente indicam a ocorrência do evento iniciador (ligação à tubulina) e de eventos-chave (despolimerização da tubulina, desorganização de fuso mitótico e indução de ovócitos aneuplóides) da AOP 106. Além disso, existe clara evidência da ocorrência do efeito adverso (mutação hereditária na célula germinativa, levando a formação de conceptos aneuploides). Portanto, a referida AOP corrobora a classificação do CBZ como mutagênico para células germinativas (Marchetti et al., 2016). Ainda, a descrição dessa AOP e de seus eventos-chaves aponta incertezas quantitativas que podem estar associadas a essa via, interferindo na escolha de um limiar adequado. Marchetti e colaboradores (2016), ao utilizarem o CBZ para exemplificar essa AOP, também levantaram preocupação com relação à exposição humana a esse ingrediente ativo de agrotóxico, pois identificaram preocupante exposição humana ocupacional e pela dieta.

4. CLASSIFICAÇÃO DO CARBENDAZIM QUANTO À MUTAGENICIDADE

A RDC nº 294/2019 estabelece a classificação toxicológica dos ingredientes ativos de agrotóxicos, em função da mutagenicidade, nas Categorias 1A, 1B ou 2 (Seção 4 do Anexo IV), de acordo com a avaliação baseada no peso da evidência.

A FT, com base nos documentos das agências reguladoras internacionais (EFSA, 2010; APVMA, 2009; EC, 2007; EU, 2007; JMPR, 2005; USEPA, 2005), concluiu que o mecanismo de ação genotóxica do CBZ é bem conhecido e consensual entre essas agências. Com uma literatura extensa, os estudos de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* mostram que o fungicida promove alterações cromossômicas numéricas (aneugênese) ao interferir na tubulina e comprometer a montagem dos microtúbulos que formam o fuso mitótico, prejudicando assim a divisão celular.

Embora não existam estudos epidemiológicos especificamente para humanos com o CBZ, a partir da análise das evidências atualmente disponíveis, conclui-se que o CBZ é uma substância aneugênica para células somáticas e germinativas, tanto *in vitro* quanto *in vivo* em mamíferos. Portanto, quanto à mutagenicidade, esse ingrediente ativo se enquadra na Categoria 1B: Produto que presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos; sendo essa classificação baseada nos resultados positivos de estudos de mutagenicidade *in vivo* em células germinativas de mamíferos. Essa mesma classificação foi adotada pela EFSA (2010).

5. DETERMINAÇÃO DE LIMIAR PARA EFEITO ANEUGÊNICO EM CÉLULAS GERMINATIVAS HUMANAS

Conforme determinado pela Lei nº 7.802, de julho de 1989; pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; e regulamentado pela RDC nº 294, de julho de 2019, é proibido o registro de ingredientes ativos de agrotóxicos categorizados como conhecidos ou presumidamente mutagênicos e não for possível determinar um limiar de dose para esse desfecho que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

É importante esclarecer que limiares de dose geralmente não são determinados para efeitos mutagênicos (USEPA, 2005; ECHA, 2017). Contudo, para o CBZ, a APVMA (2009) optou pela determinação de um limiar especificamente para o seu efeito aneugênico. A EFSA (2010) também sugeriu um limiar para este efeito; porém, posteriormente, o Carbendazim foi proibido na União Europeia, sendo um dos motivos de proibição, o seu potencial mutagênico. A PMRA (2011) e a USEPA (2020) não determinaram limiar específico para a aneugênese, já que essas agências utilizam os dados de mutagenicidade apenas como evidências mecânicas associadas a outros desfechos toxicológicos mais preocupantes, como a carcinogenicidade e toxicidade reprodutiva. Assim, essas duas agências utilizaram as evidências de aneugenicidade do CBZ para a avaliação de risco de carcinogenicidade desse IA.

A FT discutiu que, de maneira geral, diferentes concentrações de CBZ eliminam completamente a formação do fuso mitótico em células de mamíferos, o que resulta em fusos mitóticos imperfeitos, falha na segregação cromossômica e, conseqüentemente, na produção de células descendentes aneuplóides, isto é, com números reduzidos ou aumentados de cromossomos (por exemplo, monossomia ou trissomia). Além disso, a própria FT menciona que, embora os alvos celulares do CBZ sejam essencialmente os mesmos para mitose e meiose, não existem evidências que provem conclusivamente que as concentrações de CBZ capazes de modificar a mitose e a meiose são idênticas, conforme discutido pela APVMA (2009). Ainda, a FT relata que a EFSA (2010) estipulou como limiar para atividade aneugênica *in vitro* o valor de 0,2 a 0,6 µg/mL e um NOAEL *in vivo* de 50 mg/kg p.c. para efeitos aneugênicos em espermatozoides. Já a APVMA (2009) utilizou o valor de 50 mg/kg p.c. como LOAEL e, por isso, para a avaliação de risco deste ingrediente ativo calculou um limiar humano com um fator de segurança extra de 10 vezes para considerar a extrapolação de LOAEL para NOAEL, obtendo um limiar (0,05 mg/kg p.c.) para humanos desse desfecho dez vezes menor do que a EFSA.

A partir dos aspectos levantados pelas demais agências regulatórias e pela FT, optou-se por uma discussão mais aprofundada sobre a determinação de um limiar seguro *in vivo* para células germinativas humanas expostas ao CBZ, mesmo este não sendo um desfecho usualmente discutido quanto à ocorrência de limiar. Para tanto, faz-se necessária a divisão da discussão em dois principais aspectos: 1) Escolha do valor de 50 mg/kg p.c. como NOAEL/LOAEL para efeitos aneugênicos em espermátides de ratos; e 2) Determinação de limiar para efeitos aneugênicos em células germinativas humanas.

5.1 Uso de 50 mg/kg p.c como NOAEL/LOAEL para efeitos aneugênicos em espermátides de ratos

Conforme discutido no item 2.2.3, considera-se inadequado utilizar o valor de 50 mg/kg p.c. como NOAEL para os efeitos aneugênicos do CBZ, pois, no estudo de Matsuo e colaboradores (1999), foi demonstrado um leve aumento na frequência de MN em

espermátides já na dose de 50 mg/kg p.c.. Tal aumento, embora sem significância estatística, não pode ter sua significância biológica desconsiderada, principalmente quando avaliado conjuntamente às evidências de toxicidade reprodutiva decorrentes da atividade aneugênica do CBZ. Pacchierotti e colaboradores (2019) também enfatizaram a necessidade de não considerar apenas diferenças estatísticas nos estudos citogenéticos, pois isso pode subestimar o real potencial aneugênico da substância. A APVMA (2009), alinhada a esse posicionamento, concluiu que o valor de 50 mg/kg p.c. obtido no estudo corresponde ao LOAEL. Entretanto, a APVMA (2009) utilizou o LOAEL com um fator extra de segurança (10 vezes) para determinação da dose de referência humana.

A RDC nº 294/2019 é clara ao estabelecer que o registro de agrotóxicos que se enquadrem em proibitivos de registro apenas pode ocorrer quando é possível determinar um limiar adequado para prosseguir com as demais etapas da avaliação de risco. Aqui, cabe esclarecer que o LOAEL não pode ser considerado um limiar adequado. Pelo contrário, esse valor corresponde à menor dose em que o efeito adverso, no caso aneuploidia, foi observado. Logo, é desconhecida a dose sem efeito mutagênico para o CBZ. Para reduzir o risco dessa incerteza, a APVMA (2009) optou por adicionar um fator extra de segurança, estipulando um AOEL de 5 mg/kg p.c.. Porém, este valor não é baseado em dados de estudos específicos com CBZ, tratando-se de um valor arbitrado pela Agência.

Portanto, a CREA V conclui que a dose de 50 mg/kg p.c. (Matsuo et al., 1999) não pode ser utilizada como um limiar adequado para derivar doses de referência suficientemente protetivas para a saúde da população humana, conforme requerido pela RDC nº 294/2019. Vale ressaltar ainda que uma série de estudos evidenciou a ocorrência de efeitos reprodutivos em doses inferiores ao suposto limiar de 50 mg/kg p.c.. Breslin e colaboradores (2013) relataram vários danos histopatológicos testiculares e epididimários em ratos, causados pela administração oral de 20 mg/kg por 2 ou 7 dias. Essas alterações, com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração, incluíram: nos testículos – dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli; e nos epidídimos – edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares. Pacheco e colaboradores (2012) também relataram alterações morfológicas em espermátides de ratos, após exposição a doses subcrônicas (50 mg/kg p.c./dia) de CBZ. Rajeswary e colaboradores (2007) relataram redução significativa no peso testicular, no nível de testosterona sérica e na atividade das enzimas esteroidogênicas e antioxidantes, após administração de CBZ via gavagem (25 mg/kg p.c./dia) por 48 dias. Esse estudo demonstrou que baixas doses diárias subcrônicas de CBZ causam toxicidade direta às células de Leydig e que esses efeitos devem decorrer da ação tóxica direta desse IA no testículo (redução no número de células, na síntese/secreção, na responsividade ao LH ou inibição da esteroidogênese). Já no estudo de Dere e colaboradores (2016), foram demonstradas alterações histopatológicas testiculares (dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides) em ratos, após exposição subcrônica via oral a baixas doses (30 e 50 mg/kg p.c./dia), nas quais, apesar da ausência de significância estatística, foi observado um efeito dose-dependente. Adicionalmente, foram evidenciadas alterações nos parâmetros espermáticos e interrupção da espermatogênese, após exposição oral de camundongos a baixas doses (0,1 a 10 mg/kg p.c./dia) por 5 semanas (Liu et al., 2019 e 2020). Ou seja, esse conjunto de estudos indica que o CBZ afeta a espermatogênese em baixos níveis de dose, inferiores a 50 mg/kg p.c..

Adicionalmente, Nakai e colaboradores publicaram uma série de estudos investigando os mecanismos subjacentes à toxicidade reprodutiva induzida por CBZ (1993, 1994, 1995, 1997a, 1997b, 1998a, 1998b, 2002). Segundo o grupo, após doses baixas a moderadas, o efeito primário do CBZ é no testículo, onde ocorre descamação de células germinativas dependente do estágio da espermatogênese. Tal descamação é causada pela interferência do CBZ nos microtúbulos e filamentos intermediários das células de Sertoli, mecanismo também relacionado ao seu potencial aneugênico nos espermatócitos. Adicionalmente, também foram observados efeitos adversos nas células germinativas, com desenvolvimento anormal da cabeça de espermátides.

Conforme discutido acima, a ocorrência de alguns efeitos adversos depende do estágio da espermatogênese no qual o CBZ é administrado. A alfa-tubulina e os filamentos intermediários são afetados nos mesmos estágios em que ocorre a descamação, com redução de alfa-tubulina e colapso dos filamentos intermediários, o que leva à perda de ancoragem das células germinativas e consequente descamação. O CBZ também afetou o processo espermatogênico, causando necrose de células em divisão celular (tanto meiose quanto mitose) e impedindo os espermatócitos de completar a segunda divisão meiótica, demonstrando claramente seu potencial aneugênico. Também foi relatada a ocorrência de megaespermátides (células diplóides resultantes de divisões meióticas anormais), cuja formação está associada à indução de aneuploidia pelo CBZ (Hess & Nakai, 2000).

Outros estudos avaliados, apesar de terem empregado doses mais altas, contribuíram para o entendimento do mecanismo de indução da toxicidade reprodutiva associada à exposição ao CBZ, o qual está sabidamente relacionado à atividade aneugênica desse composto. No estudo de Jeffay e colaboradores (1996), por exemplo, demonstrou-se que o CBZ, administrado a fêmeas de hamster sírio em dose única via gavagem (1.000 mg/kg), induziu aneuploidia em ovócitos durante sua maturação; além de uma série de efeitos que, segundo os autores, foram decorrentes de toxicidade direta aos ovócitos, e não de alteração endócrina na ovulação, uma vez que o número de ovócitos ovulados foi semelhante entre animais tratados e controle. Similarmente, o CBZ não afetou a taxa de fertilização de ovócitos e, portanto, não promoveu danos na função espermática ou na fertilização em si. Os efeitos observados foram atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação, além de uma série de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização, as quais foram consideradas resultantes do mecanismo de ação do CBZ no processo de montagem dos microtúbulos. Assim, os autores concluíram, a partir desse conjunto de dados, que os ovócitos parecem ser mais sensíveis aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (proestro), quando ocorre sua maturação meiótica (Jeffay, 1996).

Cabe mencionar que Marchetti e colaboradores (2016) não apresentaram um detalhamento aprofundado sobre limiar para este AOP, já que não há modelos computacionais preditivos do risco de aneuploidia na prole. Foi sugerida a hipótese de ocorrência de limiar em camundongos para uma das substâncias aneugênicas estudadas, a Colchicina. Entretanto, no referido estudo foi encontrada uma dose sem efeito adverso (0,1 mg/kg) bem inferior ao valor dos estudos com o CBZ (50 mg/kg). Marchetti e colaboradores (2016) não discutiram a possibilidade de determinar uma dose segura para humanos, mas relataram preocupação com relação à maior susceptibilidade humana à aneuploidia.

Desse modo, verifica-se que há evidências suficientes de que o CBZ é um composto aneugênico, mas, não há evidência que permita estimar uma dose segura em que

não se espera dano cromossômico às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível derivar um limiar de dose adequado, capaz de impedir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ.

5.2 Determinação de limiar para efeitos aneugênicos em células germinativas humanas

Pacchierotti e colaboradores (2019), em documento reunindo evidências científicas e considerações de vários especialistas sobre a avaliação do risco de substâncias aneugênicas para a saúde humana, enaltecem a importância de proteger a população humana da exposição a químicos que induzem aneuploidia em células germinativas e que são diretamente associados a desfechos reprodutivos. Houve consenso unânime quanto ao fato de os aneugênicos afetarem as células germinativas, seu mecanismo de ação e seu papel nas doenças hereditárias. Foram verificadas 24 substâncias com fortes e suficientes evidências de aneugenicidade em células germinativas. Dentre essas substâncias, foram incluídos o CBZ e o Benomil, considerados substâncias com suficiente evidência de causar aneuploidia e interação com microtúbulos, inclusive em ovócitos.

A exposição de células germinativas a substâncias aneugênicas leva à concepção aneuplóide, com a frequência de aneuploidia sendo similar em células germinativas e zigotos (Pacchierotti et al., 2019).

Embora seja evidente que o CBZ cause aneuploidia por inibir a formação de fuso mitótico, tanto em célula somática quanto germinativa, não está caracterizada a diferença na sensibilidade entre esses dois tipos celulares (Kirsch-Volders et al. 2003). A caracterização do dano às células germinativas é especialmente preocupante, pois já se verifica dano relevante nessas células (espermatídes) em doses inferiores àquelas observadas nos estudos de mutagenicidade com células de medula óssea (Matsuo et al., 1999), mesmo com baixas concentrações testiculares de CBZ (EFSA, 2009; USEPA, 2020). Ainda, estudos demonstraram a ação deletéria do CBZ, com perdas precoces de embriões (Zuelke & Perreault, 1995; Jeffay et al., 1996; Parecer REPROTOX). Ou seja, Kirsch-Volders e colaboradores (2003) levantam a preocupação de que as células germinativas possam ser mais susceptíveis aos efeitos do CBZ do que as células somáticas.

Além disso, as evidências em animais indicam que os oócitos são ainda mais susceptíveis às substâncias aneugênicas, quando comparados aos espermatozoides e às células somáticas, pois essas células possuem mecanismos distintos de formação e organização do fuso durante a divisão meiótica (Kirsch-Volders et al., 2003; Pacchierotti et al., 2019). Ainda, há diferenças entre esses dois tipos celulares no ponto de checagem da formação do fuso, com os mecanismos de verificação do não-alinhamento de cromossomos pela célula sendo menos efetivos na oogênese do que na espermatogênese ou na mitose (Kirsch-Volders et al. 2003; Pacchierotti et al., 2019). Isso, em conjunto com outros aspectos únicos da oogênese, pode contribuir para uma maior susceptibilidade a erros de segregação cromossômica na meiose, o que explica a alta taxa de aneuploidia em ovócitos humanos e embriões pré-implantados e o maior risco para falhas de implantação, abortos espontâneos e trissomias (Kirsch-Volders et al. 2003).

5.2.1 Ovócitos possuem mecanismos específicos de formação de fuso mitótico

Em células somáticas e espermatozoides, a formação do fuso meiótico é controlada por um par de centrossomos (centríolos e proteínas) que replicam de forma coordenada com o ciclo celular. Após a duplicação do centrossomo, eles se movem para polos opostos do núcleo e controlam a formação do fuso mitótico (Mogessie et al. 2018; Pacchierotti et al., 2019).

Contudo, nos ovócitos de várias espécies, inclusive camundongos e humanos, os centríolos são eliminados antes da fertilização, não havendo centrossomos para a divisão celular (Mogessie et al. 2018). Então, nesses casos, a formação do fuso meiótico é controlada pelos centros de organização de microtúbulos, que não possuem centríolos (Pacchierotti et al., 2019). Esses centros de organização, presentes em camundongos, servem como o principal sítio de nucleação dos microtúbulos, em substituição aos centrossomos (Mogessie et al. 2018), e passam por processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos quando da ruptura do envelope nuclear. Eles são fragmentados e distribuídos em pequenos centros, até que gradualmente se agregam nos dois polos opostos, transformando a estrutura intermediária multipolar em bipolar (Mogessie et al. 2018). Assim, durante as fases iniciais de formação dos fusos, mais de 80 centros são formados e, progressivamente, eles se associam em poucos centros ao redor dos cromossomos, controlando a formação dos fusos. Esses processos de coalescência de pequenos centros com maiores centros é dinâmico e ocorre em ondas de descondensação e fragmentação, o que contribui para uma distribuição igualitária entre os dois polos (Pacchierotti et al., 2019).

Entretanto, humanos não possuem esses centros e a nucleação dos microtúbulos é dependente dos cromossomos, ou seja, os próprios cromossomos têm um papel importante na formação do fuso meiótico (Mogessie et al. 2018). A formação dos fusos em humanos é, então, distinta, mais longa (15 horas) e com maior instabilidade no fuso (Pacchierotti et al., 2019). Na divisão celular, primeiramente os cromossomos são agregados e, muitas horas depois, os microtúbulos começam a nucleação de dentro desse agregado, a partir dos cinetócoros, continuando a se expandir por várias horas (Mogessie et al. 2018). À medida que o fuso se forma, ele passa por reorganização, fragmentando-se em fusos intermediários multipolares instáveis que, então, se fundem em dois polos, alinhando os cromossomos em posição central (Mogessie et al. 2018). Durante esse processo, a actina se associa de forma constante à tubulina nos polos do fuso, indicando comunicação direta com os microtúbulos e participação na formação de fusos bipolares funcionais (Roeles & Tsiavaliari, 2019). Há, portanto, interdependência entre esses dois sistemas.

Essa instabilidade nos fusos mitóticos de ovócitos humanos é corroborada pela fragmentação do fuso em multipolos, induzida pelo Nocodazol, uma substância aneugênica. Isso ocorre porque a desestabilização dos microtúbulos pelo Nocodazol causa gradual redução da actina no fuso, levando à perda da sua organização bipolar. Desse modo, os microtúbulos ditam a organização espaço-temporal da actina, pois o comprometimento da sua estrutura afeta a função da actina de organização do fuso e, conseqüentemente, uma correta segregação cromossômica.

Durante esse processo de formação e organização do fuso, frequentemente, os cromossomos são incorretamente ligados aos polos dos fusos. Em muitas espécies, os cinetócoros são fundidos, facilitando a ligação aos fusos de um mesmo polo. Porém, em humanos, os cinetócoros das cromátides-irmãs são divididos e interagem com os microtúbulos como unidades separadas, o que prejudica essa interação. Ainda, cabe destacar que o grau de

separação dos cinetócoros em humanos aumenta com o envelhecimento (Mogessie et al. 2018).

Essa interação microtúbulo-cinetócoro mais frágil, somada à instabilidade da fase multipolar, resulta em ovócitos humanos com uma susceptibilidade muito aumentada em relação a ovócitos murinos, quanto à incidência de aneuploidias (Mogessie et al., 2018; Pacchierotti et al., 2019).

Um estudo feito com Benzo(a)pireno, outra substância aneugênica, mostrou claramente a indução de anormalidades na organização do fuso e o mal alinhamento dos cromossomos, levando ao comprometimento da interação entre microtúbulo e cinetócoro, com indução de aneuploidia nos ovócitos durante a sua maturação (Zhang et al., 2018). A segregação correta dos cromossomos depende do estabelecimento das interações físicas e bioquímicas entre os microtúbulos e os cinetócoros e utiliza a energia da polimerização/despolimerização dos microtúbulos para a separação (Zhang et al., 2018).

Tendo em vista que os microtúbulos são os principais componentes do fuso, a manutenção de uma dinâmica adequada dessas estruturas é essencial para a correta formação e funcionamento do fuso mitótico. Logo, substâncias que interferem com esses processos, como o CBZ, podem ter um impacto negativo relevante na segregação cromossômica, especialmente em ovócitos, sendo, portanto, as mais comuns e potentes indutoras de aneuploidia em células germinativas (Pacchierotti et al., 2019).

5.2.2 Ovócitos possuem uma menor sensibilidade no ponto de checagem de formação de fuso

Em células somáticas, o ponto de checagem da formação de fuso (SAC) monitora a associação correta dos cromossomos aos fusos mitóticos (Pacchierotti et al., 2019). É um mecanismo de vigilância que suspende a divisão celular na metáfase na ocorrência de cromossomos não ligados e de acúmulo de componentes de sinalização, como a proteína Mad2, no cinetócoro. Esse sistema de checagem ocorre tanto em espermatócitos quanto em ovócitos, mas existem diferenças específicas entre essas células capazes de promover respostas diferenciadas a aneugênicos (Vogt et al., 2008).

Verificou-se que altas concentrações de Etoposida, uma substância aneugênica, inibem o progresso da divisão celular em ovócitos. Porém, em baixas concentrações, o mesmo efeito não é observado e a célula não entra em arrasto para o correto reparo. Ou seja, há uma resposta inadequada ao dano no DNA, em razão dessa menor sensibilidade dos ovócitos a danos, com ativação do sistema de reparo apenas acima de determinada concentração de aneugênico (Marangos and Carroll, 2012). Então, o SAC meiótico, especialmente em ovócitos, é incapaz de prevenir a transição para a anáfase na presença de poucos erros cromossômicos.

Essa diferença na resposta dos ovócitos pode ser decorrente do seu maior volume, o que requer vários cromossomos bivalentes mal alinhados para desencadear um sinal suficientemente forte, capaz de manter a checagem ativa e provocar arrasto na meiose (Pacchierotti et al., 2019).

Outros estudos também esclareceram a sensibilidade dos ovócitos aos danos de DNA. Embora camundongos sejam responsivos a quebras duplas de DNA, eles parecem ser insensíveis a ligação cruzada causada pela Mitomicina C, também aneugênica (Yeen et al.,

2012). Os ovócitos tratados com Mitomicina C podem entrar em meiose e progredir na divisão, levando a embriões severamente comprometidos. Ou seja, nesse caso não há sistema de reparo específico para esse tipo de dano. Os erros não reparados podem passar para o embrião mesmo quando se observa certo arrasto celular, dando origem a embriões com pró-núcleo ou múltiplos micronúcleos (Ma et al., 2013).

Também foi evidenciado que a heterozigose em algumas das proteínas do SAC (Mad2 e Bub1) é suficiente para aumentar a incidência de aneuploidia em ovócitos, mas não em espermatozóitos. Logo, a redução da expressão gênica de componentes do SAC pode agir sinergicamente com a disfunção do fuso e de outras organelas, e com a perda de coesão entre as cromátides-irmãs, predispondo ainda mais os ovócitos a erros de segregação e afetando consideravelmente a relação dose-resposta.

Como os componentes do SAC precisam ser recrutados para os fusos e cinetócoros dos cromossomos em meiose, o tempo necessário para esse recrutamento, em quantidades suficientes, é crítico. Logo, a perda de componentes na organização celular, bem como a polarização e a despolimerização transitórias de microtúbulos do fuso, decorrentes da exposição a aneugênicos, é um problema. Um descompasso também resultará em uma maior taxa de erro meiótico em ovócitos dos que em espermatozóitos, já que estes são menores e conectados por pontes citoplasmáticas (Vogt et al., 2008). Ainda, a formação de interações estáveis cinetócoro-microtúbulo em ovócitos é estabelecida apenas na meiose I tardia. Ou seja, há uma perda de sensibilidade na resposta dos ovócitos, o que contribui para a alta taxa de erros na meiose I em fêmeas (Vogt et al., 2008). Portanto, esse conjunto de características dos ovócitos torna a ação de substâncias aneugênicas ainda mais preocupante em fêmeas.

5.2.3 Ovócitos são mais susceptíveis ao envelhecimento

Ovócitos de mamíferos são particularmente expostos a danos de DNA. Antes da sua maturação, durante o período de dormência, podem ser acumulados danos ao DNA, com prejuízo da função do ovócito e da integridade genética (Coticchio et al., 2015). Ainda, a redução na expressão de proteínas do SAC, a disfunção na formação e organização dos fusos meióticos e a perda de coesão entre cromátides são eventos sabidamente prejudicados com o envelhecimento dos ovócitos, o que resulta no aumento de erros de segregação cromossômica em mulheres (Vogt et al., 2008).

Anormalidades nos fusos mitóticos também são aumentadas com o envelhecimento materno, o que não é tão proeminente em ovócitos de espécies com curto período reprodutivo, como camundongos (Vogt et al., 2008). Distúrbios na função do fuso devem agir sinergicamente com defeitos no SAC para geração dos erros meióticos, particularmente quando a exposição a aneugênicos interfere nesse processo. Então, com o processo de envelhecimento e o consequente comprometimento do SAC, baixas concentrações de substâncias aneugênicas já podem aumentar as não-disjunções, pois, nessas condições, o SAC não poderia prevenir a progressão para anáfase, o que resultaria em efeitos mais severos. Comparativamente, isso não seria esperado em espermatozóides, já que a meiose não é interrompida e não há envelhecimento dessas células. Aproximadamente 20% das concepções em humanos possuem anormalidade cromossômica e a maior parte dos erros são de origem materna. Mesmo em camundongos, a taxa de erro também é substancialmente

maior na ovogênese do que na espermatogênese e depende da idade materna. Em humanos, são principalmente erros na meiose I que levam às aneuploidias (Vogtt et al., 2008).

5.2.4 Conclusão sobre a determinação de limiar para substâncias aneugênicas em células germinativas

A discussão feita até o momento esclarece que as diferenças na susceptibilidade da espécie, da meiose, do sexo e da expressão gênica são fatores relevantes capazes de influenciar a dose em que o CBZ desencadeia mutações do tipo aberrações cromossômicas numéricas em humanos. Há evidência suficiente mostrando que doses obtidas de estudos com células somáticas ou células germinativas masculinas não podem ser extrapoladas para ovócitos, que podem ser muito mais susceptíveis à aneugênese. Ainda, embora os mecanismos de indução de aneuploidia sejam bastante conservados em mamíferos, há diferenças importantes entre humanos e roedores que resultam na clara observação de uma maior incidência de aneuploidia espontânea e de uma maior susceptibilidade com o aumento da idade em humanos (Pacchierotti et al., 2019). Diante da tendência da população humana de reprodução em idades mais avançadas, é relevante considerar as consequências do envelhecimento na susceptibilidade dos ovócitos humanos à indução de erros meióticos por aneugênicos (Vogt et al., 2008). Também não se pode desconsiderar polimorfismos na população em genes que participam da dinâmica de divisão celular dos ovócitos. Ou seja, dada a alta susceptibilidade a aneuploidia, característica de ovócitos, e os inúmeros fatores que podem aumentar ainda mais essa susceptibilidade, a CREA não considera adequada e segura a determinação de limiares de doses para substâncias aneugênicas.

Pacchierotti e colaboradores (2019) apresentam dados bastante preocupantes sobre a consequência da aneugênese em humanos: a aneuploidia durante a meiose de células germinativas é a principal causa de abortos espontâneos e é a anormalidade cromossômica mais observada no nascimento. Cerca de 0,3% dos neonatos são aneuplóides e se estima que 10-30% de todas as concepções e mais do que 50% das pré-implantações possuam anormalidades numéricas.

A aneuploidia em célula germinativa, por si só, pode ser considerada um efeito adverso, pois a fertilização de um gameta aneuplóide leva a um conceito aneuplóide, além de causar infertilidade e perda embrionária pré- e pós-implantação. Ainda, é associada a malformações congênitas, retardo mental, morbidade e mortalidade da prole. Os dados disponíveis atualmente mostram que é baixa ou inexistente a seleção contra gametas aneuplóides durante a fertilização. Portanto, espera-se um aumento de conceitos aneuplóides quando há indução de gametas aneuplóides (Pacchierotti et al., 2019). Na maioria das vezes, haverá morte do conceito no útero. Apenas aneuploidia e trissomias específicas são compatíveis com a vida, as quais têm muita gravidade em humanos, como: Síndrome de Down (trissomia 21), Síndrome de Patau (trissomia 13), Síndrome de Klinefelter (47, XXY), Síndrome de Edward (trissomia 18) e Síndrome de Turner (45, X0). Ou seja, toda aneuploidia viável resulta em substancial dano ao desenvolvimento neurológico ou reprodutivo, com significativo impacto emocional, social, financeiro e à saúde.

6. CONCLUSÃO

Com base na avaliação do peso das evidências disponíveis – estudos regulatórios apresentados pela FT, estudos da literatura científica selecionados na revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais – conclui-se que: 1) o CBZ não provoca danos diretos ao DNA ou mutações pontuais, exceto na presença de impurezas com relevância toxicológica, as quais devem ter suas concentrações limitadas a 0,0006 g/kg (DAP) e 0,0005 g/kg (AHP) nos produtos registrados no Brasil; 2) o CBZ não causa aberrações estruturais, mas induz aberrações cromossômicas numéricas em células somáticas e germinativas de mamíferos, sendo considerado um agente aneugênico; 3) o CBZ se enquadra quanto à mutagenicidade na Categoria 1B: Produto que presumidamente induz mutações em células germinativas de seres humanos. Ainda, a partir do conjunto de dados de mutagenicidade, associado aos estudos mecanísticos e de toxicidade reprodutiva também analisados, conclui-se que não há evidência que permita estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos. Isto é, não é possível definir um limiar de dose adequado, capaz de impedir a ocorrência dos efeitos aneugênicos induzidos pelo CBZ.

Cabe ressaltar que a conclusão de que o Carbendazim é uma substância aneugênica está alinhada à conclusão de todas as autoridades regulatórias consultadas, conforme pode ser observado no Quadro 8.

Quadro 8. Conclusões das principais autoridades internacionais sobre a mutagenicidade do Carbendazim.			
Autoridade Regulatória	Conclusão	Resultados Experimentais	Dose de referência humana
EFSA (2010)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	0,50 mg/kg
JMPR (2005)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	0,50 mg/kg
USEPA (2020)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	Não definida para aneugênese (avaliação de risco de carcinogenicidade não foi por limiar e sim linear, pois considerou que outro mecanismo pode estar agindo para a formação de tumores).
PMRA (2011)	Aneugênico	NOAEL: 50 mg/kg	Não definida para aneugênese (avaliação de risco de carcinogenicidade não foi por limiar e sim linear, pois considerou que outro mecanismo pode estar agindo para a formação de tumores).
APVMA (2009)	Aneugênico	LOAEL: 50 mg/kg	0,05 mg/kg (limiar não experimental, com adoção de fator de extrapolação extra de 10x para cálculo da dose de referência humana).
ANVISA	Aneugênico	LOAEL: 50 mg/kg	Não há dose experimental sem efeito aneugênico que possa ser considerado limiar adequado de acordo com a RDC nº 294/2019. Além disso, há evidências robustas que demonstram maior susceptibilidade dos ovócitos humanos à aneuploidia, em comparação aos espermatozoides e às células somáticas humanas e de roedores. Ainda, espera-se agravamento decorrente do processo de envelhecimento característico desse tipo celular e polimorfismos de subpopulações.

Portanto, considerando a legislação brasileira e com base no acima exposto, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da mutagenicidade, conforme estabelecido na Seção 4, Anexo IV da

RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos que apresentem características mutagênicas e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, K. (Huntingdon Life Sciences). Patrocinador: Sumimoto. Carbendazim mammalian cell mutation assay. Estudo n. SNG 76/963243. SEI 1212651. 1996.

Adler, I., Schmid, T.E., Baumgartner, A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 504, Issues 1–2, Pages 173-182, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00090-8). 2002.

Akbarsha MA, Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Hamid KS. Spermatotoxic effect of carbendazim. Indian J Exp Biol. Sep;39(9):921-4. PMID: 11831377. 2001.

APMVA (2009). Human health risk assessment of Carbendazim. Volume 2. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection.

Barale R., Scapoli C., Meli C., Casini D, Minunni M., Marrazzini A., Loprieno N., Barrai I. Cytogenetic effects of benzimidazoles in mouse bone marrow. Mutation Research, v. 300, p. 15-28. 1993.

Bastelli, K.F.C. (Bioagri). Patrocinador: Nortox. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Technical através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 7848.402.037.12. SEI 1213365. 2012.

Bentley, K.S. (DuPont). Patrocinador: Bayer. Classification of DPX-E965-299 (Carbendazim, MBC)-induced micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes using immunofluorescent antikenetochore antibodies. SEI 1215319. 1992.

Bentley KS, Kirkland D, Murphy M, Marshall R. Evaluation of thresholds for benomyl- and carbendazim-induced aneuploidy in cultured human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization. Mutat Res. 3;464(1):41-51. doi: 10.1016/s1383-5718(99)00165-5. PMID: 10633176. 2000.

Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. Mutat Res. Jun;156(3):199-218. doi: 10.1016/0165-1218(85)90065-5. PMID: 4000178. 1985.

Bowen DE, Whitwell JH, Lillford L, Henderson D, Kidd D, Mc Garry S, Pearce G, Beevers C, Kirkland DJ; Work conducted at Covance Laboratories Ltd., Harrogate. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test. Mutat Res. 722(1):7-19. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.02.009. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21356328. 2011.

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ) following short-term repeat dosing in the male rat. Birth Defects Res B Dev

Reprod Toxicol. Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Can A, Albertini DF. M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. *Mutat Res.* Jan 3;373(1):139-51. doi: 10.1016/s0027-5107(96)00184-4. PMID: 9015162. 1997a.

Can A, Albertini DF. Stage specific effects of carbendazim (MBC) on meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 46(3):351-62. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<351::AID-MRD14>3.0.CO;2-1. PMID: 9041138. 1997b.

Coffing S., Engel M., Dickinson D., Thiffeault C., Spellman R., Shutsky T., Schuler M. The Rat Gut Micronucleus Assay: A Good Choice for Alternative In Vivo Genetic Toxicology Testing Strategies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 52, p. 269-279. 2011.

Correa LM, Miller MG. Microtubule depolymerization in rat seminiferous epithelium is associated with diminished tyrosination of alpha-tubulin. *Biol Reprod.* 64(6):1644-52. doi: 10.1095/biolreprod64.6.1644. PMID: 11369590. 2001.

Correa, L., Nakai, M., Strandgaard, C., Hess, R., Miller, M.. Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology.* 69. 175-82. 10.1093/toxsci/69.1.175. 2002.

Costa, K C. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Evaluation of the Mutagenic Potential of the Test Substance CARBENDAZIM TÉCNICO by Micronucleus Assay in Mice. Estudo n. 0860.402.053.01. SEI 1148274. 2001.

Costa, K. C. (Bioagri). Patrocinador: Ourofino. Avaliação do potencial mutagênico dda substância teste Carbendazim Técnico Ouro Fino através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 6695.402.510.08. SEI 1212712. 2008.

Costa, K. C. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Avaliação do potencial mutagênico dda substância teste Carbendazim Técnico Biorisk (BK009) através do teste de micronúcleo em camundongos. Estudo n. 5504.402.537.08. SEI 1148278. 2009.

Coticchio G., Dal Canto M.B., Renzini M.M., Guglielmo M.C., Brambillasca F., Turchi D., Novara P.V., Fadini R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproductive Update*, V. o, N. 0, p. 1-28. 2015.

de Stoppelaar, J.M., Kuil, T., Bedaf, M., Verharen, H.W., Slob, W., Mohn, G.R., Hoebee, B., Benthem, J.. Increased frequencies of diploid sperm detected by multicolour FISH after treatment of rats with carbendazim without micronucleus induction in peripheral blood erythrocytes, *Mutagenesis*, Volume 14, Issue 6, November, Pages 621–632, <https://doi.org/10.1093/mutage/14.6.621>. 1999.

de Stoppelaar JM, van de Kuil T, Verharen HW, Hokse H, Opperhuizen A, Mohn GR, van Benthem J, Hoebee B. In vivo cytokinesis blocked micronucleus assay with carbendazim in rat fibroblasts and comparison with in vitro assays. *Mutagenesis.* 15(2):155-64. doi: 10.1093/mutage/15.2.155. PMID: 10719042. 2000.

Đikić D, Mojsović-Cuić A, Cupor I, Benković V, Horvat-Knezević A, Lisicić D, Orsolčić N. Carbendazim combined with imazalil or cypermethrin potentiate DNA damage in hepatocytes

of mice. *Hum Exp Toxicol*. May;31(5):492-505. doi: 10.1177/0960327111417910. Epub 2011 Aug 25. PMID: 21868589. 2012.

ECHA. European Chemicals Agency. Guidance for Human Health Risk Assessment for Biocidal Active Substances and Biocidal Products. Guidance on the BPR: Volume III Assessment & Evaluation (Parts B+C) Version 2.1. ECHA-13-G-18-EN. February, 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. Draft Re-Assessment Report. Carbendazim. Volume 1. 2009a.

EFSA. European Food Safety Authority. Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim. *EFSA Journal* 2010; 8(5):1598. 2010.

Elhajouji, A., Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M.. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*. 26(4):292-304. doi: 10.1002/em.2850260405. PMID: 8575418. 1995.

Elhajouji, A., Tibaldi, F., Kirsch-Volders, M.. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, *Mutagenesis*, Volume 12, Issue 3, Pages 133–140, <https://doi.org/10.1093/mutage/12.3.133>. 1997.

Elhajouji A., Monica C., Micheline K., Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay, *Mutagenesis*, Volume 13, Issue 2, Pages 193–198, <https://doi.org/10.1093/mutage/13.2.193>. 1998.

Ermler S., Scholze M., Kortenkamp A. Seven benzimidazole pesticides combined at sub-threshold levels induce micronuclei *in vitro*. *Mutagenesis*, vol. 28, n. 4, p. 417-426. 2013.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry. *J Toxicol Environ Health*. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

Hashem MA, Mohamed WAM, Attia ESM. Assessment of protective potential of *Nigella sativa* oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Jan;25(2):1270-1282. doi: 10.1007/s11356-017-0542-9. PMID: 29086361. 2017.

Hess R.A.; Nakai M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histology and Histopathology*, v. 15, p. 207-224. 2000.

Igarashi M, Setoguchi M, Takada S, Itoh S., Furuhashi K. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice. *Mutation Research*, v. 632, p. 89-98. 2007.

Innvitro. Relatório de Reavaliação do Ingrediente Ativo Carbendazim – Genotoxicidade. 2020. SEI n. 1211884.

Itoh S., Hattori C., Nagata M., Takasaki, W. Gender differences in the liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy, *Toxicology Letters*, Volume 214, Issue 3, Pages 296-300, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.003>. 2012a.

Itoh S., Hattori C., Nagata M., Sanbuissho, A. Structural and numerical chromosome aberration inducers in liver micronucleus test in rats with partial hepatectomy. *Environmental Mutagenesis*, v. 747, p. 98-103. 2012b.

Itoh S., Igarashi, M., Nagata M., Hattori C. Assessment of a twice dosing regimen both before and after partial hepatectomy in the rat liver micronucleus test. *Mutation Research*, v. 782, p.18-23. 2015a.

Itoh S, Nagata M, Hattori C, Takasaki W. Effect of buprenorphine on genotoxicity evaluation of chemicals by the rat liver micronucleus test with partial hepatectomy. *J Toxicol Sci*. 2015 Feb;40(1):109-14. doi: 10.2131/jts.40.109. PMID: 25743750. 2015b.

Jeffay, S.C., Libbus, B.L., Barbee, R.R., Perreault, S.D. Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation, *Reproductive Toxicology*, Volume 10, Issue 3, Pages 183-189, ISSN 0890-6238, [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00020-2](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00020-2). 1996.

JPMR/FAO (2005). CARBENDAZIM 87–106 JPMR 2005.

Kirsch-Volders M., Vanhauwaerta A., Eichenlaub-Ritter U., Decordier I. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p. 63-74. 2003.

Lebailly P., Vigreux C., Godard T., Sichel F., Bar E., LeTalaer J.Y., Henry-Amar M., Gauduchon P. Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (Carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research*, v. 375, p. 205-217. 1997.

Lim J., Miller M.G. Role of testis Exposure Levels in the Insensitivity of Prepubertal Rats to Carbendazim-Induced Testicular Toxicity. *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 37, p. 158-167. 1997a.

Lim J., Miller MG. The Role of the Benomyl Metabolite Carbendazim in Benomyl-Induced Testicular Toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 142, Issue 2, Pages 401-410, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8042>. 1997b.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation. *Ecotoxicol Environ Saf*. 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Marchetti F., Massarottii A., Yauk C.L., Pacchierotti F., Russo A. The Adverse Outcome Pathway (AOP) for Chemical Binding to Tubulin in Oocytes Leading to Aneuploid Offspring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 57, p. 87-113. 2016.

Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J., Bentley, K.S.. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 372, Issue 2, Pages 233-245, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(96\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(96)00143-1). 1996.

Markelewicz R.J. Jr., Hall S.J, Boekelheide K. 2,5-Hexanedione and Carbendazim Coexposure Synergistically Disrupts Rat Spermatogenesis Despite Opposing Molecular Effects on Microtubules. *Toxicological Sciences*, v. 80, p. 92–100. 2004.

Marion J, L., Lorna J., L. An investigation of some genetic toxicological effects of the fungicide benomyl, *Toxicology*, Volume 17, Issue 1, Pages 83-95, ISSN 0300-483X, [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90030-X](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90030-X). 1980.

Masaaki, N., Rex A, H.. Morphological changes in the rat sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim, *Tissue and Cell*, Volume 26, Issue 6, Pages 917-927, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(94)90041-8). 1994.

Matsuo F., Masaaki N., Nasu T. The Fungicide Carbendazim Induces Meiotic Micronuclei in the Spermatids of the Rat Testis. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n.5, p. 573-576. 1999.

McCarroll N.E.; Protzel A., Ioannou Y., Stack H.F., Jackson M.A., Waters M.DD., Dearfield K.L. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Reviews in Mutation Research*, v. 512, p.1-35. 2002.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Evaluation of the mutagenic potential of the test substance CARBENDAZIM TÉCNICO by reverse mutation assay in *Salmonella typhimurium* (Ames Test). Estudo n. RF-0861.401.013.00. SEI 1148276. 2005.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: Ourofino. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste Carbendazim Técnico Ouro Fino através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 6695.401.501.08. SEI 1212710. 2008.

Miyaji, C. K. (Bioagri). Patrocinador: UPL. Avaliação do potencial muttagênico da substância teste BK 009 (Carbendazim Técnico Biorisk) através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 5504.401.532.08. SEI 1148277. 2009.

Miyaji, C.K. (Bioagri). Patrocinador: Nortox. Avaliação do potencial mutagênico da substância teste CARBENDAZIM TECHNICAL através do teste de mutação gênica reversa em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Teste de Ames). Estudo n. 7848.401.026.12. SEI 1213364. 2012.

Miyuki, I., Mayumi, S., Sanae, T., Satoru, I., Kazuhisa, F.. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 632, Issues 1–2, 2007,

Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.

Mogessie B., Scheffler K., Schuh M. Assembly and Positioning of the Oocyte Meiotic Spindle. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 11, n.9, p. 6.1-6.23. 2018.

Moura, J.W. (Tecam). Patrocinador: Sumimoto. Teste de amesara o produto Carbendazim Agripec Técnico. Estudo n. T07115-00. SEI 1212650. 2000.

Nakai, M., B. Moore and R. Hess. Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis. *The Anatomical Record* 235: n. pag. 1993.

Nakai M, Hess RA, Netsu J, Nasu T. Deformation of the rat Sertoli cell by oral administration of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate). *J Androl.* 16(5):410-6. PMID: 8575980. 1995.

Nakai, M., Hess, R.A., Matsuo, F., Gotoh, Y., Nasu, T. Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats, *Tissue and Cell*, Volume 29, Issue 4, Pages 477-485, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(97\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(97)80033-X). 1997a.

Nakai M, Toshimori K, Yoshinaga K, Nasu T, Hess RA. Spermatids of prepubertal male rats are susceptible to carbendazim during early spermiogenesis. *Arch Histol Cytol.* (5):433-7. doi: 10.1679/aohc.61.433. PMID: 9990427. 1998a.

Nakai, M., Toshimori, K., Yoshinaga, K. et al. Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis. *Cell Tissue Res* 294, 145–152. <https://doi.org/10.1007/s004410051164>. 1998b.

Pacchierotti F, Masumura K, Eastmond D, Elhajouji A, Froetschl R, Kirsch-Volders M, Lynch A, Schuler M, Tweats D, Marchetti F. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases. *Mutation Research*, 2019.

Pisani C, Voisin S, Arafah K, Durand P, Perrard MH, Guichaoua MR, Bulet P, Prat O. Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture. *ALTEX.* 2016;33(4):393-413. doi: 10.14573/altex.1601253. PMID: 27155993. 2016.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Registration Decision. Carbendazim. PRD2011-04. 2011.

Rai B., Mercurio S.D. Environmentally relevant exposures of male mice to carbendazim and thiram cause persistent genotoxicity in male mice. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 10, p. 10629-10641. 2020.

Roeles J., Tsiavaliari G. Actin-microtubule interplay coordinates spindle assembly in human oocytes. *Nature Communications*, v. 10, p 4651. 2019.

Sarrif, A.M., Bentley, K.S., Fu, L., Neil, R.M., Reynolds, V.L., Stahl, R.G.. Evaluation of benomyl and carbendazim in the vivo aneuploidy/micronucleus assay in BDF1 mouse bone marrow, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Volume 310, Issue 1, Pages 143-149, ISSN 0027-5107, [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90018-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90018-3). 1994.

Stammberger, I. (Hoechst). Patrocinator: Bayer. Study of the mutagenic potential in strains of *Salmonella typhimurium* (Ames Test) and *Escherichia coli*. Estudo n. 910785. SEI 1215318. 1992.

Takeshita, K., Ogawa, H.I. & Maeda, T. Structural chromosome aberrations cause swelling of the nucleus. *Genes and Environ* 38, 22. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0047-7>. 2016.

Tates AD. *Microtus oeconomus* (Rodentia), a useful mammal for studying the induction of sex-chromosome nondisjunction and diploid gametes in male germ cells. *Environ Health Perspect.* 31:151-159. doi:10.1289/ehp.7931151. 1979.

Tollstadius B.F., da Silva A.C.G., Pedralli B.C.O., Valadares M.C. Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture. *Toxicology in Vitro*, v. 58, p. 78-85. 2019.

USEPA. United States Environmental Protection Agency, *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*. EPA/630/P-03/001F, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 2005.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim (MBC): Human Health Assessment Scoping Documentt in Support of Registratiion Review.. Memorandum Decision No. 4800779. DP D413079. March 2014.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment. Memorandum Decision No. 452566. DP D452566. March 2020.

Vanhouwaert, A., Vanparys, P., Kirsch-Volders, M.. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage, *Mutagenesis*, Volume 16, Issue 1, Pages 39–50, <https://doi.org/10.1093/mutage/16.1.39>. 2001.

Van Hummelen, P., Elhajouji, A., Kirsch-Volders, M. Clastogenic and aneugenic effects of three benzimidazole derivatives in the in vitro micronucleus test using human lymphocytes, *Mutagenesis*, Volume 10, Issue 1, Pages 23–29, <https://doi.org/10.1093/mutage/10.1.23>. 1995a

Van Hummelen P, Nüsse M, Castelain P, Kirsch-Volders M. Aneugen-induced micronuclei (MN) in human lymphocytes may be discerned using image analysis techniques when cell-cycle stage is taken into account. *Environ Mol Mutagen*. 25(4):269-78. doi: 10.1002/em.2850250402. PMID: 7541751. 1995b

Vargas, M.A.T. (Bioplan). Patrocinador: Adama. The *Salmonella Typhimurium* reverse mutation by Carbendazim Técnico Herbitécica 950. Estudo n. G1.1.1-234/95. SEI 1213037. 1995.

Vargas, M. (Bioplan). Patrocinador: Adama. A micronucleus study in mice for the product Carbendazin Técnico Herbitécnica 950. Estudo n. G124-49/95. SEI. 123038. 1995.

Vigreux C, Poul JM, Deslandes E, Lebailly P, Godard T, Sichel F, Henry-Amar M, Gauduchon P. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells. *Mutat Res*. 419(1-3):79-90. doi: 10.1016/s1383-5718(98)00126-0. PMID: 9804902. 1998.

Vogt E., Kirsch-Volders M., Parry J., Eichenlaub-Ritter U. Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutation Research*, v. 651, p.14-29. 2008.

Winder B.S., Strandgaard C.S., Miller M.G. The Role of GTP Binding and Microtubule-Associated Proteins in the Inhibition of Microtubule Assembly by Carbendazim. *Toxicological Sciences*, v. 59, p. 138-146. 2001.

Yamada T., Sumida K., Saito K., Ueda S., Yabushita S., Sukata T., Kawamura S., Okuno Y., Seki T. Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide Benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 205, p. 11–30. 2005.

Warr JR, Flanagan DJ, Anderson M. Mutants of Chinese hamster ovary cells with altered sensitivity to taxol and benzimidazole carbamates. Cell Biol Int Rep. 6(5):455-60. doi: 10.1016/0309-1651(82)90117-5. PMID: 6124319. 1982.

Zhang M, Miao M, Chen Q, Cai M, Dong W, Dai X, Lu Y, Zhou C, Cui Z, Xiong B. BaP exposure causes oocyte meiotic arrest and fertilization failure to weaken female fertility. The FASEB Journal, v. 32. 2018.

Zuelke K.A.; Perreault, S.D. Carbendazim (MBC) Disrupts Oocyte Spindle Function and Induces Aneuploidy in Hamsters Exposed During Fertilization (Meiosis 11). Molecular Reproduction and Development, v. 42, p. 200-209. 1995.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 09/07/2021, às 20:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 12/07/2021, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1309909** e o código CRC **4A1099B1**.



PARECER Nº 5/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, Gerência-Geral de Toxicologia

Assunto: **Análise do potencial carcinogênico do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia o potencial de carcinogenicidade do Carbendazim para os seres humanos, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicina Veterinária).

CBZ: Carbendazim

CREAV: Coordenação de Reavaliação

EChA: *European Chemicals Agency* (Agência Europeia de Químicos)

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação).

FSCJ: *Food Safety Commission of Japan* (Comissão para Segurança dos Alimentos do Japão)

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo.

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer).

ICAMA: *Institute for the Control of Agrochemicals, P.R. China* (Instituto para o Controle de Agrotóxicos da República Popular da China).

LOAEL: *Lowest Observed Adverse Effect Level* (Nível mais Baixo de Efeito Adverso Observado).

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível de Efeito Adverso não Observado).

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense).

PoD: *Point of Departure* (Ponto de partida).

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana).

WoE: *Weight of evidence* (peso da evidência).

Resumo

Para avaliação do potencial carcinogênico do Carbendazim (CBZ), foram avaliados 14 estudos que foram enviados pelas empresas registrantes, foram obtidos por uma busca sistematizada de estudos científicos ou foram apresentados nos documentos das agências internacionais envolvidas na regulação de agrotóxicos. Verificou-se que o CBZ está associado ao desenvolvimento de tumores hepáticos em camundongos das linhagens CD-1 e Swiss em doses $\geq 22,5$ mg/kg p.c./dia. Não foi possível estabelecer um NOAEL, pois nas menores doses utilizadas nos estudos foram observados efeitos pré-neoplásicos (22,5 mg/kg p.c./dia) e carcinoma (75 mg/kg p.c./dia). Os estudos com ratos e cães foram negativos para a carcinogenicidade. O modo de ação (MoA) foi estabelecido tendo como evento chave a interação do CBZ com a beta-tubulina, impedindo a polimerização com alfa-tubulina e, consequentemente, a formação dos microtúbulos. Os microtúbulos estão envolvidos em vários processos metabólicos das células. A deficiência na formação dos microtúbulos nos hepatócitos pode levar à citotoxicidade para as células em intérfase e à aneugênese de células filhas, ocasionando reposição celular crônica e o surgimento de alterações cromossômicas. Essas duas condições são mecanismos de carcinogenicidade reconhecidos. A menor capacidade de detoxificação do CBZ pelos camundongos, aliada a uma maior susceptibilidade natural das linhagens com resultados positivos ao desenvolvimento de câncer hepático, comparadas com ratos e cães, pode explicar a ocorrência de tumores apenas nesta espécie. Por outro lado, o MoA do CBZ ocorre em células humanas, não sendo possível descartar a sua ocorrência em humanos. A avaliação do peso das evidências concluiu que há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais sem evidência de carcinogenicidade em seres humanos. Essa conclusão classifica o CBZ como produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos (categoria 1B). Com isso, é necessário o estabelecimento de um limiar de dose para o desfecho carcinogenicidade. A aneugênese é conhecidamente um mecanismo que apresenta limiar de dose para células somáticas. O LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia obtido de estudo crônico e de carcinogenicidade em camundongo pela observação de alterações celulares pré-neoplásicas foi escolhido como ponto de partida para a derivação de uma dose de referência humana para carcinogenicidade (limiar de dose). Após aplicação de fator de incerteza de 1000 vezes (foi utilizado um fator adicional de 10x pelo uso do LOAEL), foi definido um limiar de dose de 0,0225 mg/kg p.c./dia. Este valor de limiar é suficientemente baixo para o mecanismo de aneugênese do CBZ, pois baseia-se na observação de efeitos ainda não considerados carcinogênicos e o LOAEL encontrado para efeito aneugênico em células somáticas foi de 62,5 mg/kg p.c em estudo com ratos.

1. RELATÓRIO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial carcinogênico do ingrediente ativo Carbendazim (CBZ), a partir do conjunto de evidências – *in vitro* e *in vivo* – relevantes disponíveis, quais sejam: estudos de carcinogenicidade e estudos mecanísticos. Foram também considerados relevantes os estudos realizados com o ingrediente ativo Benomil, cujo principal produto de degradação é o CBZ. Todos os estudos aqui discutidos foram obtidos do relatório apresentado pela Força Tarefa (FT) do Carbendazim, dos relatórios das principais agências reguladoras internacionais e da busca sistematizada da literatura científica conduzida pela Coordenação de Reavaliação (CREAV).

A metodologia para obtenção dos estudos e artigos científicos está apresentada no PARECER Nº 7/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA ([1451178](#))

2. AVALIAÇÃO

2.1. Avaliação do potencial de carcinogenicidade do CBZ pelas agências reguladoras de agrotóxicos ou órgãos afins internacionais.

2.1.1. APVMA

A agência australiana avaliou um total de sete estudos de longa duração, sendo dois estudos regulatórios em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 1976), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976). Os detalhes de cada um dos estudos estão apresentados no Quadro 1. A APVMA concluiu que o CBZ induz a proliferação de células hepáticas levando a

adenomas hepatocelulares em camundongos. Porém, avaliou que as linhagens desta espécie que tiveram resultado positivo não são consideradas um modelo adequado para a avaliação da formação de tumores hepáticos em humanos. Além disso, não foram identificadas evidências de interação direta do CBZ com o DNA nos testes de genotoxicidade. Logo, a reavaliação do CBZ pela APVMA (2009 e 2012) concluiu que não há evidências de que este IA seja carcinogênico.

2.1.2. EFSA

A EFSA (2009) avaliou os mesmos estudos de longa duração que a APVMA [dois estudos em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 19796), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubaauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976)] e concluiu que os animais apresentaram tumor no fígado (detalhes no Quadro 2) em dois estudos com camundongos das linhagens CD-1 e Swiss. Porém, por estes animais serem altamente sensíveis a tumor hepático induzido por substâncias exógenas, a EFSA considerou que estes achados não são relevantes para humanos. Assim, concluiu que o CBZ não é carcinogênico para humanos.

2.1.3. Força Tarefa do Carbendazim

A FT do CBZ avaliou sete estudos de exposição crônica ou carcinogenicidade sendo dois estudos em ratos (Sherman, 1972; Til *et al*, 19796), três em camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubaauer *et al*, 1982) e outros dois em cães (Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976). A Força Tarefa concluiu que, embora CBZ possua claro efeito genotóxico, não possui evidências de mecanismo de ação carcinogênico com relevância para humanos. A FT afirmou que foi evidenciado claro efeito hepatotóxico do CBZ nos animais estudados, sendo possível definir um limiar de segurança para este efeito. Sugere que uma ingestão diária aceitável de 0,025 mg/kg/dia pode ser considerada segura para a hepatotoxicidade.

2.1.4. JMPR

A JMPR não avaliou o potencial carcinogênico para o CBZ, descrevendo apenas estudos de toxicidade reprodutiva e mutagenicidade (Pfeil e Dellarco, 2005).

2.1.5. PMRA

A PMRA (2011) concluiu que a exposição ao CBZ produziu tumores no fígado e ovários em camundongos que receberam doses diárias ao longo de sua vida. Os estudos foram negativos em ratos e cães (PMRA, 2011). A PMRA avaliou os seguintes estudos: ratos – Til *et al*, 1976; cães – Sherman, 1972; Reuzel *et al*, 1976; camundongos – Beems *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubaauer *et al*, 1982.

2.1.6. USEPA

A USEPA (USEPA, 2014; USEPA, 2020) avaliou seis estudos, sendo um em ratos (Sherman, 1972), dois em cães (Sherman, 1972; USEPA ID n° 00164304, 1986) e três camundongos (Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubaauer *et al*, 1982). Porém, para camundongos, o estudo de Beens *et al* (1976) foi desconsiderado pela Agência pela grande quantidade de limitações metodológicas. A USEPA classificou o CBZ no grupo C – possível carcinogênico para humanos, com base na presença de adenoma e carcinoma hepatocelular em camundongos CD-1 (Wood *et al*, 1982) e no potencial aneugênico observado em estudos de genotoxicidade.

2.2. Análise do estudo *in vitro*

O estudo de Peyre *et al* (2014), avaliou o papel do CBZ em três fenômenos pro-carcinogênicos: apoptose, desregulação do ciclo celular e transição de células epiteliais para mesenquimais.

Apoptose é a morte celular programada e ocorre, por exemplo, quando células são infectadas, quando há danos irreparáveis ao DNA e quando a célula está sofrendo transformação maligna.

Desregulação do ciclo celular refere-se ao fenômeno relacionado ao descontrole do processo de mitose da célula, característico de células tumorais.

A transição de células epiteliais para mesenquimais é caracterizada pela mudança (ou transição) do fenótipo epitelial para o mesenquimal. Uma mudança para o estado mesenquimal modifica as moléculas de adesão expressas pela célula, permitindo-lhe adotar um comportamento migratório e invasivo. Células tumorais com essa característica promovem a metástase do câncer.

Os autores demonstraram que dois desses três fenômenos foram afetados pelo CBZ e podem estar associados a indução de câncer em células hepáticas.

Primeiramente, o CBZ promoveu a desregulação da via do TGF-por meio da ativação de proteínas Smads e possível ativação da -catenina. Esses dois eventos juntos induzem a transição de células epiteliais para mesenquimais e manutenção da sobrevivência das células tumorais.

Uma segunda observação é que o CBZ promoveu a fosforilação de STAT-3 e de AKT o que evidencia resistência à apoptose. Ainda, o CBZ induziu a atividade da caspase e modulou a expressão de proteínas apoptóticas (XIAP, Bcl-xl, Bax), o que pode estar associado à promoção de apoptose celular. Portanto, os autores afirmam que há fortes evidências bioquímicas *in vitro* para a ocorrência de efeitos celulares pró-carcinogênicos após exposição crônica ao CBZ.

2.3. Análise dos estudos *in vivo*

Nesta análise foram avaliados 13 estudos com animais de laboratório. O Quadro 1 apresenta o resultado da avaliação da Anvisa para cada um desses estudos. Na maior parte dos estudos com estes animais, o fígado foi o órgão-alvo para os efeitos tóxicos da exposição crônica ao CBZ.

Nos estudos com ratos e cães, a Anvisa concluiu que não há evidência de carcinogenicidade.

Três estudos com camundongos foram considerados adequados para inclusão na avaliação do peso das evidências: Beens *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982; Donaubaauer *et al*, 1982.

No estudo de Beems *et al* (1976), doses a partir de 22,5 mg/kg p.c./dia foram capazes de induzir aumento na incidência de alterações celulares pré-neoplásicas (focos celulares em ambos os sexos), apesar de não haver significância estatística nas menores doses, apenas na maior dose (750 mg/kg p.c./dia). Ainda, o CBZ induziu tumores malignos em machos (hepatoblastoma) e nódulos neoplásicos em fêmeas desde a menor dose, mas com significância estatística apenas na maior dose. O hepatoblastoma é um tumor muito raro que, em humanos, acomete recém-nascidos e crianças. A PMRA (2011) também concluiu que em doses $\geq 22,5$ mg/kg p.c./dia causaram lesões pré-neoplásicas e que os tumores malignos apareceram somente na maior dose (750 mg/kg p.c./dia). A EFSA (2009) considerou que a indução de lesões pré-neoplásicas ocorreu em doses ≥ 45 mg/kg p.c./dia e que os tumores surgiram apenas na maior dose. A USEPA (2014) considerou o estudo inadequado por causa limitações metodológicas como ausência de dados históricos, dados microscópicos e dados brutos nos relatórios de patologia para animais individuais, e não havia no estudo a garantia de que as dietas eram analisadas quanto à homogeneidade do composto e estabilidade. Além disso, não houve hematologia ou análise química clínica, nem urinalise e apenas órgãos ou lesões suspeitas de apresentar tumores e fígados (2 seções) foram examinados histologicamente. A FT não encontrou

evidências de carcinogenicidade neste estudo. A Anvisa reconhece a limitação deste estudo como evidência para atribuir propriedades carcinogênicas ao CBZ. No entanto, quando os dados deste estudo são avaliados em conjunto com o estudo de Wood *et al* (1982), descrito abaixo, os resultados devem ser considerados no peso das evidências.

Em Wood *et al* (1982), as agências reguladoras internacionais APVMA, EFSA, PMRA e USEPA relataram aumento do peso relativo do fígado nas doses ≥ 225 mg/kg p.c./dia e presença de carcinoma hepatocelular em doses ≥ 75 mg/kg p.c./dia ($p < 0,05$) nas fêmeas. O teste de tendência apontou clara relação dose-resposta na incidência de carcinoma e neoplasma primário hepatocelular. Nos machos, observou-se hepatotoxicidade a partir de 225 mg/kg p.c./dia e presença de carcinoma hepatocelular na dose de 225 mg/kg p.c./dia ($p = 0,0066$). A dose de 1.125 mg/kg p.c./dia não pode ser testada devido à alta mortalidade no grupo. As agências reguladoras internacionais APVMA, EFSA, PMRA e USEPA concluíram pela presença de efeitos carcinogênicos do CBZ para este estudo (APVMA, 2009; EFSA, 2009; PMRA, 2011; USEPA, 2014; USEPA, 2020). A FT concluiu que apenas na maior dose foi observada a presença de carcinoma hepatocelular. A Anvisa considera que a exposição ao CBZ está associada a ocorrência de carcinoma hepático em machos e fêmeas, indicando potencial carcinogênico.

Para o estudo de Donaubauer *et al* (1982) as agências reguladoras internacionais APVMA (2009), EFSA (2009), PMRA (2011) e USEPA (2014) relataram aumento do peso relativo e hepatotoxicidade em ambos os sexos na maior dose. A EFSA destacou ainda a hipertrofia de hepatócitos centrolobulares e intermediários, com abundante necrose de células isoladas e aumento secundário da atividade mitótica (compensatória), bem como aumento do armazenamento de pigmento nas células de Kupffer. A PMRA observou aumento da incidência (não significativa) de células tumorais granulosa e luteomas nos ovários somente na dose de 34,4/41,9 mg/kg p.c./dia. A APVMA, a EFSA, a USEPA e a FT concluíram pela ausência de sinais de carcinogenicidade. A PMRA concluiu que o estudo apresenta evidências de carcinogenicidade pela exposição ao CBZ. Vale ressaltar que a EFSA e a USEPA consideraram este estudo como evidência limitada e inadequada, respectivamente. A Anvisa considerou este estudo adequado e concluiu pela ausência de efeitos carcinogênicos.

No estudo de Til *et al* (1976), a Anvisa considera que não foram encontradas evidências de carcinogenicidade. APVMA (2009), EFSA (2009) e PMRA (2011) também chegaram à mesma conclusão. Os documentos da USEPA (2014 e 2020) não descrevem a avaliação deste estudo.

Considerando as avaliações de outras agências internacionais de regulação de agrotóxicos e as análises dos estudos regulatórios, a conclusão da avaliação do conjunto dos estudos *in vivo* é que o CBZ está associado ao desenvolvimento de câncer hepático em camundongos. Nos estudos com ratos e cães não foi observado o desenvolvimento de câncer. O fígado foi o órgão alvo com maior toxicidade em todos os animais estudados.

Quadro 1. Avaliação dos estudos crônicos e de carcinogenicidade em animais para o ingrediente ativo Carbendazim.										
ID	Espécie, linhagem e número de animais	Período e via de exposição	Pureza (%)	Doses (mg/kg pc/dia)	Resultados relevantes	NOAEL (mg/kg p.c./dia)	Limitações	Referência	Avaliação Agências internacionais	Conclusão
1	Ratos SD ou Charles River N=288 (36/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	50-70	0,5;25;125/250/500 (dose de 125 foi aumentada para 250 ou 500 após a 20ª semana)	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de sinais de carcinogenicidade; 500 mg/kg p.c./dia: redução de ganho de peso, redução da contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito : atrofia testicular difusa : prostatite. 	-	<ul style="list-style-type: none"> Produto formulado 	Sherman, 1972*	<ul style="list-style-type: none"> APVMA, EFSA, Força Tarefa e USEPA: nenhum efeito carcinogênico; 	Inadequado, pois usou produto formulado.
2	Cães beagle N=32 (4/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	53 e 72,2	2,5; 12,5; 63	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de sinais de carcinogenicidade; 12,4 mg/kg p.c./dia : aumento da ALAT e SAP; um animal apresentou células hepáticas inchadas e vacuoladas e proliferação marginal das triades portais com infiltração celular; 63 mg/kg p.c./dia Redução no ganho de peso; anorexia, mortalidade. : aumento da ALAT e SAP e cirrose 	-	<ul style="list-style-type: none"> Produto formulado; Número de animais é pequeno para se avaliar o desfecho câncer; Métodos estatísticos não foram descritos. 	Sherman, 1972*	<ul style="list-style-type: none"> APVMA, EFSA, Força Tarefa, PMRA e USEPA: nenhum efeito carcinogênico; EFSA: considerou evidência limitada. 	Inadequado, pois usou produto formulado
3	Camundongos Swiss n=166 sendo assim distribuídos: Grupos tratados: A=10 fêmeas + NaNO2 B=10 prenhes +NaNO2 C=machos + NaNO2 D=fêmeas Grupos controle: E= 10 fêmeas + NaNO2 F=78 fêmeas e 38 machos	728 dias, Fêmeas prenhes: apenas durante a prenhez, 2x por semana; Demais grupos ♀/♂: durante a vida, 2x por semana. Oral (gavagem)	Alta	250	<ul style="list-style-type: none"> Linfosarcoma: ♀ prenhes: 2/10 (tratamento +NaNO2): 6/10 ♂: 2/10 Adenoma pulmonar ♀ (tratamento +NaNO2): 1/10 	-	<ul style="list-style-type: none"> Uma única dose testada. Lesões avaliadas apenas no sistema linfático. Partículas virais presentes nas células tumorais. Não comparado com controle histórico. 	Börzsönyi & Csik, 1975.	Não avaliado	Inadequado
4	Camundongos Swiss n = 100 fêmeas prenhes 10 em cada grupo de tratamento e 40 no grupo controle	Durante a prenhez, por 5 dias consecutivos Oral (gavagem)	Alta	500	<ul style="list-style-type: none"> Linfosarcoma na prole: 9/27 tratamento na 1ª semana gestacional 8/15 tratamento na 2ª semana gestacional 7/18 tratamento na 3ª semana gestacional 7/10 tratamento durante toda a gestação 1/256 no controle negativo 	-	<ul style="list-style-type: none"> Tumor avaliado apenas no sistema linfático; Partículas virais presentes nas células tumorais. Tumor foi transferido após filtração em filtros "cell free". Não comparado com controle histórico. 	Börzsönyi <i>et al</i> , 1976.	Não avaliado	Inadequado

5	Camundongos Swiss N=400 (50/sexo/dose)	560 dias Oral (dieta)	99%	22,5; 45 ou 750	<ul style="list-style-type: none"> ≥ 22,5 mg/kg p.c./dia <p>Fígado - lesões pré-neoplásicas: aumento de focos celulares em ambos os sexos com significância estatística apenas na maior dose.</p> <ul style="list-style-type: none"> 750 mg/kg p.c./dia <p>Fígado - lesões neoplásicas: aumento significativo na incidência de hepatoblastoma nos machos e de nódulos neoplásicos nas fêmeas. Aumento significativo do peso relativo.</p>	< 22,5 por observação de alterações celulares pré-neoplásicas (focos celulares)	<ul style="list-style-type: none"> Espaçamento grande entre a dose intermediária e a maior dose ausência de dados históricos; não há informação sobre a comprovação da estabilidade e homogeneidade do composto na dieta foram avaliados histologicamente apenas os órgãos suspeitos de apresentarem tumor. 	Beems <i>et al</i> , 1976.	<ul style="list-style-type: none"> APVMA e Força Tarefa: nenhum efeito carcinogênico; PMRA: evidência de carcinogenicidade dose dependente em ambos os sexos no fígado; EFSA: presença células tumorais, mas considerou a evidência limitada. USEPA: inadequado pelas limitações metodológicas. 	Foram observados aumento de alterações pré-neoplásicas nas doses ≥ 22,5 mg/kg p.c./dia e de tumores hepáticos na dose de 750 mg/kg p.c./dia, indicando potencial carcinogênico
6	Ratos Wistar N= 480 (60/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99%	7,5; 15; 500	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de sinais de carcinogenicidade; 500 mg/kg p.c./dia Redução da hemoglobina em fêmeas; Redução da AST nos machos : aumento do peso na maior dose; 	-	<ul style="list-style-type: none"> Espaçamento grande entre a dose intermediária e a maior dose. 	Til <i>et al</i> , 1976	<ul style="list-style-type: none"> APVMA, EFSA, Força Tarefa e PMRA: nenhum efeito carcinogênico USEPA: não avaliado 	Nenhum efeito carcinogênico.
7	Cães beagle N=32 (4/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99	3,8; 7,5; 50/125 (aumento da dose de 50 para 125 após a semana 33)	<ul style="list-style-type: none"> Ausência de sinais de carcinogenicidade; 125 mg/kg p.c./dia <p>Redução do peso corporal</p> <ul style="list-style-type: none"> aumento da atividade da ALP e aumento do peso relativo : prostatite, sendo que um animal apresentou infiltrados de células inflamatórias mononucleares intersticiais e atrofia dos túbulos. aumento de peso relativo; 	-	<ul style="list-style-type: none"> Não foram apresentados dados analíticos sobre a concentração de CBZ na dieta ou a estabilidade ou homogeneidade das preparações. 	Reuzel <i>et al</i> , 1976*	<ul style="list-style-type: none"> APVMA, EFSA, Força Tarefa e PMRA: nenhum efeito carcinogênico EFSA: considerou evidência limitada USEPA: não avaliado 	Nenhum efeito carcinogênico.
8	Camundongos CD-1 N=640 (80/sexo/dose)	728 dias Oral (dieta)	99%	75;225;1125 (última dose reduzida para 563 após a semana 66 por causa da alta mortalidade)	<ul style="list-style-type: none"> ≥ 75 mg/kg p.c./dia Fígado: necrose, hipertrofia hepatocelular e carcinoma hepatocelular (p<0,05) Teste de tendência apontou clara relação dose-resposta na incidência de carcinoma e neoplasma primário hepatocelular nas fêmeas. ≥225 mg/kg p.c./dia Fígado: aumento peso relativo; hepatotoxicidade carcinoma hepatocelular (p=0,0066). A dose de 1.125 mg/kg p.c./dia para carcinogenicidade devido a alta mortalidade. 	< 75 (observação de carcinoma hepatocelular)	<ul style="list-style-type: none"> Poucos animais foram avaliados na maior dose devido a alta mortalidade, 	Wood <i>et al</i> , 1982*	<ul style="list-style-type: none"> APVMA: carcinoma hepatocelular; EFSA: efeitos tumorigênicos no fígado Força Tarefa: adenoma hepatocelular PMRA: evidência de carcinogenicidade USEPA: tumores hepáticos (carcinoma hepatocelular e adenomas) 	Ocorrência de carcinoma hepático em machos e fêmeas, indicando potencial carcinogênico
9	Camundongos NMRKf N=1.080 (100-120*/sexo/dose). *120 animais no grupo controle e na maior dose.	672 dias	99	7,5; 22,5; 45; 750	<ul style="list-style-type: none"> ≥ 45 mg/kg p.c./dia aumento não significativo na incidência de células tumorais granulosas e luteoma 750 mg/kg p.c./dia : aumento do peso relativo e hepatotoxicidade em ambos os sexos; hipertrofia de hepatócitos centrolobulares e intermediários com abundante necrose de células isoladas e aumento secundário da atividade mitótica (compensatória), bem como aumento do armazenamento de 	-	<ul style="list-style-type: none"> Não há relato da situação de saúde dos animais antes de iniciar o experimento Histopatologia limitada a fígado, pulmão e órgãos com achados patológicos 	Donaubauer <i>et al</i> (1982)*	<ul style="list-style-type: none"> APVMA, EFSA e USEPA: sem evidência de carcinogenicidade PMRA: evidência de carcinogenicidade EFSA: evidência limitada USEPA: evidência inadequada. 	Nenhum efeito carcinogênico.

					pigmento nas células de Kupffer.					
10	Rato Wistar n=80 (10 animais/sexo/dose)	90 dias Oral (dieta?)	98%	16, 32 e 64	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de sinais de carcinogenicidade; • ≥ 16 mg/kg p.c./dia Aumento peso relativo do pulmão, próstata, útero, bexiga e cérebro. <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 32 mg/kg p.c./dia Leucopenia, aumento da bilirrubina sérica	-	<ul style="list-style-type: none"> • Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (90 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade). 	Janardhan et al, 1987	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade
11	Cães n=24 (3 animais/sexo/dose)	90 dias Oral (dieta?)	98%	20, 40 e 80	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 20 mg/kg p.c./dia: • infiltrado celular e lipídico, extensa congestão, inflamação e alterações degenerativas. Hepatotoxicidade grave; • : fibrose e congestão vascular 	-	<ul style="list-style-type: none"> • Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (90 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade). 	Janardhan et al, 1988	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade
12	Ratos Wistar Swiss n=50 (10 por grupo – somente machos) Um grupo exposto apenas ao diluente.	105 dias Oral (dieta?)	98%	150, 300 e 600	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 150 mg/kg p.c./dia <ul style="list-style-type: none"> ○ congestão, infiltrado de células mononucleares e degeneração hidrópica; • Rins: degeneração tubular, fibrose, congestão e infiltração de células mononucleares 	-	<ul style="list-style-type: none"> • Histologia realizada apenas no fígado e rins; • Estudo subcrônico (105 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade). 	Selmanoglu et al, 2001	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade
13	Ratos Wistar Swiss N=50 (10 por grupo – somente machos) Um grupo exposto apenas ao diluente	105 dias Oral (dieta?)	98%	150, 300 e 600	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de sinais de carcinogenicidade; • 150 mg/kg p.c./dia: • : fibrose e edema causado pelo aumento na densidade de fibronectina 	-	<ul style="list-style-type: none"> • Histologia realizada apenas no timo; • Estudo subcrônico (105 dias de observação não é adequado para avaliação de carcinogenicidade). 	Songür et al, 2005.	Não avaliado	Inadequado para avaliação de carcinogenicidade

*Estudos avaliados segundo a descrição detalhada obtida dos documentos de agências reguladoras internacionais a seguir: APVMA (2009), EFSA (2009), PMRA (2011) e USEPA (2014).

2.4. Avaliação dos estudos epidemiológicos

Não foram encontrados estudos epidemiológicos com desenho de estudo analítico para compor esta avaliação.

2.5. Mecanismos de carcinogenicidade relacionados ao CBZ

A IARC (2019) lista dez características chave de substâncias carcinogênicas que podem atuar no desenvolvimento do câncer, a saber:

1. É eletrofílica ou pode ser ativada metabolicamente para substância eletrofílica;
2. É genotóxica;
3. Altera o reparo do DNA ou causa instabilidade genômica;
4. Induz alterações epigenéticas;
5. Induz estresse oxidativo;
6. Induz inflamação crônica;
7. É imunossupressiva;
8. Modula efeitos mediados por receptor;
9. Causa imortalização;
10. Altera a proliferação celular, morte celular ou fornecimento de nutrientes;

O CBZ tem comprovadamente uma ação aneugênica devido a sua propriedade de inibir a formação dos microtúbulos. O mecanismo de ação (MoA) pelo qual o CBZ inibe a formação de microtúbulos nos fungos é a sua propriedade de impedir a ligação da GTP à beta-tubulina (McCarroll et al., 2002). O CBZ parece se ligar na beta-tubulina em um sítio próximo ao sítio de ligação da GTP. Isso faz com que a beta-tubulina sofra uma mudança conformacional que impede que a GTP se ligue ao seu sítio de ligação natural na beta-tubulina (Vela-Corcía, 2018). Sem a ligação da beta-tubulina com a GTP, as tubulinas não vão polimerizar, não havendo, portanto, a formação dos microtúbulos ou a sua formação é interrompida. Esse mecanismo de formação dos microtúbulos é semelhante em toda a cadeia evolutiva dos eucariotos. Portanto, o CBZ atua da mesma maneira nas células dos fungos e dos mamíferos.

Três consequências podem ocorrer nas células somáticas que tem a formação dos microtúbulos prejudicada: 1) as células em intérfase sofrem apoptose, pois sem a adequada formação dos microtúbulos, sua sobrevivência é inviabilizada; 2) as células em mitose darão origem a células filhas com aberrações cromossômicas (efeito aneugênico) que sofrem apoptose (Thomas et al., 2009); 3) as células em mitose darão origem a células filhas com aberrações cromossômicas (efeito aneugênico) capazes de levar à progressão tumoral.

O CBZ é capaz de induzir a formação de micronúcleos em células somáticas de camundongos. O parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909), que avalia o potencial mutagênico do CBZ, avaliou estudos que demonstraram a formação de micronúcleos em hepatócitos de camundongos (após tratamento com CBZ em doses a partir de 62,5 mg/ A EFSA (2009) concluiu que o desenvolvimento de tumores hepáticos nos camundongos é derivado das consequências 1 e 2 descritas acima: o CBZ leva a uma toxicidade celular que resulta na morte da célula. A morte celular crônica e intensa leva à proliferação celular crônica para repor as perdas celulares por apoptose, o que aumenta a probabilidade de surgimento de células tumorais (mecanismo nº 10 da IARC). McCarroll *et al* (2002) apontam como uma das etapas precursoras para a formação de tumor de fígado induzida por CBZ em camundongos a inibição de polimerização da tubulina, interrupção da formação do fuso, segregação imprecisa de cromossomos e atraso e/ou perda de cromossomos nas células do fígado (aneuploidia). A formação do tumor segue como resultado do aumento da hipertrofia celular, proliferação celular e aumento do peso do fígado (mecanismo nº 10). Este mecanismo de progressão tumoral é reafirmado pela PMRA (2011). Porém, este mecanismo, segundo McCarroll *et al* (2002), não explica a ausência de tumores em ratos e cães, que são as outras duas espécies de animais envolvidas em estudos crônicos com o CBZ. A EFSA (2009) argumenta que as linhagens de camundongos CD-1 e Swiss, nas quais os estudos crônicos foram positivos para carcinogenicidade, são muito susceptíveis ao surgimento de tumores hepáticos espontâneos. Portanto, o CBZ induziu o aumento da incidência de tumores hepáticos nas linhagens mais susceptíveis porque causou hepatotoxicidade crônica, com ocorrência de morte celular que levou a um processo degenerativo, cuja regeneração é realizada pelo aumento de proliferação celular. O aumento da taxa de proliferação celular é um mecanismo de carcinogenicidade conhecido (mecanismo nº 10 da IARC). De fato, mesmo em baixas doses, é possível verificar a presença de lesões microscópicas indicativas de hepatotoxicidade e lesões pré-neoplásicas em camundongos das linhagens mais susceptíveis nos estudos com exposição crônica (Beems *et al*, 1976; Wood *et al*, 1982 apud EFSA, 2009). Nos camundongos da linhagem resistente (NMRKf), a hepatotoxicidade está presente macro e microscopicamente, mas apenas na dose mais alta de 750 mg/kg p.c./dia (Donaubauer *et al*, 1982 apud EFSA, 2009). A hepatotoxicidade também foi um efeito relatado em cães (Sherman, 1972 apud EFSA 2009; Reuzel *et al*, 1976 apud EFSA 2009) e ratos (Janardhan *et al*, 1988; Selmanoglu *et al*, 2001; Til *et al*, 1976). No PARECER nº 10/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (1463526) que versa sobre a toxicocinética do CBZ e outros efeitos tóxicos, verificou-se que, em relação aos parâmetros toxicocinéticos, esse ingrediente ativo (IA) possui rápida absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), com elevada biodisponibilidade (85% após dose única via oral). É extensamente metabolizado pelo sistema microssomal hepático, formando como principal metabólito o 5-hidroxi-carbendazim (5-HBC). Em menor escala (2-4%), ocorre a formação de 2-aminobenzimidazol (2-AB), no plasma sanguíneo e outros órgãos. Não há relato de acumulação tecidual do CBZ – ou de seus metabólitos. Maiores níveis foram observados no fígado. Não foi relatada diferença mensurável quanto ao perfil de metabólitos do CBZ em ratos e camundongos, embora tenha ocorrido a saturação do mecanismo de desintoxicação hepática de forma mais pronunciada em camundongos, quando tratados com altas doses (300 mg/kg p.c./dia) por 29 dias, o que acarretou sinais de hepatotoxicidade. Em ratos, por outro lado, observou-se um aumento dessa capacidade de detoxificação com a exposição repetida, com maior taxa de eliminação. A etapa de excreção ocorre de forma rápida, predominantemente pela urina; e pelas fezes com o aumento da dose.

Esses achados toxicocinéticos de maior capacidade dos ratos para a detoxificação hepática do CBZ em comparação aos camundongos, aliados a maior susceptibilidade das linhagens CD-1 e Swiss ao desenvolvimento de tumores hepáticos reforça a possibilidade de que o desenvolvimento de tumores em camundongos esteja relacionado às circunstâncias 1 e 2.

Em relação a circunstância 3, a USEPA (2014) concorda que os efeitos aneugênicos do CBZ podem ser considerados como um mecanismo de carcinogenicidade no fígado de camundongos. McCarroll *et al* (2002) afirma que o desenvolvimento do câncer é um processo multiestágio e que a aneuploidia tem sido considerada como um mecanismo chave em certos processos neoplásicos. A Anvisa constatou que aneuploidia ocorre em células hepáticas de animais expostos ao CBZ (parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº 1309909). Portanto, a propriedade do CBZ de induzir aneuploidia não pode ser descartada como um MoA para a indução de tumores hepáticos (mecanismo nº 2 da IARC). Por fim, o CBZ induziu nas células hepáticas, *in vitro*, a desregulação molecular em caminhos que levam a indução da transição de células epiteliais para mesenquimais, um passo relevante para que uma célula se torne invasiva. Interferiu também em processos metabólicos celulares que conferem resistência à apoptose, que pode levar a imortalidade das células (Peyre *et al*, 2014). Substâncias com essas características são indutoras de câncer e o CBZ poderia também atuar como carcinógeno pelo mecanismo nº 9.

Em resumo, o MoA do CBZ para o desenvolvimento de câncer hepático em camundongos está relacionado a sua propriedade de interferir no correto funcionamento dos microtúbulos, levando à citotoxicidade (hipótese mais provável) e aneuploidia de células filhas.

3. ANÁLISE DO PESO DAS EVIDÊNCIAS

A evidência da associação da exposição ao CBZ e a ocorrência de câncer em humanos é considerada inadequada pela ausência de estudos epidemiológicos.

Em animais, cinco estudos foram considerados adequados para a avaliação do potencial carcinogênico do CBZ, sendo um com cães, um com ratos e três com camundongos. Dois estudos com camundongos foram positivos para a exposição ao CBZ e o desenvolvimento de tumores. Nesses dois estudos, lesões pré-neoplásicas e/ou tumores foram observados desde as doses mais baixas. Em um dos estudos, foi observada a ocorrência de um tumor raro (hepatoblastoma). Embora este estudo possua limitações metodológicas relevantes, ele foi considerado relevante para a caracterização da carcinogenicidade do CBZ, conforme discutido no item 2.3. O outro estudo, no qual se observou carcinomas hepatocelulares, não apresenta limitações metodológicas.

O MoA caracterizado para o CBZ é compatível com as mecanismos-chaves de desenvolvimento de tumores descritos pela IARC (2019): genotoxicidade (efeito aneugênico observado *in vivo*), e alteração a proliferação celular, morte celular ou fornecimento de nutrientes (efeito observado *in vivo* e indiretamente *in vitro*). Ainda, há indícios de que o CBZ pode promover imortalização (efeito indiretamente observado *in vitro*).

Os camundongos das duas linhagens com resultados positivos para carcinogenicidade são considerados espécies que naturalmente apresentam maior sensibilidade ao surgimento de tumores hepáticos e o aumento da sua incidência pode ter sido influenciado pela menor capacidade de detoxificação de altas doses de CBZ por essa espécie. Isso, somado às limitações metodológicas observadas em um dos estudos com resultados positivos, leva à conclusão de que a evidência de carcinogenicidade em animais nos estudos crônicos é limitada.

Por outro lado, os mecanismos associados à carcinogenicidade para esse ingrediente ativo foram bem caracterizados experimentalmente e podem explicar os tumores observados em camundongos. Ainda, apesar da maior sensibilidade de camundongos, também se espera a ocorrência desses mesmos mecanismos em humanos. O PARECER nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA apresenta diversos estudos com resultados positivos para aneugênese em linfócitos humanos obtidos por cultura primária e incubados com o CBZ.

Logo, os dados mecanísticos explicam o aparecimento de tumores e conferem maior força às evidências de desenvolvimento de tumores em camundongos e, por isso, conclui-se que **há evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais**. Assim, considerando o peso das evidências, o CBZ deve ser classificado como **presumidamente carcinogênico para humanos (Categoria 1B)**, conforme critérios dispostos na RDC nº 294/2019. Essa classificação é baseada em evidência suficiente de carcinogenicidade em animais experimentais sem evidência de carcinogenicidade em seres humanos.

4. DERIVAÇÃO DA DOSE DE REFERÊNCIA PARA CÂNCER

A RDC nº 294/2019, no seu artigo 33, determina que a avaliação de risco apenas será conduzida quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como conhecidos ou presumidamente carcinogênicos e for possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

O CBZ deve ser classificado na categoria 1B para carcinogenicidade, sendo necessário avaliar se é possível determinar um limiar de dose para o desfecho câncer.

A USEPA e a PMRA consideraram o CBZ carcinogênico, porém não determinaram limiar e sim optaram por fazer uma extrapolação linear para baixas doses com base na incidência de adenoma hepatocelular/carcinoma em camundongos machos. Essas agências utilizam a abordagem linear como padrão, assumindo-se um crescimento dose-resposta linear a partir da dose/efeito zero. Essa abordagem é utilizada na ausência ou na insuficiência de informações sobre o MoA ou, ainda, quando o MoA indica uma dose-resposta linear. Esse não é o caso do CBZ, que neste parecer teve o seu MoA com dose-resposta não-linear caracterizado para células somáticas.

A aneuploidia é o resultado de mecanismos indiretos de genotoxicidade. Em contraste com os mutagênicos de ligação ao DNA, para as substâncias genotóxicas que induzem seus efeitos por meio de mecanismos de não ligação ao DNA, espera-se que apresente uma curva dose-resposta sigmoide (curva de concentração-efeito sublinear) e atuam por meio de um valor limite ou limiar de dose (em inglês *threshold limit value -TLV*). Isso significa que para substâncias aneugênicas, experimentos com baixas dosagens, em geral, nenhum efeito será induzido e/ou visto por causa da multiplicidade dos alvos envolvidos no processo de divisão. Conforme as doses do aneugênico aumentam, o aparelho de divisão celular torna-se mais comprometido, resultando em células com desequilíbrios cromossômicos e o potencial para os efeitos da aneuploidia podem ser detectados. Em doses mais altas, os distúrbios podem ser tão graves que afetam a sobrevivência ou propagação celular (Lynch *et al*, 2019). Portanto, a aneugênese causada pelo CBZ é um mecanismo que ocorre por limiar de dose em células somáticas, pois depende de suficiente concentração de CBZ para interação com a tubulina em um nível capaz de inibir sua polimerização e promover erros de segregação durante a mitose ou efeitos citotóxicos.

Corroborando essa constatação, observa-se que os estudos com cães e ratos não mostraram evidências de carcinogenicidade, apesar da ocorrência de hepatotoxicidade. Isso indica que o CBZ, mesmo em altas doses, não leva ao surgimento de tumores nestas espécies. Uma explicação para essa observação seria a maior capacidade de detoxificação do CBZ pelos ratos, aliada à maior susceptibilidade natural dos camundongos das linhagens Swiss e CD-1 à incidência de câncer. Portanto, conclui-se que é possível estabelecer um limiar conservador para o CBZ para humanos ao utilizar os resultados de estudos com camundongos, que, além de mais sensíveis para esse desfecho, resultaram em limiar inferior ao do próprio mecanismo de aneugênese quando o desfecho escolhido ainda não são considerados neoplásicos.

Os dois estudos com resultados positivos em camundongos para o desfecho câncer não encontraram um NOAEL. Para Beems *et al* (1976), o LOAEL foi de 22,5 mg/kg p.c./dia para a presença de lesões pré-neoplásicas (focos celulares) e para Wood *et al* (1982) apud EFSA (2009), o LOAEL foi de 75 mg/kg p.c./dia para a presença de carcinoma. O LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia será utilizado para o cálculo do limiar. Considerando que o menor LOAEL encontrado para o MoA do CBZ para o desfecho câncer, que é o efeito aneugênico, foi de 62,5 mg/kg p.c (teste de micronúcleo em hepatócitos de ratos – Itoh, 2015a,b - citado no PARECER Nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA), o LOAEL de 22,5 mg/kg p.c./dia é considerado suficientemente baixo para prevenir esse evento-chave inicial. Pelo uso do LOAEL ao invés de um NOAEL, deve-se adicionar um fator de incerteza adicional de 10 vezes, o que resulta na utilização de um fator total de incerteza de 1.000 vezes para a derivação de uma dose de referência humana. Logo, obteve-se um limiar de dose para a carcinogenicidade do CBZ de 0,0225 mg/kg p.c./dia. Este valor é 2,7 vezes menor que o valor obtido para o evento chave aneugênese em células hepáticas (0,0625 mg/kg p.c.).

5. CONCLUSÕES

5.1. Classificação do CBZ quanto ao potencial carcinogênico.

O CBZ deve ser classificado na Categoria 1B – Produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos por causar câncer em camundongos e possuir propriedade aneugênica.

5.2. Definição da dose de referência humana para o desfecho carcinogenicidade

O limiar de dose de exposição humana ao CBZ para o desfecho câncer é de 0,0225 mg/kg p.c./dia.

5.3. Quadro comparativo da classificação do CBZ pela Anvisa e pelas autoridades reguladoras de agrotóxicos e órgãos afins internacionais quanto a carcinogenicidade.

Conclusões das principais autoridades internacionais sobre a carcinogenicidade do Carbendazim.			
Autoridade Regulatória	Conclusão	Resultados Experimentais	Limiar humano
APVMA (2012)	Não é carcinogênico	-	-
EFSA (2009)	Não é carcinogênico para humanos	-	-
PMRA (2011)	Possivelmente carcinogênico	Definição de um fator potencial de carcinogenicidade	Limiar não determinado. Extrapolação linear com base em efeitos aneugênicos.
USEPA (2020)	Possivelmente carcinogênico	Definição de um fator potencial de carcinogenicidade	Limiar não determinado. Extrapolação linear com base em efeitos aneugênicos.
ANVISA	Presumidamente carcinogênico para humanos	Definição de um limiar	0,0225 mg/kg p.c./dia (com base em efeitos mais sensíveis que efeitos aneugênicos)

6. RECOMENDAÇÕES

6.1. Alterações na monografia do Carbendazim:

Classificação como “Produto que presumidamente possui potencial carcinogênico para seres humanos (categoria 1B)”.

6.2. Alterações de rótulo e bula dos produtos formulados:

Inclusão da classificação do produto na classe de perigo carcinogenicidade, categoria 1B, pictograma específico, palavra de advertência “Perigo”, seguida da frase de perigo “Pode provocar câncer em doses acima de 0,0225 mg/kg p.c./dia”.

7. BIBLIOGRAFIA

APVMA. Human health risk assessment of Carbendazim. December 2009. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponível em <https://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14531-carbendazim-prf-vol2.pdf>.

APVMA. Carbendazim. review findings report. August 2012. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Disponível em: <https://apvma.gov.au/search/google/Carbendazim>

Beems R, Til H, Van der Heijden C. Carcinogenicity study with carbendazim in mice, Final report; report no. R4936, Unpublished report by Central Institute for Nutrition and Food Research, 1976.

Börzsönyi M, Pintér A, Surján A, Farkas I. Transplacental induction of lymphomas in Swiss mice by carbendazim and sodium nitrite. *Int J Cancer*. 1976 Jun 15;17(6):742-7. doi: 10.1002/ijc.2910170609. PMID: 988851.

Börzsönyi M & Csik M. Induction of malignant lymphomas in swiss mice by n-nitroso compounds formed *in vivo* *Int. J. Cancer*. (1975) 15:830-838. doi: 10.1002/ijc.2910150515.

Donaubauer *et al* (1982) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM> IARC. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Preamble, Lyon, France, 2019.

Igarashi M, Setoguchi M, Takada S, Itoh S., Furuhashi K. Optimum conditions for detecting hepatic micronuclei caused by numerical chromosome aberration inducers in mice. *Mutation Research*, v. 632, p. 89-98. 2007.

Lynch AM, Eastmond D, Elhajouji A *et al*. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneuploidy for carcinogenesis and hereditary diseases, *Mutat Res Gen Tox En*, 847, 2019. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.02.006.

McCarroll NE, Protzel A, Ioannou Y, Frank Stack HF, Jackson MA, WatersMD, Dearfield KL. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim. *Mutat Res*. 2002 Sep;512(1):1-35. doi: 10.1016/s1383-5742(02)00026-1. PMID:12220588.

Peyre L, Zucchini-Pascal N, de Sousa G, Luzy AP, Rahmani R. Potential involvement of chemicals in liver cancer progression: an alternative toxicological approach combining biomarkers and innovative technologies. *Toxicol In Vitro*. 2014 Dec;28(8):1507-20. doi: 10.1016/j.tiv.2014.06.009. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24997295.

Pfeil R, Dellarco V. Carbendazim –1 JMPR 2005. Inventory of evaluations performed by the Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR). Disponível em: <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=CARBENDAZIM>

PMRA. Carbendazim. Proposed Registration Decision. PRD2011-04. Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2011. Disponível em: <http://publications.gc.ca/site/eng/397259/publication.html>

PubChem. Carbendazim C9H9N3O2 – PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429>

Reuzel *et al* (1976) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

Sherman (1972) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>

Til KP, Kollen C, van der Heijden CA. Combined chronic toxicity and carcinogenicity study with Carbendazim in rats. Report no R5133. Unpublished report by Central Institute for Nutrition and Food Research, 1976.

Thomas P, Holland N, Bolognesi C *et al*. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 4(6):825-837, 2009. doi:10.1038/nprot.2009.53.

USEPA. Thiophanate Methyl and Carbendazim (MBC). Human Health Assessment Scoping Document in Support of Registration Review. United States Environmental Protection Agency. March 20, 2014. Disponível em: <https://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=chemicalsearch:1>

USEPA. Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review. United States Environmental Protection Agency. March 24, 2020.

Vela-Corcía D, Romero D, de Vicente A *et al*. Analysis of β -tubulin-carbendazim interaction reveals that binding site for MBC fungicides does not include residues involved in fungicide resistance. *Sci Rep* 8, 7161 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25336-5>

Wood *et al* (1982) apud EFSA. Draft Re-Assessment Report 16 July 2009. Carbendazim. Volume 3 (B6). Report and Proposed Decision. Rapporteur Member State: Germany. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/search/site/CARBENDAZIM>



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Machado Braz, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 27/07/2021, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 03/08/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1433818** e o código CRC **3B341EE7**.



Referência: Processo nº 25351.945793/2019-57

SEI nº 1433818

Criado por [daniel.freitas](#), versão 15 por [daniel.freitas](#) em 26/07/2021 16:24:03.

PARECER Nº 12/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: **Análise do potencial de toxicidade para a fisiologia reprodutiva do ingrediente ativo Carbendazim.**

Avalia os estudos científicos, o relatório da Força-Tarefa Carbendazim e os de outras agências reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para a fisiologia reprodutiva do Carbendazim, como parte da reavaliação toxicológica desse ingrediente ativo, conforme RDC nº 221, de 28 de março de 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMVA: *Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority* (Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários).

CBZ: Carbendazim

CDPR: *California Department of Pesticide Regulation* (Departamento de regulação de pesticidas da Califórnia)

Creav: Coordenação de Reavaliação

DAG: Distância anogenital

DG: Dia gestacional

DMT: Dose máxima tolerável

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos)

EOGRTS: *Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study* (Estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração estendida)

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FT: Força Tarefa do Carbendazim

IA: Ingrediente ativo

ip: Via intraperitoneal

it: Via intratesticular

LOAEL: *Lowest observed adverse effect level* (Dose mais baixa de efeito adverso observável)

MN: Micronúcleo

MT: Microtúbulo

NOAEL: *No observed adverse effect level* (Dose sem efeito adverso observável)

NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level* (Nível sem Efeito Adverso Observável)

OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PMRA: *Health Canada's Pest Management Regulatory Agency* (Agência Reguladora de Controle de Pragas Canadense)

sg: Significativo

TR: Toxicidade reprodutiva

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agência de Proteção Ambiental Americana)

WoE: *Weight of Evidence* (Peso da evidência)

vo: Via oral

RESUMO

O Carbendazim (CBZ) é um fungicida sistêmico de amplo espectro, pertencente à classe dos benzimidazóis, cuja ação pesticida decorre da inibição da polimerização de β -tubulina, o que impede a formação adequada do fuso acromático e, conseqüentemente, prejudica o processo de divisão celular. Na avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva (TR) do CBZ, foram considerados estudos regulatórios apresentados pela Força-Tarefa, estudos da literatura científica obtidos mediante revisão sistemática e relatórios das principais agências reguladoras internacionais. A partir deles, verificou-se que, quanto aos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, o CBZ acarreta efeitos adversos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina. No sexo masculino, verificou-se que o testículo é um órgão-alvo, em roedores e cães, após exposição única ou repetida ao CBZ, com ocorrência de vários efeitos adversos de curto e longo prazo, inclusive irreversíveis. Dentre esses efeitos, estão: 1) resposta testicular reversível, induzida principalmente por dosagens baixas a moderadas (50 - 100 mg/kg), causando danos diretos ao epitélio seminífero, com conseqüente descamação de células germinativas imaturas, necrose de células em divisão e alterações na formação do núcleo de espermátides; e 2) oclusão irreversível dos ductos eferentes, induzida por doses moderadas a altas (100 - 800 mg/kg), com acúmulo de fluido, estase de espermatozoides, aumento do peso testicular, dano epitelial, resposta inflamatória, fibrose tecidual, formação de ductos anormais, atrofia do epitélio seminífero e do testículo, seguida de infertilidade permanente. Não foi possível a definição de um NOAEL para a TR no sexo masculino, posto que, já na menor dose testada (0,1 mg/kg p.c./kg), foram verificados efeitos adversos. Com relação aos efeitos no sexo feminino, foram relatados redução no ganho de peso corporal materno, no tamanho da ninhada e na viabilidade fetal, atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação, redução nos sítios de implantação, além de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização. A extensão da perda gestacional e da aneuploidia em zigotos foi maior com a administração de CBZ no proestro, o que indica que o oócito parece ser mais sensível aos efeitos induzidos pelo CBZ durante a formação do fuso (maturação do oócito) do que após ele ter sido formado. O mecanismo de ação subjacente

aos efeitos relatados em ambos os sexos é a interrupção da polimerização dos microtúbulos pela ligação do CBZ à β -tubulina, inclusive com AOP já caracterizado (AOP 106) para a geração de oócitos aneuplóides após exposição ao CBZ. Tais oócitos, quando fertilizados, vão gerar descendentes aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole, o que corresponde ao evento adverso observável. Também não foi possível o estabelecimento de um NOAEL para os efeitos do CBZ no sexo feminino, pois as doses testadas em todos os estudos disponíveis foram muito altas, e em todas foram observados efeitos adversos (≥ 250 mg/kg p.c.). Diante desses resultados, conclui-se o CBZ deve ser classificado na Categoria 1B e que não é possível o estabelecimento de limiar para a ocorrência dos efeitos adversos sobre a reprodução, em ambos os sexos.

INTRODUÇÃO

O presente parecer objetiva avaliar o potencial de toxicidade reprodutiva (TR) do ingrediente ativo (IA) Carbendazim (CBZ), a partir do conjunto de evidências relevantes disponíveis, quais sejam: estudos regulatórios multigeracionais e de toxicidade para o desenvolvimento pré-natal em ratos e coelhos e estudos de reprodução/desenvolvimento disponíveis na literatura científica, apresentados pela Força-Tarefa Carbendazim ou ainda obtidos dos relatórios das principais agências reguladoras de agrotóxicos internacionais (USEPA, PMRA, EFSA, APMVA, FAO).

Então, como parte do processo de reavaliação desse IA, foi conduzida uma busca sistemática da literatura científica para identificar estudos com evidências de TR associada à exposição ao CBZ, a fim de integrar esses dados aos estudos regulatórios disponibilizados pelas empresas registrantes, por meio de uma análise de peso da evidência (WoE), seguindo critérios também adotados por diversas autoridades regulatórias internacionais, para fins de tomada de decisão. O detalhamento dessa busca sistemática consta no Parecer nº 7/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1451178](#)). É relevante mencionar que não foram avaliados estudos conduzidos com produtos formulados à base de CBZ (Upadhyay et al, 2019; Akbarsha et al., 2000; Akbarsha et al., 2001).

ANÁLISE

Efeitos adversos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina

Com base nos relatórios de todas as agências reguladoras consultadas e no próprio relatório da FT, não há dúvida quanto ao potencial do CBZ em induzir efeitos na função sexual ou na capacidade reprodutiva masculina e feminina em animais. Contraditoriamente ao grande número de estudos da literatura com evidências de TR, nenhum efeito adverso sobre a reprodução foi identificado no estudo multigeracional de Til et al (1976) apresentado pela FT (Quadro 1). Entretanto, assim como discutido pela EFSA (2009) e pela PMRA (2011), a CREAV considerou que esse estudo possui várias limitações em relação ao protocolo previsto na Diretriz OECD 416, principalmente com relação à ausência de análise ou de fornecimento de dados de vários parâmetros importantes de reprodução/desenvolvimento, tais como: ciclo estral, parâmetros espermáticos (contagem, morfologia e motilidade de espermatozoides); dosagem de níveis hormonais (LH, FSH, testosterona, estrogênio,

progesterona, prolactina), medição da distância anogenital (DAG), registro de marcos de desenvolvimento (idade de abertura vaginal e separação prepucial) e parâmetros funcionais na prole (atividade motora, função sensorial, ontogenia de reflexos); histopatologia de órgãos reprodutivos (ovários e testículos) e da hipófise. Além disso, não foram disponibilizados dados analíticos sobre a confirmação dos níveis dietéticos de CBZ, o que impossibilita uma determinação precisa da dose a qual os animais foram efetivamente expostos. Outro estudo multigeracional mais recente (uma geração estendida – EOGRTS, 2014), segundo avaliação da USEPA (2020) e da PMRA (2019), indicou ausência de efeito degenerativo significativo nos testículos ou alterações espermáticas após exposição dietética ao CBZ, em oposição aos dados fornecidos pelos estudos da literatura, com administração via gavagem, nos quais foram relatados efeitos adversos após exposição única em níveis de doses comparáveis (≥ 100 mg/kg p.c.) e após exposição repetida a doses inferiores (20 mg/kg p.c./dia), por 2 ou 7 dias (Breslin et al., 2013). Esse estudo regulatório também foi incluído no Quadro 1, porém com informações muito resumidas (ausência de detalhamento de diversos parâmetros e de dados brutos), obtidas somente dos relatórios da USEPA (2020) e PMRA (2019), uma vez que a Anvisa não teve acesso ao estudo. Ainda, houve divergências entre essas duas agências com relação às descrições de alguns resultados: a USEPA relatou ausência de qualquer efeito adverso reprodutivo, considerando um NOAEL de 2.000 ppm (maior dose testada); enquanto a PMRA relatou alterações significativas em alguns parâmetros (redução no peso testicular, atrofia testicular, aumento da motilidade espermática) nesse nível de dose, considerando a dose de 1.000 ppm como NOAEL. Esse conjunto de fatores impossibilita qualquer conclusão da Anvisa com base apenas nas informações fornecidas por esses relatórios.

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
<p>Til et al., 1976</p> <p>Estudo regulatório protocolado na Anvisa.</p> <p>Também avaliado por APVMA, 2009 EFSA, 2009 PMRA, 2011</p>	<p>Pureza: 99%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> albinos;</p> <p>Delineamento: <u>Estudo de 3 gerações:</u> Geração F₀: n = 10♂ e 20♀/grupo): Administração dietética de CBZ (0, 150, 300 ou 2000 ppm; 0, 7,5, 15 ou 100 mg/kg p.c./dia). Acasalamento: 5♂ e 10♀/grupo; 2 ninhadas sucessivas (F1a e F1b). Eutanásia de F1a no desmame; Acasalamento de F1b (10♂ e 20♀/grupo): 2 ninhadas sucessivas (F2a e F2b). Eutanásia de F2a no desmame; Acasalamento de F2b (10♂ e 20♀/grupo): 2 ninhadas sucessivas (F3a e F3b).</p> <p><u>Estudo dietético de 4 semanas:</u> Prole F3b (10♂ e 10♀ - mesmas doses que F₀) – análise histopatológica</p>	<p>Estudo de reprodução: Parental: - S/ anormalidades nas condições ou comportamento (F₀, F1b e F2b); - Mortalidade na maior dose (2000ppm) - F₀ (1♀) e F1 (2♀); - ↑* p.c. nos animais F₀ (♀ - 150 e 300ppm), F1 e F2 (♀ e ♂ - 3 níveis de dose), que foi (considerado sem significado toxicológico, uma vez que não existe tendência dose-resposta ou evidência histopatológica ou explicação relatada para embasar um efeito relacionado ao tratamento; - S/ ↓ fertilidade (% fêmeas com ninhadas); s/ diferenças na razão entre sexos; - Pequenas alterações no tamanho da ninhada (sem relação com tratamento);</p> <p>Estudo dietético de 4 semanas: - S/ óbitos ou anormalidades de condição ou comportamento; - ↑* p.c. (♀ - 150 e 300ppm) – s/ relação dose-resposta; - ↑ ingestão alimentos (♂ - todos os grupos) – s/ relação com tratamento; - ↑* peso relativo do fígado e ↓* peso relativo do baço (♀ - 2000ppm); - ↓* pesos relativos dos ovários (todos as doses), mas s/ relação com o nível de CBZ na dieta (inversamente proporcional à dose); - Histopatologia: evidências comuns na linhagem usada nesse estudo, quase igualmente distribuídas entre o grupo tratado e controle.</p>	<ul style="list-style-type: none"> A parte deste estudo relativa à avaliação pré-natal (teratogenicidade) ou pós-natal de parâmetros exclusivos do desenvolvimento está descrita no Parecer SEI nº 1505782. Desvios em relação à Diretriz OECD 416: não foram registrados dados de consumo alimentar (exceto para o estudo com prole F3b), então a ingestão de CBZ (mg/kg p.c./dia) foi calculada por meio de um fator de 0,05 (200 g p.c./ 10 g consumo alimentar/dia) (RD OECD: registro semanal); ausência de dados sobre o estado de saúde e a idade inicial dos animais (RD OECD: 5-9 semanas); observações gerais realizadas “regularmente” (RD OECD: avaliação diária); registro quinzenal do p.c., a partir da 2ª semana (RD OECD: registro semanal), a partir do 1º d de adm.; acasalamento com proporção de 5:10 (macho/ fêmea) (RD OECD: 1:1); não foram analisados todos os parâmetros previstos na diretriz (ciclo estral, parâmetros espermáticos; níveis hormonais; não há dados analíticos disponíveis sobre a confirmação dos níveis dietéticos de CBZ; não foram fornecidos dados de histopatologia de órgãos reprodutivos (ovários e testículos) ou da hipófise, nem dados individuais no relatório original. RD OECD 416: em estudos dietéticos, o intervalo de doses não deve exceder 3x (não foi apresentado racional para seleção de doses). 	<p>NEGATIVO (reprodução/ fertilidade)</p> <p>NOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (maior dose testada)</p> <p>(Conclusão alinhada a EFSA e PMRA)</p>

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão		
	somente da maior dose (2000 ppm).					
<p>Estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014)</p> <p>Estudo regulatório não protocolado na Anvisa. Nossa análise foi baseada nas descrições efetuadas pela USEPA (2020) e PMRA (2019).</p>	<p>Pureza: 99,5%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar Hannover [CrI:WI (HAN)]</i></p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> de uma geração estendida. Geração P: Administração dietética de CBZ (n = 30/sexo/ dose; 0, 250, 1000 ou 2000 ppm (equivalente à dose média diária pré-acasalamento na geração P de 0; 13,9; 53,2 ou 106,7 mg/kg p.c./dia em ♂ e 0; 16,2; 67,6 ou 136,8 mg/kg p.c./dia em ♀) por 4 semanas antes do acasalamento, por 14 dias de acasalamento e até DPN₈₅ (♂) ou até o desmame da prole F1 no DL₂₂ (♀); Geração F1: Administração dietética do desmame ao término do estudo.</p> <table border="1" data-bbox="286 1353 562 1466"> <tr> <td>Coorte 1a (22/sexo/ dose)</td> <td>TR e sistêmica</td> </tr> </table>	Coorte 1a (22/sexo/ dose)	TR e sistêmica	<p>Toxicidade parental (P e F1 adultos):</p> <ul style="list-style-type: none"> Ausência de mortalidade; s/ alterações clínicas, no p.c. ou ganho de p.c., no consumo de alimentos, parâmetros hematológicos, bioquímicos ou de uroanálise. ≥1000ppm: ↓* triglicerídeos em ♀ F1 e ♀P (não considerado adverso pois não teve evidência de alteração histológica relacionada); ↓sutil testosterona plasmática em ♂P; 2000ppm: ↓monócitos em ♂P (dentro do controle histórico); ↑* contagem de leucócitos, linfócitos e neutrófilos segmentados em ♀ F1 coorte 1b (dentro do controle histórico); ↓sutil peso testicular (4% abaixo do controle) e leve atrofia testicular (3/30) em ♂P (não considerado adverso devido à alteração marginal e ausência de efeitos reprodutivos); <p>Toxicidade reprodutiva:</p> <ul style="list-style-type: none"> S/ alterações nos índices reprodutivos, intervalos pré-acasalamento, duração da gestação, desenvolvimento sexual, ciclo estral, contagem de folículos ovarianos, parâmetros espermáticos, parto, lactação ou tecidos e órgãos do sistema reprodutivo (USEPA). 2000ppm: ↓peso testículos (P e F1 desmame e adulto), ↑ atrofia testicular (somente em P), ↑ motilidade espermática; ↓testosterona (não adversa, somente em P1) (PMRA). <p>Prole (toxicidade sistêmica e marcos do desenvolvimento):</p>	<ul style="list-style-type: none"> A parte deste estudo relativa à avaliação pré-natal (teratogenicidade) ou pós-natal de parâmetros exclusivos do desenvolvimento está descrita no Parecer SEI nº 1505782. A parte deste estudo relativa à avaliação dos parâmetros tireoidianos (coorte 3) está descrita no Parecer SEI nº 1463526. Estudo não satisfaz totalmente a RD OECD 443, a qual foi modificada para testar a toxicidade para reprodução, tireoide e DNT, sendo adequada para avaliar esses parâmetros. A coorte 3 não foi empregada para imunotoxicidade, mas para a avaliação de efeitos tireoidianos. No entanto, o estudo, conforme conduzido, não mostra evidências de potencial imunotóxico do CBZ com base na ausência de efeitos observados na hematologia, peso do órgão ou histopatologia. Não foram feitos ajustes de dose na dieta durante o curso do estudo. Como resultado, a ingestão da ST em ♀ durante a lactação foi até 2 vezes superior que em outros grupos de dose. 	ND
Coorte 1a (22/sexo/ dose)	TR e sistêmica					

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão										
	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="282 284 427 408">Acasalamento no DPN₉₀; eutanásia no DPN₁₄₈ (♂).</td> <td data-bbox="427 284 660 408"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="282 408 427 520">Coorte 1b (20/sexo/dose)</td> <td data-bbox="427 408 660 520">TR</td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="282 520 660 1110">Acasalamento no DPN₉₀; eutanásia no DPN₁₇₅ (♂) e no DL₂₀ (♀); eutanásia da prole F2 no DPN₂₃ (n = 12/sexo/dose – dosagem de hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo) e no DPN₄₅ (20♀/dose - abertura vaginal e dosagem de hormônio tireoidiano).</td> </tr> <tr> <td data-bbox="282 1110 427 1222">Coorte 3 (12/sexo/dose)</td> <td data-bbox="427 1110 660 1222">Tox.sistêmica/tireoide</td> </tr> <tr> <td colspan="2" data-bbox="282 1222 660 1479">Dosagem do hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN₂₃.</td> </tr> </table>	Acasalamento no DPN ₉₀ ; eutanásia no DPN ₁₄₈ (♂).		Coorte 1b (20/sexo/dose)	TR	Acasalamento no DPN ₉₀ ; eutanásia no DPN ₁₇₅ (♂) e no DL ₂₀ (♀); eutanásia da prole F2 no DPN ₂₃ (n = 12/sexo/dose – dosagem de hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo) e no DPN ₄₅ (20♀/dose - abertura vaginal e dosagem de hormônio tireoidiano).		Coorte 3 (12/sexo/dose)	Tox.sistêmica/tireoide	Dosagem do hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN ₂₃ .		<ul style="list-style-type: none"> • S/ alterações na DAG, consumo de alimentos ou histopatologia dos filhotes F1 e F2; • ≥1000ppm: ↑ peso fígado (♀/♂ - PMRA); ↓ p.c. e ganho de p.c. (F1♂); • 2000ppm: atraso na abertura vaginal (F1 e F2) (PMRA). 		
Acasalamento no DPN ₉₀ ; eutanásia no DPN ₁₄₈ (♂).														
Coorte 1b (20/sexo/dose)	TR													
Acasalamento no DPN ₉₀ ; eutanásia no DPN ₁₇₅ (♂) e no DL ₂₀ (♀); eutanásia da prole F2 no DPN ₂₃ (n = 12/sexo/dose – dosagem de hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo) e no DPN ₄₅ (20♀/dose - abertura vaginal e dosagem de hormônio tireoidiano).														
Coorte 3 (12/sexo/dose)	Tox.sistêmica/tireoide													
Dosagem do hormônio tireoidiano, necropsia e patologia do órgão-alvo no DPN ₂₃ .														

Quadro 1. Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina e feminina em ratos após exposição dietética ao ingrediente ativo Carbendazim nos estudos multigeracionais.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
------------	-----------	--------------------------	--	-----------

Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; DNT= neurotoxicidade para o desenvolvimento; ND= não determinado; NI = não informado; p.c.= peso corpóreo.

Conforme discutido pelas agências reguladoras (EFSA, 2010; PMRA, 2011; USEPA, 2020; APMVA, 2009), essa diferença na ocorrência de efeitos adversos entre os estudos regulatórios e os da literatura pode ser decorrente da via de administração – dietética ou por gavagem. Nos estudos dietéticos, os valores de NOAEL/LOAEL foram superiores e os efeitos adversos foram menos acentuados ou severos. Um perfil semelhante foi observado nos estudos conduzidos com Benomil. Essa diferença também interfere nos efeitos para o desenvolvimento e parece decorrer de mudanças no perfil toxicocinético quanto a essas duas formas de administração. Entretanto, considerando que as diretrizes OECD 416 e 414 preveem a administração da ST via gavagem; e considerando ainda que, com relação aos estudos dietéticos, um deles apresenta várias limitações (Til et al., 1976), como falado anteriormente, e o outro foi somente avaliado pela USEPA (2020) e PMRA (2019), de modo que a Anvisa não teve acesso diretamente ao estudo para análise dos dados; os estudos conduzidos via gavagem, provenientes da literatura científica, foram considerados na avaliação do potencial de TR pela Anvisa, a despeito dessa diferença levantada pelas agências reguladoras.

Então, a seguir serão discutidas as evidências de TR fornecidas pelos estudos da literatura e pelos relatórios das agências reguladoras, quanto aos efeitos observados no sexo masculino (Quadros 2 e 3) e feminino (Quadro 4).

Ainda, na busca sistemática foi identificado um estudo epidemiológico transversal (Petrelli et al, 2003), o qual buscou avaliar o risco de aborto espontâneo em casais com registro de exposição ocupacional ou doméstica nos meses antecedentes à primeira gravidez (Quadro 5). No entanto, por ser apenas descritivo e apresentar inúmeras limitações inerentes ao desenho desse tipo de estudo, não foi possível tirar qualquer conclusão de seus resultados, sendo essa evidência descartada da análise do WoE.

Efeitos observados no sexo masculino

Conforme discutido no Parecer nº 10/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1463526), que trata da toxicocinética, toxicidade aguda, neurotoxicidade, imunotoxicidade e outros efeitos à saúde relacionados ao Carbendazim, o testículo é um órgão-alvo, em roedores e cães, após exposição única ou repetida ao CBZ, com ocorrência de vários efeitos adversos de curto e longo prazo, inclusive irreversíveis. Uma série de estudos investigou os efeitos reprodutivos masculinos, dose e tempo-dependentes, induzidos após administração única de CBZ via oral em ratos (Nakai et al., 1992, 1993, 1994, 1995, 1997a, 1997b, 1998a, 1998b, 2002; Hess & Nakai, 2000; Moffit et al., 2007; Markelewicz, 2004, Kadalmani et al., 2002; Kawata et al., 2020). A partir desse conjunto de dados, verificou-se que a exposição ao CBZ produz dois efeitos patológicos diferentes no sistema reprodutor masculino: 1) resposta testicular, com efeitos diretos no epitélio seminífero que causam descamação de células germinativas imaturas, necrose de células em divisão e alterações na formação do núcleo de espermátides; e 2) oclusão dos ductos eferentes.

Os primeiros efeitos foram reversíveis e induzidos principalmente por dosagens baixas a moderadas (50 - 100 mg/kg p.c/dia). Eles incluíram: a) inibição da formação de

microtúbulos (MT) na região do corpo das células de Sertoli, com consequente descamação do epitélio seminífero apical e liberação rápida e massiva de células germinativas imaturas, levando à redução na contagem de espermatozoides testiculares (em 2-4h), evento associado ao aumento significativo no peso testicular (início em 8h); b) alterações morfológicas de espermátides (núcleo, acrossomo e manchete) e indução de assincronia do desenvolvimento de espermátides nas fases iniciais da espermiogênese; c) interrupção do processo de espermatogênese ao causar necrose das células em divisão, durante a mitose ou meiose, e impedir espermátocitos em paquíteno de completar a segunda divisão meiótica; d) indução da formação de megaespermátides (estruturalmente normais, mas 30% maiores que o tamanho normal). O peso testicular permaneceu elevado até 96h pós-exposição, com posterior redução rápida.

O segundo grupo de efeitos ocorreu em níveis de dose moderada a alta (100 - 800 mg/kg) e foram irreversíveis. A oclusão dos ductos eferentes foi verificada rapidamente após a exposição (75% em 12h e 85% em 24h), alinhada ao aumento do peso testicular observado em 8h pós-tratamento. Essa oclusão, a qual parece ocorrer por ação direta do CBZ nos ductos eferentes, é completa em 6-8h, seguida por acúmulo de fluido, estase de espermatozoides e aumento do peso testicular. Isso gera dano epitelial, uma consequente resposta inflamatória mediada por neutrófilos (em 2-4h pós-oclusão), fibrose tecidual com formação de múltiplos ductos anormais (microcanais), indicando uma tentativa de recanalização em 16 dias pós-tratamento. Análises efetuadas em 70 dias pós-exposição indicaram azoospermia associada à formação desses ductos anormais. Os últimos eventos relatados foram atrofia do epitélio seminífero e do testículo, seguida de infertilidade permanente.

Ainda, demonstrou-se que a oclusão dos ductos eferentes pode ter relação com os efeitos deletérios nos túbulos seminíferos, posto que o número de túbulos atróficos foi bem maior nos testículos com total oclusão desses ductos. Com isso, os autores concluíram que a capacidade dos testículos em resistir aos efeitos deletérios de longo prazo do CBZ depende da permeabilidade dos ductos eferentes (Gotoh et. al., 1999).

Já a exposição oral repetida por 10 dias, a 400 mg/kg p.c./dia, resultou em um percentual de 21% de testículos com atrofia total de túbulos seminíferos em 70 dias pós-tratamento e de 50% após 245 dias. Isso sugere que a regressão tubular seminífera continua por um longo período após o término da exposição ou que as doses adicionais contribuíram para um espalhamento dos danos a um maior número de ductos eferentes. Nesse estudo, também foi relatada infertilidade em aproximadamente 50% dos animais na primeira semana, com agravamento até a 5ª semana (70%). Houve recuperação da fertilidade em 25% dos animais entre 5 - 11 semanas. O restante deles permaneceu infértil até o término das 32 semanas de análise e seu exame histopatológico revelou atrofia em mais de 85% dos túbulos seminíferos. Nos machos com fertilidade recuperada, houve grande variação no número de túbulos seminíferos atróficos, variando de 13 a 85% (Carter et al., 1987).

Em outros estudos de exposição repetida, com duração entre 2 a 90 dias, foram evidenciadas tanto as alterações histopatológicas já descritas, quanto efeitos nos parâmetros espermáticos e hormonais, em doses inferiores àquelas empregadas nos estudos de exposição única (≤ 50 mg/kg p.c./dia) (Dere et al., 2016; Salihi et al., 2017a; 2017b; Breslin et al., 2013). Breslin et al (2013) relataram vários danos histopatológicos testiculares e epididimários em ratos, causados pela administração oral de 20 mg/kg p.c./dia, por 2 ou 7 dias. Essas alterações,

com incidência e gravidade progressivas em relação à dose/duração, incluíram: nos testículos – dilatação e degeneração tubular, esfoliação de células germinativas, vacuolização de células de Sertoli; e nos epidídimos – edema, presença de detritos celulares e redução de espermatozoides intratubulares. Similarmente, no estudo de Dere et al (2016), também foram demonstradas alterações histopatológicas testiculares (dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides) em ratos, após exposição subcrônica via oral a baixas doses (≥ 30 mg/kg/dia – sem significância estatística na menor dose, mas com indicação de efeito dose-dependente). Salihu et al relataram os seguintes efeitos adversos em ratos expostos a 50 mg/kg p.c./dia via gavagem por 14 dias: I) alterações na morfometria – redução significativa da altura do epitélio dos túbulos seminíferos e do epidídimo, além de redução significativa do comprimento tubular total por testículo e do comprimento tubular por grama de testículo, efeitos relacionados principalmente à descamação das células germinativas localizadas no epitélio seminífero; II) alterações de marcadores enzimáticos de metabolismo energético e função testicular – fosfatase ácida testicular, fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, ALT e AST; essenciais para a ocorrência de espermatogênese e maturação espermática; e III) alterações no espermograma – redução na motilidade espermática e na contagem de espermatozoides testiculares e epididimários. Similarmente, também foram evidenciadas alterações nos parâmetros espermáticos após exposição oral de camundongos a baixas doses (0,1 a 10 mg/kg/dia) por 5 semanas (Liu et al., 2019; Li et al., 2020). Ou seja, esse conjunto de estudos indica que o CBZ afeta a espermatogênese em baixos níveis de dose, bastante inferiores a 50 mg/kg p.c./dia (500 vezes).

Gray et al (1989, 1990) correlacionaram parâmetros endócrinos e espermáticos com a performance reprodutiva em ratos expostos durante todo o ciclo espermatogênico (do desmame ao acasalamento). Nesse estudo, verificou-se que a maturação/ comportamento sexual, o acasalamento e o parto não foram afetados pela exposição ao CBZ. Entretanto, em ratos machos, foram verificadas alterações na histopatologia testicular e na morfologia dos espermatozoides, além de redução na contagem espermática do epidídimo caudal, nas doses de 50 e 100 mg/kg p.c./dia, as quais são inferiores àquelas associadas à redução de fertilidade. Nos maiores níveis de dose (200 e 400 mg/kg p.c./dia), relatou-se diminuição significativa do potencial reprodutivo, atribuído aos efeitos nos machos, com agrupamento dos animais em duas categorias: I) manutenção da fertilidade: redução em 77% de reservas de espermatozoides caudais e em 50% no nº de espermatozoides testiculares, redução na motilidade espermática e em 25% no peso testicular, aumento de detritos nas amostras de espermatozoides caudais, sem alteração em hormônios sexuais e hipofisários; II) infertilidade: redução a 1% nas reservas de espermatozoides caudais e em 90% no número de espermatozoides testiculares, redução em 50% no peso testicular, presença de atrofia testicular moderada/ severa em 5-6 de 8 animais; aumento nos níveis de FSH séricos e de proteína de ligação de androgênio. Nesse mesmo estudo, dados obtidos em hamsters submetidos ao mesmo protocolo de exposição (somente na dose de 400 mg/kg p.c./dia), indicaram que essa espécie apresenta uma menor sensibilidade aos efeitos tóxicos do CBZ para a reprodução, em comparação aos ratos tratados com a mesma dose. Verificou-se um menor impacto sobre o desempenho reprodutivo de hamsters, sem perda da fertilidade. Esse conjunto de evidências indica que o CBZ induz infertilidade por meio de um mecanismo direto de toxicidade testicular, sendo necessária uma redução severa na contagem espermática para que isso ocorra em roedores.

Yu et al (2009) relataram uma redução dose-dependente significativa do índice de fertilidade, do peso absoluto e relativo dos testículos, e da contagem e motilidade espermáticas, além de várias alterações histopatológicas, após administração de doses \geq 100mg/kg p.c./dia por 80 dias em ratos (verificação de tendência na menor dose de 20 mg/kg p.c./dia). Essas evidências foram associadas a dados de citometria de fluxo, os quais indicaram que a exposição ao CBZ interfere na espermatogênese ao inibir a transformação meiótica de espermatogônia para espermátócito primário.

Um estudo comparativo relatou uma sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, com evidências de que o CBZ, após administração intraperitoneal, alcançou o testículo e não causou danos teciduais aparentes ao epitélio seminífero do camundongo, mesmo quando administrado em dose superior a 10 vezes àquela associada à descamação maciça em testículos de ratos (Correa et al., 2002). Similarmente, a administração de CBZ em camundongos via gavagem por 5 dias não causou efeitos adversos na menor dose testada (250 mg/kg p.c./dia) (Evenson et al., 1987). Por outro lado, nos estudos de Liu e colaboradores (2019) e de Li e colaboradores (2020), também conduzidos em camundongos, foram encontradas alterações nos parâmetros espermáticos, inclusive com redução na motilidade espermática em doses \geq 0,1 mg/kg p.c./dia (menor dose testada). A divergência observada entre os resultados obtidos pelos dois primeiros e pelos dois últimos estudos citados pode ser decorrente não de uma sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, mas de alguns fatores relativos ao desenho experimental destes estudos: um período de exposição mais prolongado (5 semanas), um maior grupo amostral (30 animais/grupo, o que confere um maior poder estatístico) e a mensuração de parâmetros bastante sensíveis para a avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino, como a motilidade espermática (não avaliada nos estudos de Correia et. al., 2002 e Evenson et. al., 1987).

Além dos estudos *in vivo* acima discutidos, dois estudos *ex vivo* (Durand et al., 2017; Pisani et al., 2016), efetuados em culturas de túbulos seminíferos de ratos incubadas com CBZ, relataram efeitos adversos na espermatogênese como: redução de espermátides redondas - precursores dos espermatozóides; alteração na migração de células germinativas pelo epitélio seminífero, interferência hormonal (estrógenos/ andrógenos) e interrupção da meiose.

Com relação aos efeitos hormonais, os dados da literatura mostraram que a exposição ao CBZ promoveu alterações nos níveis séricos de vários hormônios (testosterona, LH, FSH, GnRH, T₃, T₄, TSH) em associação aos efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva acima discutidos. Entretanto, alguns dados foram divergentes entre os diferentes estudos. Os níveis séricos de LH e testosterona, por exemplo, permaneceram inalterados em alguns estudos e sofreram redução em outros. Essas discrepâncias podem ser atribuídas a diferentes protocolos experimentais, bem como ao complexo controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (Rama et al., 2014).

A PMRA (2011) considerou que as alterações relatadas em alguns estudos da literatura (Goldman et al., 1989; Rehnberg et al., 1989) foram secundárias aos efeitos tóxicos diretos do CBZ sobre as gônadas, de forma compensatória na regulação hipotalâmica e hipofisária do testículo. Isto é, os efeitos hormonais pareceram ocorrer indiretamente, como resultado de dano testicular induzido por CBZ, e não por interferência hormonal direta.

Yamada et al (2005) relataram ausência de efeito androgênico/antiandrogênico e estrogênico associado ao Benomil e discutiram que a alteração observada no peso dos órgãos deve estar associada a mecanismos que não são mediados por receptor de esteroide, mas sim à interferência na montagem de microtúbulos. Similarmente, Rama et al. (2014) também relataram ausência de efeito estrogênico, antiestrogênico e antiandrogênico. Além disso, como mencionado anteriormente, o controle do eixo hipotálamo-hipófise-gônada é bastante complexo e pode ser modulado diferencialmente, dependendo dos níveis plasmáticos de compostos químicos com um modo de ação endócrino.

Adicionalmente, verificou-se que o CBZ afetou negativamente a esteroidogênese testicular: uma única dose (200 mg/kg p.c./dia via gavagem) reduziu a expressão da proteína reguladora aguda esteroidogênica (StAR) e da proteína de ligação a andrógenos (ABP), com redução concomitante da atividade das enzimas esteroidogênicas (Adedara et al., 2013). Em oposição, após exposição repetida por 85 dias via gavagem, verificou-se aumento no nível testicular e sérico de ABP e no nível de testosterona testicular, sem alteração no seu nível sérico, em doses ≥ 200 mg/kg p.c./dia (Rehnberg et al., 1989).

Goldman et al (1989) relataram infertilidade associada ao aumento nos níveis de FSH sérico (somente nos animais inférteis), em ratos expostos a doses ≥ 200 mg/kg p.c./dia, a partir do desmame por 85 dias, sem alteração nas dosagens de prolactina, TSH e testosterona. Adicionalmente, esse estudo relatou aumento de LH hipofisário sem alteração no nível sérico (somente na maior dose e sem distinção entre férteis e inférteis) e aumento de GnRH hipotalâmico (somente na menor dose). Esses resultados foram atribuídos tanto aos sinais de *feedback* entre a célula de Sertoli-hipófise (redução na produção de inibina-B pela célula de Sertoli induz liberação de FSH pela hipófise) quanto aos efeitos diretos do CBZ no sistema nervoso central (LH e GnRH).

Gray et al (1990) discutiram que o CBZ não parece atuar diretamente no eixo hipotálamo-hipófise, mas sim por meio de efeitos diretos na célula de Sertoli, posto que não foram verificadas alterações no desenvolvimento puberal, indicando maturação normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Além disso, o perfil de alterações endócrinas relatado nos machos foi característico de compostos que afetam a espermatogênese e induzem a “síndrome de células de Sertoli” (aplasia germinativa), na qual se verifica níveis normais de LH e testosterona séricos, com redução nos níveis de inibina-B e conseqüente aumento no FSH sérico. Alguns estudos também indicaram perfil hormonal semelhante (Pacheco et al., 2012; Erdos et al., 2013; Breslin et al, 2013), enquanto outros indicaram redução de testosterona sérica (Salihu et al., 2017b; Rajeswary et al., 2007) e ausência de alteração nos níveis séricos de FSH (Yu et al., 2009; Moffit, et al., 2013).

Rajeswary et al (2007) relataram que o CBZ não alterou LH e prolactina, mas reduziu testosterona e estradiol séricos, além de induzir redução significativa na atividade das enzimas esteroidogênicas e antioxidantes nas células de Leydig, após administração de CBZ via gavagem (25 mg/kg p.c./dia) por 48 dias. Esse estudo demonstrou que a exposição crônica a baixas doses de CBZ é capaz de induzir TR por meio de um efeito direto nos testículos, com indução de estresse oxidativo nas células de Leydig. Essas alterações foram transitórias, com retorno ao estado basal em 48 dias sem exposição. Similarmente, Salihu et al (2017b) também relataram que as dosagens de LH e prolactina não foram afetadas após exposição via gavagem a 50 mg/kg p.c./dia por 14 dias. Porém, descreveram um aumento nos níveis plasmáticos de FSH e redução de testosterona.

Mecanismos de toxicidade no sexo masculino

O maior número de evidências atribui a TR induzida pelo CBZ a sua capacidade de interação à β -tubulina, com conseqüente impedimento da montagem de MT. Então, sabe-se que o CBZ afeta a espermatogênese, inclusive a etapa de espermiogênese, sendo esses efeitos observados em diferentes tipos celulares: nas células da linhagem espermatogênica e nas células de Sertoli. Os principais eventos-chave afetados pela interação de CBZ com β -tubulina, e suas conseqüências em cada estágio da espermatogênese, são: 1) formação inadequada do fuso acromático durante a mitose das espermatogônias e durante as meioses I e II de espermátocitos, resultando em gametas masculinos aneuplóides (conforme já discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA - SEI nº 1309909); 2) problemas durante a diferenciação das espermátides (alterações no núcleo, acrossomo e manchete) e redução da motilidade durante a espermiogênese, as quais podem ser resultantes de anormalidades morfológicas decorrentes da aneuploidia induzida nos espermatozoides, bem como por efeito direto sobre os MT presentes no flagelo; 3) descamação precoce de células germinativas imaturas e de fragmentos de células de Sertoli no lúmen dos túbulos seminíferos, levando a um aumento do diâmetro do túbulo e atrofia (Rama et al., 2014; Pisani, 2016). Quanto ao item 2, o CBZ afeta a estrutura das manchetes, anéis de MT responsáveis pela diferenciação celular de espermátides redondas para alongadas. Estudos demonstraram anomalias no formato do núcleo e na morfologia dos acrossomas nas espermátides, resultando em acrossomas descontínuos, multivesiculares ou ausentes, sendo essa configuração anormal decorrente da estrutura irregular das manchetes (Nakai et al., 1997a, Nakai et al., 1998b). Ainda com relação ao item 3, Nakai & Hess (1994) relataram que, após exposição ao CBZ, o número de MT é reduzido na porção basal das células de Sertoli e aumentado na região apical. Conseqüentemente, as células germinativas perdem aderência ao túbulo e sofrem descamação juntamente com o citoplasma apical das células de Sertoli, sendo, portanto, esse efeito também dependente dos MT.

Além disso, o CBZ afeta tanto os ductos intratesticulares, como os ductos eferentes, quanto os ductos extratesticulares, como o ducto epididimário. O conjunto de evidências indica que, em poucas horas após exposição, ocorre oclusão dos ductos pela presença de células germinativas imaturas descamadas e espermatozoides, o que acarreta um processo inflamatório. Posteriormente, observa-se distensão dos ductos por conteúdo luminal altamente compactado, severa desorganização epitelial e presença de células inflamatórias. Por fim, ocorre proliferação epitelial e formação de microcanais (ductos pequenos anormais) ao redor do lúmen original, o qual é preenchido por tecido conjuntivo fibrótico (Nakai, 1993). Essas alterações podem ser secundárias aos efeitos nos testículos.

Adicionalmente, alguns estudos mecanísticos indicaram que os efeitos de TR atribuídos ao CBZ podem estar associados à indução de estresse oxidativo, com redução de várias enzimas antioxidantes e aumento de marcadores de peroxidação lipídica (Adedara, 2013; Rajeswary et al., 2007; Sakr e Shalaby, 2014), como também à indução de apoptose de células germinativas masculinas (Adedara, 2013) pelo CBZ. Entretanto, esses efeitos podem ser secundários ao dano testicular causado pelo mecanismo de ação discutido nos parágrafos acima e já bem estabelecido para o CBZ. Outros estudos ainda investigaram um potencial mecanismo de ação endócrino para a indução desses efeitos, conforme discutido no item anterior. Porém, essas evidências sugerem que os efeitos hormonais parecem ocorrer

indiretamente, em resposta ao dano testicular induzido por CBZ, e não por interferência hormonal direta.

Limiar para os efeitos no sexo masculino

Na avaliação quantitativa da dose-resposta associada aos desfechos de TR, presume-se a ocorrência de um padrão não linear (existência de limiar), a menos que dados mecanísticos indiquem o contrário (USEPA, 1996). Essa abordagem se fundamenta na existência de mecanismos homeostáticos, compensatórios ou adaptativos que acontecem em etapas anteriores à manifestação do efeito tóxico e são utilizados pelas células e órgãos do sistema reprodutivo. Nessa abordagem não-linear, os valores de referência são derivados por meio da aplicação de fatores de incerteza adequados a um ponto de partida (PoD) – NOAEL, LOAEL ou BMD (*benchmark dose*), de modo a se obter um nível mínimo de exposição no qual a probabilidade de ocorrência do desfecho seja baixa (USEPA, 1996).

Entretanto, a partir dos dados disponíveis, não é possível a determinação de um limiar para a ocorrência dos efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva masculina. A princípio porque, considerando os efeitos de TR nas células germinativas que são consequência da ação aneugênica do CBZ e, conforme discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909), não há evidência disponível que permita estimar uma dose segura *in vivo* na qual não se espere a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos, posto que foi verificada aneuploidia em espermátides de ratos já na menor dose testada, com definição de um valor de LOAEL igual a 50 mg/kg p.c..

Essa conclusão alcançada para o potencial mutagênico já seria suficiente para, em alinhamento, se optar pela impossibilidade de determinação de um limiar de dose seguro para o CBZ capaz de impedir a ocorrência dos efeitos de TR aqui detalhados. Porém, em acréscimo, também cabe mencionar que não é possível a definição de um NOAEL para os efeitos de TR no sexo masculino porque estes já foram relatados nas menores doses testadas em todos os estudos analisados. Isto é, foram encontradas alterações histopatológicas no testículo e epidídimo de ratos em doses ≥ 20 mg/kg p.c./dia, administrada por gavagem por 2 ou 7 dias (Breslin et al., 2013); e, em doses ainda menores em camundongos (0,1 a 10 mg/kg p.c./kg, via gavagem por 5 semanas) foram verificadas alterações em parâmetros mais sutis de dano testicular, com redução na motilidade espermática inclusive na dose de 0,1 mg/kg p.c./dia (Liu et al, 2019; Li et al., 2020). A motilidade espermática pode ser um dos primeiros e mais sensíveis parâmetros para avaliação da toxicidade no aparelho reprodutor masculino (Hood, 2012). Portanto, a menor dose testada dentre todos os estudos realizados com roedores (0,1 mg/kg p.c./kg) já foi capaz de causar efeitos adversos no aparelho reprodutor masculino, sendo esta 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas (50 mg/kg p.c.).

Isso reforça que outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos, e não somente seu efeito antimitótico, podem estar atuando. De fato, conforme evidenciado nos estudos mecanísticos já discutidos, o CBZ interfere em outras funções além da divisão celular, como na diferenciação das espermátides em espermatozoides (espermio gênese) e na estrutura das células de Sertoli, em cujas reentrâncias as células da linhagem espermatogênica se alojam e que ainda realizam as funções de produção de fluido

e fagocitose de corpos residuais das espermatídes. Esses efeitos são também decorrentes da interação do CBZ com a β -tubulina, pois, além da formação adequada do fuso acromático, os MT desempenham diversas e importantes funções nas células, quais sejam: localização do centro da célula e posicionamento de diferentes organelas (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias, dentre outras) no interior da célula; manutenção do formato e migração celular, transporte de carga dentro das células etc (Alberts et al, 2017). Então, todos esses efeitos, que ocorrem em conjunto, dificultam ainda mais a definição de um limiar de dose seguro para o CBZ.

Quadro 2: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina após exposição única ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Nakai et al., 1998a	<p>Pureza: Não informada.</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂.</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; via gavagem) a animais de 25 a 30 dias de idade (n= 18). Eutanásia em D₃ (n=5), D_{4,5} (n=6) e D_{7,5} (n=7) pós-tratamento. Grupo ctl (n=3): 25 e 26 dias de idade; eutanásia em D₃ e D_{7,5}. Análise histopatológica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* incidência de espermátides redondas mega e binucleadas, em animais pré-púberes expostos ao CBZ, com o seguinte detalhamento quanto aos estágios de túbulos seminíferos e intervalos pós-tratamento: • D₃: ↑* em todos os estágios (~ 85% no grupo II-III); • D_{4,5}: ↑* nos estágios IV-V e VI-VII (~ 72% no grupo IV-V); • D_{7,5}: ↑* no grupo VI-VII (~ 66%); ↓* no II-III; e ↓ no IV-V, indicando que essas alterações parecem ser limitadas às primeiras gerações de espermátides; • Dados indicam que, provavelmente, o CBZ atua sobre espermatócitos imediatamente antes e durante a divisão meiótica (estágio XIV), bem como em espermátides de etapa 1-5, em testículos pré-púberes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Número reduzido de animais para análise. • Classificação dos túbulos seminíferos em grupos representativos de três estágios (II-III, IV-V e VI-VII); avaliação quanto à presença de uma ou mais espermátides mega (núcleo aumentado) e/ou binucleadas, com registro do % túbulos apresentando essas anormalidades. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
Nakai et al., 1997a	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; via gavagem; n= 5-6/ grupo); eutanásia, coleta e preparo histológico nos D_{7,5}; D_{9,5}; D₁₀ e D_{10,5} pós-tratamento; grupo controle: D_{7,5}. Análise tecidual por microscopia óptica e eletrônica de transmissão.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Anormalidades no núcleo: I) distorções nucleares em espermátides alongadas (estágios X-XI nos D₁₀ e D_{10,5}): núcleos com contorno ondulado ou irregular, circundados por agregados densos de manchete de MT; distorção nuclear também observada em células binucleadas. II) diferentes tipos de invaginações nucleares: em espermátides mono, binucleadas e deficientes em acrossomo (estágios IX-XI nos intervalos a partir D_{9,5}); III) alteração no envoltório nuclear. • Anormalidades no acrossomo: I) fragmentação/ descontinuidade: D_{7,5} (espermátide redonda no estágio VII); D₁₀ e D_{10,5} (espermátide alongada nos estágios X-XI); retardo na espermiogênese (estágio XI no D_{10,5}), observado em núcleos de 	<ul style="list-style-type: none"> • Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Algumas alterações foram específicas para o tratamento com CBZ – células com múltiplas cavidades nucleares e envelope nuclear modificado; acrossomo com aparência granular – enquanto as demais relatadas foram comuns a demais compostos que também induzem 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>

		<p>megaspermátides redondas com acrossomos fragmentados; II) ausência de acrossomo em espermátides (estágios VII-X nos D_{7,5}-D₁₀);</p> <ul style="list-style-type: none"> Anormalidades na manchete: posicionamento irregular das manchetes de MT (estágios IX-XI a partir de D_{9,5}), resultando em invaginações nucleares. 	<p>anormalidades espermáticas (colchicina, taxol, dentre outros).</p>	
<p>Nakai et al., 1995</p>	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – grupo exposto (n=8) a dose única (400 mg/kg p.c.; via gavagem); grupo ctl (n=7); em 3h pós-tratamento: eutanásia, coleta e preparo histológico dos testículos, análise tecidual por microscopia óptica e reconstrução computacional tridimensional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> CBZ induziu ↑* n° túbulos seminíferos com descamação de espermátides imaturas alongadas; Alteração no perfil nuclear das células de Sertoli: I) nos casos de descamação: ↓* n° de núcleos com posicionamento paralelo e perpendicular; ↑* n° núcleos com formato circular (predominantes), em relação ao controle; II) nos casos sem descamação: ↑* n° núcleos com posicionamento perpendicular e ↓* n° de núcleos com posicionamento paralelo (em relação ao controle e ao grupo com descamação); Alteração no formato do corpo das células de Sertoli: nos casos de descamação, ↓* n° células com formato colunar alto e predominância de células com formato cônico, sugerindo um deslocamento do citoplasma em direção à porção basal, o que resulta em clivagem na região apical e liberação de espermátides imaturas para o lúmen do túbulo seminífero. 	<ul style="list-style-type: none"> Sem informações quanto à toxicidade sistêmica. Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. Alteração no formato nuclear das células de Sertoli mesmo na ausência de descamação induzida pelo CBZ (dados não discutidos satisfatoriamente). 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 400 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
<p>Nakai et al., 1992</p> <p>Apud APMVA, 2009; PMRA, 2011, EFSA, 2009; USEPA, 2020</p>	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única, via gavagem.</p> <p>Protocolo 1: Tempo-resposta (n = 8/ tempo): eutanásia em 2, 4, 8 ou 24 horas e 4, 8, 16 ou 32 dias pós-exposição (0 e 400 mg/kg p.c.);</p>	<p>Protocolo 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> Em 8h pós-exposição; 400 mg/kg p.c.: ↑peso dos testículos e posterior ↓n° espermátides e na % espermatozoides caudais morfologicamente normais, com duração desses efeitos pelos 32 dias de análise. <p>Protocolo 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> 2d pós-exposição: 50mg/kg - liberação de células germinativas imaturas (espermátides redondas de estágio I e II; espermátides alongadas de estágio VII); ≥ 100mg/kg - ↑dose-dependente no peso testicular, de oclusões nos ductos eferentes 	<ul style="list-style-type: none"> Nenhum NOAEL foi estabelecido devido à toxicidade testicular observada na menor dose (liberação prematura de células germinativas imaturas em 2d pós-exposição, atrofia dos túbulos seminíferos e oclusão dos dutos eferentes). Esses efeitos persistiram por pelo menos 70 dias. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 50mg /kg p.c.</p> <p>(alinhada com APMVA e PMRA)</p> <p>(EFSA considerou NOAEL = 50</p>

	<p><u>Protocolo 2:</u> Dose-resposta: eutanásia em 2d (n = 8/dose) e 70d (n=12/dose) pós-exposição (0, 50, 100, 200, 400 ou 800 mg/kg).</p>	<p>(severa inflamação e desorganização do epitélio; ≥50% ductos ocluídos), causadas por conteúdo luminal compactado, granulomas espermáticos, mineralização e obliteração do lúmen original por tecido conjuntivo fibrótico; ausência de células germinativas; ≥ 200mg/kg - ausência de células germinativas na maioria dos estágios de túbulos seminíferos; ≥ 400mg/kg - ↑ diâmetro médio dos túbulos seminíferos;</p> <ul style="list-style-type: none"> 70d pós-exposição: ↓ dose-dependente no peso testicular e no diâmetro dos túbulos seminíferos, com efeitos mínimos associados à menor dose testada. Atrofia de túbulos seminíferos (contendo principalmente células de Sertoli e poucas espermatogônias e circundados por membrana basal espessa) parece ser decorrente do processo de oclusão associado à exposição às maiores doses (≥ 100mg/kg). 		<p>mg/kg; alterações mínimas observadas nessa dose foram consideradas de relevância toxicológica equívoca)</p>
<p>Nakai et al., 1998b</p>	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (100 mg/kg p.c.; gavagem). Eutanásia, coleta e preparo histológico pós-tratamento (n = 4 - 5): D_{1,5}; D₃, D_{4,5} e D_{7,5}. Grupo ctl: amostragem em D_{7,5}. Análise tecidual por microscopia eletrônica e Imunocitoquímica (ICQ).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Anormalidades no desenvolvimento acrossômico de espermátides observadas nos três intervalos estudados: <p>D₃: a) túbulos em estágio III – espermátides de etapa 1 apresentando vesículas proacrossômicas com grânulos, sem a presença de vesícula acrossômica evidente; espermátides de etapa 3 apresentando núcleo com recuo de vesículas acrossômicas;</p> <p>b) túbulos em estágio V – espermátides de etapa 5 apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa;</p> <p>D_{4,5}: a) túbulos em estágios IV e V – espermátides com acrossomos menos desenvolvidos (etapas 1 e 3) e com múltiplas vesículas acrossômicas;</p> <p>b) túbulos em estágio V e VII – espermátides de etapa 5 e 7, respectivamente, apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa;</p> <p>D_{7,5}: túbulos em estágio VII – espermátides sem formação de acrossomo, bem como nas etapas 3-5 de</p>	<ul style="list-style-type: none"> Pequeno grupo amostral; Utilização de somente 2-3 animais na análise ICQ para detecção da proteína MN7 (associada ao processo de desenvolvimento acrossômico); Classificação da espermatogênese de testículos de rato em 14 estágios, com base nas associações de células germinativas dentro dos túbulos seminíferos; espermátides em cada um desses estágios mostram um desenvolvimento sincronizado de acrossomo. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg (única dose testada)</p>

		desenvolvimento; espermátides de etapa 7 apresentando conexões diretas entre a face trans das pilhas de Golgi e a membrana acrossomal externa; Padrão anormal de imunomarcção (mMN7) em espermátides expostas ao CBZ: ocorre perturbação do suprimento de material do complexo de Golgi para os acrossomos, possivelmente causando desenvolvimento anormal durante a fase precoce da espermiogênese.		
Nakai et al., 1994	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 400 mg/kg p.c.; n = 5); grupo ctl (n = 4); em 3h pós-tratamento: eutanásia, coleta e preparo histológico dos testículos, análise tecidual por microscopia óptica e eletrônica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Descamação de espermátides maduras (maioria); e de células germinativas imaturas (espermátides arredondadas e espermatócitos) junto com o citoplasma apical das células de Sertoli (com manutenção do formato original e dos MT), em todos os estágios da espermatogênese, exceto nos III-V; • Alteração na distribuição de mitocôndrias, corpos densos e RE – ao invés de estarem ao longo dos microtúbulos, foram encontrados em agregados; • Mecanismo: Redução no nº de MT na região do corpo das células de Sertoli, sem alteração nos MT presentes nas regiões apicais, o que causou clivagem pela retração de organelas citoplasmáticas na região basal e inchaço do RE. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral; • Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Alta dose aguda. • Não foi relatado racional para escolha da dose ou dados de outros efeitos adversos observados, para possibilitar conclusão quanto à toxicidade sistêmica. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)</p>
Nakai et al., 2002	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos Sprague - Dawley (10-13 semanas);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 400 mg/kg p.c.); Intervalos de avaliação: 45 min (n=2), 60 min (n=6), 90 min (n=4), 120 min (n=8), 150 min (n=2) e 180 min (n=3) pós-tratamento. Análise histopatológica de 100 túbulos seminíferos/ testículo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 90 min: Lacunas entre espermátides alongadas e redondas no final do estágio VI até início de VII (indica pré-descamação); ↓ tubulina em túbulos seminíferos com pré-descamação e nível normal em túbulos sem alterações. Microscopia eletrônica (ME) indicou presença de alguns microtúbulos intactos. • 120 e 150 min: descamação no final do estágio VI até início do VII e do XIII-XIV; ↓ tubulina em túbulos seminíferos com descamação; ME indicou poucos microtúbulos. • 180 min: descamação no estágio I, final do estágio VI até início do VII, estágios IX-XI e do XIII-XIV; • Desfecho é dependente da susceptibilidade dos microtúbulos no estágio específico de 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral em determinados tempos de exposição; • Avaliação semiquantitativa (frequência)/ qualitativa. Imunocitoquímica não quantitativa. • Alta dose aguda. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)</p>

		espermatogênese. Hipóteses: 1) ação sobre as proteínas associadas aos MT (promovem estabilização do MT e competem com o CBZ pela ligação à tubulina) e 2) modificação da tubulina, levando à despolimerização de MT.		
Correa et al., 2002	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Camundongos <i>Swiss Webster</i> e ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: <u>Grupo 1 (n = 4; camundongos):</u> CBZ administrado (2000 mg/kg p.c. - via i.p.) em dose única. Eutanásia em 2, 3 ou 6h pós-tratamento para análise microscópica (100 seções de túbulo seminífero/ testículo) e IHQ (α- e β-tubulina); eutanásia em 5, 15, 30, 60, 90 e 120 min pós-tratamento para determinação dos níveis testiculares de CBZ. <u>Grupo 2 (n = 3; ratos):</u> CBZ administrado (164 mg/kg p.c.; via i.p.) em dose única, com coleta de testículos em 15 min pós-tratamento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de diferença na histopatologia e marcação imunohistoquímica, na comparação entre camundongos controle e tratados (em todos os tempos de análise), indicando que CBZ não induz descamação de células germinativas ou perda da estrutura dos MT no testículo de camundongos; • Controle positivo (grupo 2): testículos de ratos apresentaram descamação maciça, com diferença significativa em relação ao grupo controle correspondente; • Tempo para concentração máxima foi de 5min pós-tratamento, em camundongos, e de 15min pós-tratamento, em ratos; com perfis ao longo do tempo muito semelhantes entre as espécies animais. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral; • Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • Dose aguda muito alta via i.p. para camundongos; • Autores relataram que ainda é desconhecido o mecanismo subjacente à sensibilidade diferenciada entre ratos e camundongos, tendo em vista as evidências de que o CBZ está presente no testículo do camundongo em concentrações maiores ou iguais àquelas verificadas no testículo de ratos. 	<p>NEGATIVO</p> <p>NOAEL = 2000 mg/kg (única dose testada)</p>
Nakai et al., 1993	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 0, 100, 200, 400 ou 800mg/kg p.c.); eutanásia no D₂ (n = 8) e D₇₀ (n = 12) pós-tratamento; grupo adicional (n = 4): CBZ administrado (400 mg/kg p.c.) com eutanásia no D₄, D₈, D₁₆ e D₃₂ pós-tratamento. Análise tecidual por</p>	<ul style="list-style-type: none"> • D₂: obstrução e distensão dos ductos eferentes por células germinativas imaturas descamadas e espermatozoides, com sinais de inflamação; • D₄ e D₈: distensão dos ductos por conteúdo luminal altamente compactado, com severa desorganização epitelial e presença de células inflamatórias; • D₁₆: proliferação epitelial e presença de microcanais (ductos pequenos anormais) ao redor do lúmen original; • D₃₂ e D₇₀: preenchimento do lúmen ocluído por tecido conjuntivo fibrótico, circundado por ductos anormais; 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral em alguns grupos; • Doses altas; • Não foram relatados dados de outros efeitos adversos observados, para possibilitar conclusão quanto à toxicidade sistêmica. 	<p>POSITIVO</p> <p>NOAEL / LOAEL = ND</p> <p>(estudo não detalha a dose em que se observou cada efeito)</p>

	microscopia óptica e eletrônica (epidídimo e ducto eferente).	<ul style="list-style-type: none"> Ductos eferentes ocluídos foram capazes de formar novos ductos, os quais, entretanto, são anormais e ainda exibem azoospermia no D₇₀. 		
Nakai e Hess, 1997b	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> (90 a 100 dias);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 100 mg/kg p.c.; n = 5-6) em dose única. Histopatologia dos testículos em 8 horas e 1,5; 4,5; 7,5; 10,5 e 20 dias pós-tratamento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> 8 horas: descamação de espermatídes alongadas; necrose de espermatócitos em divisão nos túbulos estágio XIV; 1,5 dias: espaços vazios nos túbulos de estágio I (ausência de espermatídes imaturas); 4,5 e 7,5 dias: ausência de espermatídes redondas e alongadas normais, presença de megaspermátides (núcleo 33% maior do que o normal) e espermatídes binucleadas; 10,5 dias: ausência de espermatídes alongadas, espermatídes de diferentes estágios na mesma seção de túbulo, espermatídes binucleadas, alongadas com forma anormal, com cabeça distorcida e invaginação nuclear com agregados de microtúbulos; 20 dias: espaços vazios com ausência de espermatócitos; Efeito direto na meiose de espermatócitos e efeitos latentes nas espermatídes, levando a anormalidades e falha da espermiogênese. Os efeitos foram observados independentemente da ocorrência de oclusões nos ductos deferentes. 	<ul style="list-style-type: none"> Pequeno grupo amostral. Impossibilidade de observar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg (única dose testada)</p>
Moffit et al., 2007	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> ♂ adultos;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (n = 6-10/ grupo; gavagem – 40, 67, 100 ou 200 mg/kg p.c.) em dose única. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e da indução de apoptose.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↑* dose-depedente no peso testicular, na indução de apoptose de células germinativas, no diâmetro de túbulos seminíferos e na % túbulos com descamação do epitélio seminífero (≥67 mg/kg); ↑ %túbulos com > 3 cabeças de espermatídes retidas (≥200 mg/kg); Indução de toxicidade para células de Sertoli: ↑vacuolização (≥67 mg/kg). 	<ul style="list-style-type: none"> OBS: Análise de 50 túbulos seminíferos/ testículo – registro de descamação, presença de vacúolos e retenção da cabeça de espermatídes (% túbulos totais afetados). 	<p>POSITIVO</p> <p>NOAEL = 40 mg/kg</p>
Kadalmani et al., 2002	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar;</p>	<ul style="list-style-type: none"> Perda de espermatócitos em paquíteno nos túbulos de estágio II a V; 	<ul style="list-style-type: none"> Sem informações quanto à toxicidade sistêmica; 	<p>POSITIVO</p>

	<p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem, 400 mg/kg p.c., n=10). Eutanásia e histopatologia em 48h pós-tratamento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Perda de espermatídes alongadas em túbulos do estágio XIV; • Assincronia da espermatogênese, com células meióticas do estágio XIV e espermatócitos em diplóteno com nucléolo proeminente, característico de estágio XIII; • Descamação de células germinativas e fibrose em alguns túbulos seminíferos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. 	<p>LOAEL = 400mg/kg (única dose testada)</p>
<p>Markelewicz, 2004</p>	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos Fischer;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado em dose única (gavagem; 200 mg/kg, n = 7-9). Eutanásia e avaliação do testículo em 24h pós-tratamento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* vacuolização e descamação; • ↓* diâmetro túbulos seminíferos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • Pequeno grupo amostral. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 200 mg/kg (única dose testada)</p>
<p>Kawata et al., 2020</p>	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos machos <i>Sprague-Dawley</i>;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (400 mg/kg p.c.; n = 3-5 animais/grupo) em dose única. Avaliação de parâmetros séricos (ALT, BUN, CPK, creatina), histopatologia e de miRNA em 24 horas pós-exposição.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Histopatologia: degeneração de espermatócitos, vacuolização de células de Sertoli, dilatação de túbulos seminíferos; • Parâmetros séricos: Sem diferença estatística; • miRNA: seleção de candidatos como biomarcadores para dano testicular que precisarão ser avaliados em ensaios clínicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral. • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. • Alta dose. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 400 mg/kg (única dose testada)</p>
<p>Gotoh et al., 1999</p>	<p>Pureza: Não informado;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂ (90-100 dias de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: 1) CBZ administrado via gavagem (dose única de 100 mg/kg p.c.) com análise em 8,</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* peso médio dos testículos com ductos eferentes (DE) parcialmente permeáveis; ↓* peso médio dos testículos com DE totalmente ocluídos; • Histopatologia: a maior parte dos túbulos seminíferos dos testículos com DE intactos foram normais, enquanto os testículos com DE parcialmente permeáveis continham túbulos seminíferos normais, degenerativos e atróficos em 	<ul style="list-style-type: none"> • 100 túbulos seminíferos foram examinados quanto à presença de anormalidades; • Estudo objetivou demonstrar como o dano testicular de longo prazo depende da permeabilidade de ductos eferentes (DE). 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg p.c. (única dose testada)</p>

	16, 32 e 70d pós-tratamento (n = 5-6/ grupo); controle analisado em 8d (n = 3) e em 70d (n = 3) pós-tratamento. Coleta e análise de testículos e epidídimos.	várias frequências, dependendo do número de DE permeáveis; ↑nº DE permeáveis com ↑nº túbulos seminíferos normais, em qualquer intervalo de análise; nº túbulos seminíferos normais aumentou progressivamente à medida que o intervalo pós-tratamento aumentou, independentemente da permeabilidade dos DE. Nos testículos com total oclusão dos DE, túbulos seminíferos atróficos foram os mais numerosos.		
Lim and Miller, 1997a	<p>Pureza: > 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> pré-puberai (23-28 dias) e pós (83-90 dias);</p> <p>Delineamento: Administração de CBZ (via i.p.; 164 mg/kg p.c.) em dose única a ratos pós e pré-puberai. Coleta de sangue (5, 15, 30, 60 e 120 min, n = 4). Nível testicular (5, 15, 30, 60 e 120 min; n = 3). Obtenção de tubulina testicular de ratos pós (n=5) e pré-puberai (n=10) para avaliação da montagem de MT (CBZ 5 e 10 µM pré-incubado com tubulina por 20 minutos).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pré-puberai: dano testicular leve; • Pós-puberai: descamação do epitélio seminífero, vacuolização e isg de túbulos seminíferos. Aumento de severidade dose dependente; • A inibição da associação de MT pelo CBZ foi similar para tubulina de ratos pré e pós puberai; • Os níveis sanguíneos de CBZ nos ratos pré-puberai atingiram valores menores mais rapidamente do que nos pós-puberai. Animais mais jovens eliminaram o CBZ mais rapidamente; • Maior concentração de CBZ foi encontrada no testículo de animais adultos (210, 52 x 67,77 nmol/g); • Quando o CBZ foi administrado diretamente nos testículos, animais mais jovens também apresentaram mais danos testiculares, porém sem descamação (não esperada, já que os animais jovens não possuem espermatídes alongadas). 	<ul style="list-style-type: none"> • Exposição intraperitoneal e intratesticular; • Pequeno grupo amostral; • Diferenças nos resultados podem decorrer apenas da farmacocinética diferencial entre jovens e adultos e da ausência de espermatídes alongadas. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 164 mg/kg p.c. (única dose testada)</p>
Lim et al., 1997b	<p>Pureza: Benomil (>95%; contaminação 10% CBZ); CBZ (não informado);</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: <u>Estudo <i>in vivo</i>:</u> Adm. de benomil (250 mg/kg ip; 400µg intratesticular) e CBZ (164 mg/kg ip; 262µg intratesticular); eutanásia (1-2h pós-tratamento) com coleta de testículo</p>	<p><i>In vivo</i>: <u>Histopatologia (n=4)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓* % túbulos normais; ↑* % túbulos com vacuolização e descolamento do epitélio seminífero, seguido de descamação de células germinativas imaturas (em 1 e 2h pós-tratamento ip e it); • Severidade do dano aumentou com concentração testicular de CBZ e com intervalo pós-tratamento; <p><u>Dosagem nos testículos (n=3):</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo amostral pequeno; • Foram investigados desfechos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>; efetuada correlação da resposta com os níveis testiculares reais de benomil e CBZ; • Histopatologia: análise de 100-150 secções de túbulo seminífero/ animal; • Autores informaram que, apesar dos desfechos verificados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, tal estudo não pode 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 164 mg/kg p.c. (única dose testada)</p>

	<p>para histopatologia, dosagem de benomil, CBZ e outros metabólitos (medição em 5, 15, 30, 60, 90 e 120min pós-tratamento);</p> <p><u>Estudo <i>in vitro</i>:</u> Purificação de tubulina testicular (n = 8 ratos) e análise da inibição da montagem de MT após incubação com benomil (10, 50 e 100 µM) e CBZ (5 e 10µM – como contaminante do benomil).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Após injeção ip de benomil: detecção de CBZ nos testículos em menos de 5min, com pico inferior (99,1 nmol/g) ao verificado após administração do próprio CBZ (281,3 nmol/g); • Após injeção intratesticular de benomil: detecção rápida de CBZ, indicando que testículos têm capacidade de metabolização; pico de CBZ inferior (123,7 nmol/g) ao verificado após administração do próprio CBZ (390,4 nmol/g); ↓ mais rápida de CBZ em comparação à via ip; <ul style="list-style-type: none"> • Correlação linear entre % descamação e concentração testicular de CBZ; <p><i>In vitro:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificação de subunidades α e β-tubulina; • Inibição concentração-dependente na montagem de MT (n=3): IC50 de 75µM (Benomil) e 5µM (CBZ), indicando que o efeito da exposição ao benomil foi quase que completamente decorrente do CBZ. 	<p>concluir que existe uma relação direta entre a inibição <i>in vitro</i> da polimerização dos MT testiculares por CBZ e a descamação de células germinativas observada <i>in vivo</i>;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Somente os resultados referentes ao CBZ foram detalhados aqui, os quais evidenciaram toxicidade testicular muito mais severa, em comparação à exposição ao benomil. 	
Adedara et al., 2013	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ (70 dias de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado (gavagem; 200 mg/kg p.c./dia) em dose única. Eutanásia em 24h pós-tratamento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓* atividades da superóxido dismutase e catalase; ↑* concentração de ácido siálico e peroxidação lipídica nos testículos; • ↓ expressão da proteína reguladora aguda de esteroides (StAR) e da proteína de ligação a andrógenos (ABP), com ↓concomitante nas atividades de enzimas esteroideogênicas; <ul style="list-style-type: none"> • Indução de apoptose de células germinativas (confirmada pelo ensaio TUNEL). 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo de TR. • CBZ induziu supressão da esteroideogênese, indução de estresse oxidativo e apoptose (envolvendo vias mediadas por mitocôndrias e FasL). 	<p>POSITIVO</p> <p>≥ 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
Campion et al., 2012	<p>Pureza: NI;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> 344;</p> <p>Delineamento: Avaliação da exposição concomitante de hexadiona (HD) e CBZ na transcrição e expressão gênica (n=4). Exposição via oral a HD (0,33 ou 1%) por 18 dias, seguida de CBZ no 17º dia por gavagem (67 ou 200 mg/kg). Amostras testiculares coletadas após 3h ou 24</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não foi verificada diferença significativa nos níveis de RNAm ou expressão gênica para o CBZ. Houve alteração mais perceptível para a exposição combinada de CBZ e HD; • CBZ e a HD interagem de forma agonista ou sinérgica em relação à expressão gênica, com expressão proteica (imunohistoquímica) refletindo as alterações gênicas (microarray e qRT-PCR). 	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo amostral pequeno; • Exposição aguda (dose única); • Estudo conduzido para identificar marcadores gênicos de dano testicular. • CBZ usado como modelo de dano testicular. 	<p>ND</p> <p>(Evidência inadequada para análise de desfechos reprodutivos induzidos pelo CBZ)</p>

	horas. Ainda, foi avaliado grupo sem tratamento e grupos expostos apenas a HD ou CBZ.			
--	---	--	--	--

Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; ip= intraperitoneal; it= intratesticular; vo= via oral; ND= não determinado; NI = não informado; IHQ= imunohistoquímica; MT= mictotúbulo; p.c.= peso corpóreo; ERO= espécies reativas de oxigênio; TR= toxicidade reprodutiva.

Quadro 3: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva masculina após exposição repetida ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Dere et al., 2016	<p>Pureza: >97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Fischer</i> 344 ♂ (63 - 69 dias);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 30, 50 ou 70 mg/kg p.c./dia; n = 12/grupo) por 3 meses. Análise histopatológica, da expressão de RNAm e de marcadores de metilação no DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓* peso testicular e epididimal (≥ 70 mg/ kg p.c./dia); • Histopatologia: alterações sg dose-dependentes ≥ 50 mg/ kg p.c./dia – dano ao epitélio seminífero, vacuolização de células de Sertoli, retenção da cabeça de espermátides (relatada em 2/6 animais na menor dose, s/ sg estatística); • Alterações nos níveis de RNAm - 6 marcadores considerados indicadores sensíveis de dano testicular após exposição a baixas doses de CBZ. 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo conduzido para identificar possíveis marcadores gênicos de dano testicular; • Avaliação histopatológica em somente 6 animais/grupo; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 30 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)</p>
Salihu et al., 2017a	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (n = 10/ grupo; gavagem – 50mg/kg p.c./dia) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica, bioquímica e morfométrica do testículo e epidídimo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* índice organo-somático dos testículos e diâmetro tubular seminífero; • ↓* da altura do epitélio dos túbulos seminíferos e do epidídimo; ↓* do comprimento tubular total/ testículo e do comprimento tubular/ grama de testículo; • ↑* atividade da fosfatase ácida testicular e ↓* atividade testicular da fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase e lactato desidrogenase; ↓* ALT e AST nos testículos e epidídimo; • ↓* contagem de espermatozoides testiculares e epididimários e motilidade espermática; • Degeneração do epitélio seminífero, do lúmen de alguns túbulos e dos vasos intersticiais; epidídimo com degeneração de forma e poucos espermatozoides. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Cálculo do índice organo-somático dos testículos ou epidídimo: 100 × peso das gônadas (g) / peso corporal (g). 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 50mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>

<p>Salihu et al., 2017b</p>	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ adultos (10 semanas de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem – 50mg/kg p.c./dia; n = 10) por 14 dias. Eutanásia em 24h pós-tratamento; análise histopatológica e status antioxidante (testículo e epidídimo), dosagens hormonal (TSH, T₃, T₄, prolactina, testosterona, LH, FSH) e bioquímica.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↑* pesos absoluto e relativo dos testículos; sem efeitos no ganho de peso corporal e nos pesos absoluto e relativo do epidídimo, vesícula seminal e próstata; • ↓* motilidade, contagem de espermatozoides testiculares e epididimais, alterações morfológicas (cabeças sem cauda, peças intermediárias curvadas e dobradas); • Redução da capacidade antioxidante com indução de estresse oxidativo e peroxidação lipídica (↓* catalase, GST e GSH e ↑* H₂O₂, ↑* MDA) nos testículos e epidídimo; • ↓* dos níveis plasmáticos de testosterona, TSH, T₃, T₄; ↑* FSH sem afetar LH e prolactina; • Alterações histopatológicas: epitélio seminífero degenerado com poucos espermatozoides, presença de células espermatogênicas descamadas no lúmen de alguns túbulos; congestão severa dos vasos intersticiais; epidídimo com formato irregular e poucos espermatozoides. 	<ul style="list-style-type: none"> • Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Análise morfológica de 400 espermatozoides/animal; 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 50mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
<p>Breslin et al., 2013</p>	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> (n=10): CBZ 1x dia via gavagem (20 e 400 mg/ kg/ dia) por 2 ou 7 dias. Análise: observação clínica diária; pesagem corporal (D₅) e consumo alimentar (D₁₋₅); coleta de amostras para dosagem hormonal (Inibina-B, LH, FSH, testosterona); necropsia, coleta, pesagem e preparo tecidual (testículos, epidídimos e outros órgãos) para histopatologia pós-eutanásia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓* peso corporal (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 7d); • ↑* peso testicular absoluto (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 2d); • ↓* nível Inibina B e ↑* nível FSH (somente grupo de 400 mg/ kg/dia por 7d); • Histopatologia: <ul style="list-style-type: none"> ○ Testicular: incidência e gravidade progressivas em relação à dose/ duração (≥ 20 mg/kg p.c./dia). Dilatação tubular, vacuolização de células de Sertoli, presença de espermátides gigantes multinucleadas. Com o aumento da duração/ dose, houve progressão dessas alterações - degeneração/ atrofia tubular, com degeneração de células germinativas; ○ Epididimal: detritos celulares intratubulares, edema intersticial, redução de espermatozoides e degeneração epitelial, sem relação clara entre severidade e dose/ duração. 	<ul style="list-style-type: none"> • Doses selecionadas a partir de estudos prévios de toxicidade testicular induzida por exposição de curto prazo ao CBZ; • Somente eventos de toxicidade severa, associada à perda significativa de epitélio espermatogênico (400 mg/kg/dia), foram correlacionados com ↓* nível Inibina B. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 20mg/kg p.c./dia (menor dose testada)</p>
<p>Liu et al., 2019</p>	<p>Pureza: Não informada;</p> <p>Linhagem: Camundongos ICR ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – administração diária de CBZ</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ motilidade espermática (todas as doses testadas) e ↓ contagem espermática (maior nível de dose - 10 mg/kg p.c.); • ↓ peso corporal (10 mg/kg p.c.); • ↓ proteínas de regulação da espermatogênese (VASA, B-myb, PGK2, CREM) e ↓ marcadores espermáticos (acrosina e PNA), nas doses 1 e 10 mg/kg p.c.; 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo; • Nos métodos, foi incluída análise de morfologia espermática, mas esses 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 0,1 mg/kg p.c./dia</p>

	(gavagem - 0; 0,1; 1,0 e 10 mg/kg p.c./dia; n=30) por 5 semanas. Avaliação de parâmetros espermáticos; dosagem de hormônios esteroidais e de ALT e AST plasmáticas; IMF para proteínas testiculares.	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ nº células de Leydig positivas para ERα e ↓ proteínas de produção de hormônios esteroides, nas doses 1 e 10 mg/kg p.c.; • Alteração nos níveis testiculares de marcadores de metilação de histonas e de DNA, indicando que o CBZ afetou adversamente esses marcadores epigenéticos, acarretando distúrbio na espermatogênese; • Dados indicaram que CBZ causou inibição da espermatogênese por meio da via ERα. 	dados não foram descritos nos resultados/ discussão.	(menor dose testada)
Yu et al., 2009	<p>Pureza: >98%;</p> <p>Linhagem: Ratos Wistar ♂ (30 - 35 dias);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 0, 20, 100 e 200 mg/kg p.c./dia, n = 24-25/ grupo) por 80 dias a ♂; acasalamento por 5d com ♀ não exposta. Eutanásia das ♀ no DG₁₉ (16 a 23 acasalamentos).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sem óbitos ou outros sinais de toxicidade sistêmica; sem alteração no p.c. e no ganho de p.c.; • ↑ índice de acasalamento, ↓ dose-dependente do índice de fertilidade; ↓ peso absoluto e relativo dos testículos; ↓ contagem de espermatozoide e motilidade (tendência na menor dose; alterações sg ≥ 100 mg/kg p.c./dia); • Níveis de LH com tendência de redução (sg apenas em 200 mg/kg p.c./dia). Sem alteração nos níveis de FSH e testosterona; • Histopatologia: túbulos seminíferos atróficos, ↓ células germinativas, ↑ descamação das células germinativas; • Citometria de fluxo: inibição da transformação meiótica e interferência na espermatogênese (tendência na menor dose; alterações sg ≥ 100 mg/kg p.c./dia); • As alterações na espermatogênese resultam na redução de fertilidade em machos em doses sem sinais de toxicidade sistêmica. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não foi feita análise estatística de tendência. 	<p>POSITIVO</p> <p>NOAEL=20mg/kg p.c./dia</p>
Evenson et al., 1987	<p>Pureza: 98,1%;</p> <p>Linhagem: Camundongos C57BL/6J x C3H/HeJ F1 ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (250, 500 e 1000 mg/kg p.c.) por 5d; subgrupo de 4 animais/ dose: eutanásia, pesagem, coleta e preparo histológico (testículos e epidídimo caudal) em 7d, 24d e 39d pós-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Redução em cerca de 25% no peso testicular, na maior dose testada (1000 mg / kg), em 7 e 24d, com recuperação observada em 39d pós-tratamento; • Medidas de citometria de fluxo em células testiculares mostraram diferenças, em relação ao controle, no % relativo de espermátides redondas (↑), em alongamento e alongadas (↓), em 7 e 24d, com retorno aos níveis basais em 39d pós-tratamento; • ↑ % médio de anormalidades morfológicas (cabeça) de espermatozoides do epidídimo caudal e ↑ na susceptibilidade de desnaturação do DNA nuclear, em 7, 24 (1000 mg/kg) e 39d pós-tratamento (500 e 1000 mg/kg), provavelmente associadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeno grupo amostral; • Análise morfológica da cabeça de 350 espermatozoides intactos/animal (4 animais/ dose/ intervalo) (RD = 200 - 400 células). • 200 células avaliadas por citometria de fluxo; • Determinação do nível de desnaturação do DNA por citometria de fluxo: 	<p>POSITIVO</p> <p>NOAEL = 250mg/kg p.c./dia</p>

	<p>tratamento; Análise por microscopia óptica e citometria de fluxo.</p>	<p>a alterações na estrutura da cromatina espermática induzidas pelo CBZ;</p> <ul style="list-style-type: none"> Dados sugerem uma maior susceptibilidade das células ao CBZ em determinados períodos da espermatogênese (diacinese entre meiose I e II durante 2-5d de exposição ao CBZ). 	<p>mudança metacromática da fluorescência verde (DNA original) para vermelho (DNA de fita simples);</p> <ul style="list-style-type: none"> Autores exibiram um diagrama com representação dos estágios espermatogoniais durante 5d de exposição ao CBZ, os quais originaram espermátides arredondadas, em alongamento, alongadas e espermatozoides do epidídimo caudal observados em 7, 24 e 39d pós-tratamento. 	
<p>Lu et al., 2004</p>	<p>Pureza: 99%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♀/♂ (3-4 semanas de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>:</p> <p>1) Reprodução: CBZ (675 mg/kg p.c./dia) administrado a ratos (n=5/grupo) ♂ via gavagem por 28 dias;</p> <p>2) Desenvolvimento: CBZ (200 mg/kg p.c./dia) administrado a ♀/♂ (n = 5/ sexo/grupo) via gavagem por 28 dias antes do acasalamento; Observação de parâmetros gestacionais e da prole até 6 semanas de idade.</p> <p>3) Indução receptor de andrógeno (por 5α-DHT): CBZ (25, 50, 100, 200, 400 e 800 mg/kg p.c./dia) administrado a ratos ♂ via gavagem por 56 dias.</p>	<p>1) Reprodução (675 mg/kg p.c./dia):</p> <ul style="list-style-type: none"> ↓ peso absoluto do testículo, sem alteração do peso do epidídimo; alterações histopatológicas testiculares (atrofia de túbulos seminíferos, ↓ de células espermáticas e ↑ células gigantes multinucleares) e epididimais (↓ concentração de espermatozoides ou azoospermia nos ductos eferentes); <p>2) Desenvolvimento (200 mg/kg p.c./dia):</p> <ul style="list-style-type: none"> Sem alteração testicular ou epididimária da prole masculina (27 ♂ de 5 ninhadas); Os autores relataram terem encontrado alterações nos órgãos reprodutivos das fêmeas (vagina, corto uterino, uretra), mas a incidência foi esporádica, além do número de animais avaliados ser muito baixo para qualquer conclusão. <p>3) Indução receptor de andrógeno:</p> <ul style="list-style-type: none"> ↑* dose-dependente nas concentrações de receptor de andrógeno nos testículos e epidídimo (≥25 mg/kg p.c./dia), sugestivas de ação do CBZ como desregulador endócrino. 	<ul style="list-style-type: none"> Falta de diversas informações relevantes na descrição dos materiais e métodos do estudo (n^o animais utilizados no estudo de indução de receptor, DPN em que foram observadas as malformações na prole feminina, se houve acompanhamento do dia de abertura do canal vaginal e verificação do dia do ciclo estral nas fêmeas que já estavam com o canal aberto); Apenas uma dose avaliada nos estudo de reprodução e de desenvolvimento; Dose muito alta para o estudo de reprodução; N^o animais insuficiente para análise da toxicidade para o 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL reprodução = 675 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p> <p>LOAEL desenvolvimento = 200 mg/kg p.c./dia</p>

			<p>desenvolvimento (apenas 5 ninhadas/ grupo), o que torna os resultados muito limitados;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reversão da toxicidade reprodutiva/ desenvolvimento induzida por CBZ nos grupos de cotratamento com flutamida, antagonista de receptor androgênico; • Autores sugerem que mecanismos dependentes de andrógenos e de receptores de andrógenos estão possivelmente envolvidos na toxicidade reprodutiva induzida por CBZ. 	
Pacheco et al., 2012	<p>Pureza: ≥ 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Fischer 344</i> (63-69 dias);</p> <p>Delineamento: Exposição a CBZ por gavagem (50 mg/kg p.c./dia, n = 6) por 3 meses. Avaliação da transcrição gênica, retenção da cabeça da espermatíde e níveis séricos de inibina B.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Não houve alteração no peso corporal, testicular ou do epidídimo; • ↑* espermátides com retenção de cabeça e ↓* inibina B. • Alteração significativa na expressão de oito transcritos - RNAm espermáticos podem ser utilizados como indicadores de dano testicular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo amostral pequeno; • Somente uma dose testada; • Estudo conduzido para identificar possíveis marcadores gênicos de dano testicular; • CBZ usado como modelo de dano testicular; • 50 mg/kg/dia foi considerada baixa dose (mínimos efeitos testiculares). 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
Erdos et al., 2013	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar-Han</i> (10 semanas);</p> <p>Delineamento: Exposição a CBZ (gavagem; n = 8; 100 ou 400 mg/kg</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Histopatologia: Degeneração dos túbulos seminíferos; • Níveis inibina B: inalterados; • Degeneração dos túbulos seminíferos e de células intersticiais, vacuolização dos túbulos seminíferos e aspermatogênese. Correlação entre a redução dos níveis de inibina B com a toxicidade às células de Sertoli para a maioria dos ensaios. 	<ul style="list-style-type: none"> • Grupo amostral pequeno; • CBZ usado como modelo de toxicidade testicular; • Estudo conduzido para caracterizar a inibina B como marcador de dano testicular. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia</p>

	p.c./dia) por 2 dias. Coleta de plasma por 24 horas; correlação entre alterações plasmáticas da inibina B e avaliação da toxicidade para a célula de Sertoli.			(menor dose testada)
Sakr e Shalaby, 2014	<p>Pureza: NI (aparentemente grau técnico).</p> <p>Linhagem: Ratos albinos <i>Wistar</i> sexualmente maduros.</p> <p>Delineamento: Exposição ao CBZ (gavagem; n = 25; 100 mg/kg p.c./dia) 3x/semana por 8 semanas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓* peso testicular e diâmetro/altura do epitélio seminífero; • Degeneração dos túbulos seminíferos, perda espermatogênica e apoptose; • Lúmen tubular com células gigantes multinucleadas, o que pode indicar falha em completar a citocinese durante a divisão mitótica ou meiótica das espermatogônias; • ↑* peroxidação lipídica (malondialdeído) e ↓* de atividades de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não foi feito controle negativo apenas com veículo por gavagem; • CBZ usado como modelo de dano testicular; • Somente uma dose utilizada. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 100 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
Moffit et al., 2013	<p>Pureza: ≥ 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar Han IGS</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ 1x dia via gavagem (200 mg/kg p.c./dia). Esquema de dosagem e análise (n = 10/ grupo): 4 semanas de exposição (D₁ – D₂₉), seguida de 4 semanas de recuperação (D₃₀ – D₅₈). Análise (em D₈, D₂₉ e D₅₈): pesagem corporal e testicular; dosagem sérica de Inibina B, FSH e LH; análise histopatológica dos testículos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Nenhuma alteração no peso corporal e testicular, nem nos níveis de Inibina B, LH e FSH, nos 3 intervalos de análise; • Alterações histopatológicas: a) dilatação no túbulo seminífero, com adelgaçamento do epitélio seminífero e maturação espermatogênica aparentemente normal (D₈ e D₂₉); b) degeneração de células germinativas, com espermatócitos redondos destacados e hiper cromáticos (D₈ e D₂₉); c) necrose tubular associada à perda do epitélio tubular, evidenciada por detritos celulares necróticos descamados preenchendo o lúmen do túbulo seminífero (todos os intervalos). 	<ul style="list-style-type: none"> • Esquema de dosagem semelhante a um estudo de ensaio clínico de Fase I em roedores, com fase pré-tratamento adicional; • Autores discutiram que o início precoce da disfunção testicular pode ter modulado as respostas da Inibina B antes do primeiro intervalo de análise (D₈). 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
Gray et al., 1989, 1990 Também avaliado por APMVA, 2009; EFSA, 2010; e	<p>Pureza: ≥95%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Long-Evans</i> e Hamsters Sírios;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: <u>1) Ratos:</u></p>	<p>Estudo 1 - Ratos Geração P :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sem alteração nos marcos de desenvolvimento (♀/♂); no peso e histologia dos ovários e demais órgãos (não-reprodutivos) analisados; • ≥ 50 mg/kg p.c./dia: ↓ dose-dependente na contagem de espermatozoides do epidídimo caudal (sg ≥100 mg/kg p.c./dia); atrofia testicular leve em 2-3 de 8 animais; ↑* alterações na 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo de 1989 corresponde a um artigo de revisão com descrição breve dos dados posteriormente apresentados no artigo de 1990; 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL reprodutivo / parental = 50 mg/kg p.c./dia;</p>

<p>PMRA, 2011 (considerado suplementar)</p>	<p>Geração P) grupo ctl: n = 12/ sexo; grupos tratados: 8/ sexo/ dose; CBZ administrado (gavagem – 0, 50, 100 200 ou 400 mg/kg p.c./dia) do desmame (D₂₁) ao DPN₂₀ (♀) ou até a necropsia (♂ - 104 a 106d). Prole F₁) Monitoramento da reprodução: 20 pares ctl e 22 pares expostos apenas durante gestação e lactação (via placenta e leite) (100 mg/kg p.c./dia).</p> <p><u>2) Hamsters:</u> CBZ (0, 400 mg/kg p.c./dia) administrado via gavagem (n = 12 a 15/sexo) do desmame (D₂₂) ao parto (♀) ou até a necropsia (♂).</p>	<p>morfologia espermática; s/ alteração nos hormônios testiculares e hipofisários. Manutenção da fertilidade nas duas menores doses;</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 200 mg/kg p.c./dia: ↓* e dose-dependente de ganho p.c. materno; ↓* tamanho ninhada e viabilidade fetal; ↓* peso prole no D₁; ↓* potencial reprodutivo atribuído aos efeitos nos ♂, com agrupamento em duas categorias: I) férteis: ↓* em 77% de reservas de espermatozoides caudais e em 50% no nº espermatozoides testiculares, ↓* motilidade espermática, ↓* em 25% no peso testicular, ↑ detritos nas amostras de espermatozoides caudais; s/ alteração em hormônios sexuais e hipofisários; II) inférteis: ↓ a 1% de reservas de espermatozoides caudais e em 90% no nº espermatozoides testiculares, ↓ em 50% no peso testicular, ↑ FSH séricos; atrofia testicular moderada/ severa em 5-6 de 8 animais; • 400 mg/kg p.c./dia: ↑* perda pós-implantação (sem ninhadas viáveis, reabsorção de todos os fetos), atribuída ao acasalamento com machos com severa atrofia testicular. <p>Prole F1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Crescimento, viabilidade e desempenho reprodutivo não foram afetados em 100 mg/kg p.c./dia; • Malformação fetal (hidrocefalia e cauda retorcida) em 2/7 ninhadas (100 mg/kg p.c./dia) e 1/3 ninhadas (200 mg/kg p.c./dia); <p>Estudo 2 - Hamsters</p> <p>Geração P:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nenhuma alteração nas ♀; Em ♂, desempenho reprodutivo bem menos afetado, em comparação a ratos no mesmo nível de dose: ↓* na contagem de espermatozoides no testículo e epidídimo caudal, alterações na morfologia espermática (4/ 12 animais), mas sem redução da fertilidade. <p>Prole F1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ↓* peso de testículos e de vesículas seminais, de contagem espermatozoides no epidídimo caudal; ↓* peso prole no D₁ e D₅. 	<ul style="list-style-type: none"> • Número insuficiente de animais parentais/ grupo; • Não utilizaram a ninhada como unidade experimental, formando mais de um par de acasalamento dentro do mesmo nível de dose; • Protocolo de exposição diferente da RD 416: exposição da prole F1 apenas via placenta e leite, sem administração da ST após esse período; • ♂ férteis: no mínimo, 65 milhões espermatozoides/ testículo e 20 milhões de espermatozoides de reserva caudal; ♂ inférteis: 2,7 a 43,6 milhões espermatozoides/ testículo e 0 a 6 milhões de espermatozoides de reserva caudal. 	<p>LOAEL prole = 100 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)</p> <p>(PMRA não estabeleceu valores de NOAEL – estudo considerado suplementar)</p>
<p>Carter et al., 1987</p>	<p>Pureza: 98%;</p>	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ fertilidade masculina (↓ nº fêmeas prenhes), com agravamento entre a 1ª (10/24 ♂ inférteis) e a 5ª (16/23 ♂ inférteis) semana; recuperação da fertilidade em apenas 4/ 16 	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica de reprodução em série usada para avaliar a fertilidade dos machos; 	<p>POSITIVO</p>

<p>apud APMVA, 2009; e PMRA, 2011 (considerado suplementar); EFSA, 2009.</p>	<p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado (gavagem; 0 ou 400 mg/kg p.c./dia; n = 24) por 10 dias consecutivos. Acasalamento de cada macho com uma nova fêmea: em 3d após início do tratamento e por até 32 semanas após o último dia de tratamento; avaliação das fêmeas, em 12 dias pós-acasalamento (período gestacional médio); e dos machos, em 35 semanas pós-tratamento.</p>	<p>♂ após 5-11 períodos consecutivos de reprodução, mas os 12 animais restantes permaneceram inférteis durante o restante do período (32 semanas pós-tratamento);</p> <ul style="list-style-type: none"> Histopatologia: atrofia severa de túbulos seminíferos (> 85%), com epitélio contendo apenas células de Sertoli, redução de espermatogônias e membrana basal espessa; menos de 2% dos túbulos continha espermatozoides; nos animais com recuperação da fertilidade, 13-85% dos túbulos permaneceram atróficos, em 245 dias pós-tratamento. 	<ul style="list-style-type: none"> Impossibilidade de avaliar efeito dose-dependente, pois somente um nível de dose foi utilizado. 	<p>LOAEL = 400 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
<p>Durand et al., 2017</p>	<p>Pureza: NI;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> – cultura de túbulo seminífero</p> <p>Delineamento: Estudo <i>ex vivo</i>: cultura de túbulos seminíferos incubada com CBZ (50nM) por 3 semanas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ↑ RNAm TP1 e TP2 dependentes de andrógeno e ↓ RNAm ERα, ERβ; Alteração na espermatogênese - ↓ espermátides redondas (precursores dos espermatozoides). 		<p>POSITIVO</p> <p>>50nM (estudo <i>ex vivo</i>)</p>
<p>Pisani et al., 2016</p>	<p>Pureza: 99,2%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Sprague-Dawley</i> - cultura de túbulos seminíferos;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>ex vivo</i>: eutanásia de ratos (23 dias de idade) não tratados, coleta de túbulos seminíferos e semeadura (D₀), originando culturas ctl e expostas ao CBZ (50nM ou 500nM) (n=3). Intervalos de coleta: D₇; D₁₄ e D₂₁; análise transcriptômica (com microarranjo) e citogenética</p>	<ul style="list-style-type: none"> Análise transcriptômica: verificação de resposta tempo-dependente; D₁₄: ↑* transcritos up-regulados (50nM); D₂₁: ↑* transcritos down-regulados (50nM e 500nM); Análise citogenética: <ul style="list-style-type: none"> Alteração na cronologia da prófase I (50nM): ↓* zigóteno (D₇) e diplóteno (D₇ e D₁₄); Anormalidades observadas no complexo sinaptonemal de espermatócitos (50nM; D₇ e D₁₄): asinapse (ausência de pareamento cromossômico) e fragmentação bivalente; Análise proteômica: <ul style="list-style-type: none"> D₇: maior nº proteínas diferencialmente expressas, em relação à cultura controle; D₁₄: ↓* proteínas CLUS e FUCO (relacionadas à disfunção testicular); 	<ul style="list-style-type: none"> A fim de contrabalançar a variação interanimal, agrupou-se testículos de 8 ratos/ cultura; utilizou-se a mesma população para semeadura em culturas controle e tratadas; Período de análise por 3 semanas corresponde ao desenvolvimento da espermatogênese e, em particular, mimetiza a puberdade; 	<p>POSITIVO</p> <p>>50nM (estudo <i>ex vivo</i>)</p>

	(marcação imunocitológica do complexo sinaptonemal), em células de Sertoli e germinativas; análise proteômica (espectrometria de massa) nas porções apical e basal do meio de cultura.	<ul style="list-style-type: none"> • Autores concluíram que CBZ inibe a espermatogênese ao atuar nos seguintes eventos moleculares: 1) sinalização de resposta de fase aguda (D₁₄ e D₂₁); 2) alteração da migração de células germinativas pelo epitélio seminífero (D₁₄ e D₂₁); 3) desregulação endócrina pela alteração da esteroidogênese (D₁₄ e D₂₁); 4) interrupção da meiose na prófase I (D₇; D₁₄ e D₂₁); 5) comprometimento dos futuros espermatozoides, com motilidade espermática (D₁₄ e D₂₁). 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise em triplicata, para cada dose e intervalo de análise; • Análise imunocitológica em 100-200 núcleos de espermatozoides: quantificação do % de núcleos em cada estágio da prófase (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno) e de núcleos com anormalidades no complexo sinaptonemal. 	
Goldman et al., 1989	<p>Pureza: 98,1%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Long-Evans</i> ♂;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – administração de CBZ (n = 7 - 8; gavagem; 50, 100, 200 ou 400 mg/kg p.c./dia) a partir do desmame (21^o dia), por 85 dias, com posterior acasalamento com ♀ não expostas por 20 dias para avaliação da fertilidade. Grupo ctl (n = 12). Eutanásia em 24h pós-tratamento para dosagens hormonais e análise da hipófise e hipotálamo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 50mg/kg p.c./dia: ↑GnRH hipotálamo anterior somente na menor dose; • ≥ 100mg/kg p.c./dia: ↑LH hipófise anterior • ≥ 200mg/kg p.c./dia: infertilidade em 4/8 animais com ↑* FSH sérico nos animais inférteis; ↑ LH sérico (somente em 200 mg/kg); • ≥ 400 mg/kg p.c./dia: ↑* LH hipofisário (sem distinção entre férteis e inférteis); • S/ alteração na prolactina, TSH e testosterona; • Sem alteração no peso da hipófise. 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudo buscou investigar se influências endócrinas extragonadais contribuem para a TR induzida por CBZ, com enfoque nos componentes do hipotálamo e hipófise do eixo reprodutivo masculino. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 50 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)</p>
Yamada et al. 2005	<p>Pureza: 98,9% (CBZ) e >98% (Benomil);</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Crj:CD(SD)IGS</i> ♀ (13 dias) e ♂ (4-5 semanas);</p> <p>Delineamento: <u>Estudo <i>in vivo</i></u> – Administração de benomil (gavagem; 100, 300 ou</p>	<p>Estudo <i>in vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Benomil não apresentou atividade androgênica, mas induziu atenuação sg dos aumentos induzidos por testosterona nos pesos da próstata ventral e vesículas seminais (≥ 100mg/kg p.c./dia); • Benomil não apresentou efeito estrogênico (ao invés de aumento no peso, induziu ↓* peso útero na maior dose; tendência de redução nas demais doses); • Benomil não alterou os níveis de andrógenos séricos. 		<p>NEGATIVO</p> <p>(Ausência de efeito estrogênico e androgênico).</p>

	<p>1000 mg/kg p.c./dia n = 6) por 3 ou 10 dias, para avaliação da estrogenicidade (ensaio uterotrófico) e da androgenicidade e antiandrogenicidade (ensaio de Hershberger), respectivamente. Perfil de expressão gênica da próstata.</p> <p><u>Estudo <i>in vitro</i></u> – Transativação dos receptores de estrógeno e andrógeno (antagonistas e agonistas) (Benomil e CBZ: 10, 100, 500 e 1000 nM).</p>	<ul style="list-style-type: none"> Alteração no padrão de expressão gênica, mas bem distinta de flutamida e dicloroetileno; Autores discutem que a redução nos pesos de órgãos induzida por Benomil não está relacionada a sua ação sobre receptor estrogênico/androgênico. <p>Estudo <i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> CBZ e Benomil s/ atividade agonista ou antagonista de receptores androgênicos e estrogênicos. 		
Rama et al, 2014	<p>Pureza: 97%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂/♀;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: 1) Ensaio uterotrófico – ratos DPN₁₈; n = 5-7: administração de CBZ isolado (200, 400, 800 mg/kg p.c./dia) ou associado ao estradiol (0,3 mg/kg p.c./dia) via gavagem por 3 dias; 2) Ensaio de Hershberger – ratos DPN₄₉; n = 5-6: administração de CBZ isolado (100, 200, 400 mg/kg p.c./dia) ou associado a testosterona (0,4 mg/kg p.c./dia) via gavagem por 10 dias.</p>	<p>1) Ensaio de Hershberger:</p> <ul style="list-style-type: none"> Efeito androgênico: ↑* peso próstata (somente em 100 mg/kg p.c./dia), sem alterar o peso de outros tecidos dependentes de testosterona; Ausência de efeito antiandrogênico; <p>2) Ensaio uterotrófico:</p> <ul style="list-style-type: none"> Sem evidência de efeito estrogênico ou antiestrogênico. 	<ul style="list-style-type: none"> Condução de dois ensaios: uterotrófico – avaliação da estrogenicidade/ antiestrogenicidade; e Hershberger – avaliação da androgenicidade/ antiandrogenicidade; Ensaios conduzidos conforme Diretrizes OPPTS 890.1400 e OPPTS 890.1600 (USEPA, 2009); Exclusão do grupo de maior dose (800 mg/kg p.c./dia) no ensaio uterotrófico por acentuada toxicidade sistêmica. 	<p>POSITIVO</p> <p>(Evidência de efeito androgênico somente na menor dose; Ausência de efeito estrogênico e antiestrogênico)</p>
Rajeswary et al., 2007	<p>Pureza: 99%;</p> <p>Linhagem: Ratos <i>Wistar</i> ♂ (90 dias);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i> – CBZ administrado via gavagem (n = 10/ grupo). Grupo 1: ctl; Grupo 2: 25 mg/kg p.c./dia (48 dias); Grupo 3:</p>	<p>Grupo 2: Nenhuma alteração no peso corporal, LH e prolactina; ↓* peso testicular; ↓* testosterona e estradiol séricos; ↓* atividade enzimas esteroideogênicas e antioxidantes; ↓* antioxidantes não enzimáticos; ↑* peroxidação lipídica e EROs.</p> <p>Grupo 3: Nenhuma alteração.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Apenas uma dose testada; Pouco tempo de avaliação para verificar alteração de LH. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 25 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>

	25 mg/kg p.c./dia (48 dias + 48 dias s/ dosagem). Dosagem de hormônios séricos, enzimas esteroidogênicas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos, peroxidação lipídica e ERO em células de Leydig.	Exposição crônica de baixa dose induziu toxicidade reprodutiva transitória (retorno aos níveis basais em 48 dias sem exposição), por meio de estresse oxidativo, com aumento de EROs e de peroxidação lipídica e danos às enzimas esteroidogênicas e à defesa celular antioxidante nas células de Leydig.		
Li et al., 2020	<p>Pureza: NI;</p> <p>Linhagem: espermatozoides de javali (<i>in vitro</i>) e camundongos ICR ♂ (<i>in vivo</i>);</p> <p>Delineamento: <i>In vitro:</i> espermatozoides incubados com CBZ (1, 10 ou 100 uM) por 24h. <i>In vivo:</i> CBZ administrado via gavagem (0,1, 1 ou 10 mg/kg p.c./dia; n = 30) por 5 semanas;</p>	<p><i>In vitro:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Não afetou a motilidade espermática ou a integridade acrossômica; • ↑ sutil no nível de EROs e de caspase 8 (marcador apoptose) em 100 µM; <p><i>In vivo:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 0,1 mg/kg p.c./dia: ↓* motilidade espermática e dos níveis de proteínas espermáticas VASA e A-myb; • ≥ 1 mg/kg p.c./dia: ↓* marcadores espermáticos PNA e acrosina e de células de Leydig positivas para 5-metilcitosina (marcador de metilação no DNA relevante na espermatogênese); ↓* células de Leydig positivas para receptor de estrógeno α. • 10 mg/kg p.c./dia: ↓* concentração de espermatozoide. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de controle positivo para estudo <i>in vitro</i>; • Resultados indicam que baixas doses de CBZ inibem a espermatogênese em camundongos, possivelmente envolvendo as vias de receptores estrogênicos e metilação de DNA. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 0,1 mg/kg p.c./dia (menor dose testada)</p>
Zari e Al-Attar, 2011	<p>Pureza: Alta pureza;</p> <p>Linhagem: Ratos (NI);</p> <p>Delineamento: CBZ administrado via gavagem (200 mg/kg p.c./dia; n = 10) por um mês.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de espermatócitos, espermátides e espermatozoides e perdas do processo espermatogênico; 	<ul style="list-style-type: none"> • CBZ usado como modelo de dano testicular; • Exposição subaguda 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 200 mg/kg p.c./dia (única dose testada)</p>
<p>Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; DAG= distância anogenital; ip= intraperitoneal; it= intratesticular; vo= via oral; ND= não determinado; NI = não informado; IHQ= imunohistoquímica; MT= mictotúbulo; p.c.= peso corpóreo; ERO= espécies reativas de oxigênio.</p>				

Efeitos observados no sexo feminino

Há um menor número de estudos disponíveis com investigação de parâmetros reprodutivos no sexo feminino. No estudo de Gray et al (1990), descrito no item anterior, verificou-se somente uma redução significativa e dose-dependente no ganho de peso corporal materno, além de redução no tamanho da ninhada e da viabilidade fetal, a partir da dose de 200 mg/kg p.c./dia. O desenvolvimento puberal e a ciclicidade estral não foram alterados, o que indica que o CBZ não afetou adversamente a função endócrina hipotálamo-hipófise-gonadal. A ausência de efeito sobre o peso ovariano, em comparação com o testículo, pode ser decorrente, em parte, das diferenças sexuais no desenvolvimento e função gonadal. Primeiramente, o epitélio germinativo com seus elementos espermatogênicos compreende a maior parte dos testículos, enquanto no ovário os oócitos são um componente menor em relação ao peso da gônada. Por esse motivo, pode ocorrer uma redução no número de oócitos sem afetar imediatamente o peso ovariano. Em segundo lugar, no sexo feminino, a ovogênese se inicia durante o desenvolvimento intrauterino, sendo interrompida em meiose I antes do nascimento, a qual se completa somente na fase puberal, com maturação em ovócito II e ovulação. Em contraste, no rato adulto macho, as células-tronco estão continuamente produzindo espermatogônias.

Outros estudos investigaram, em fêmeas de hamsters sírios, a janela crítica de exposição ao CBZ associada à indução de perda gestacional precoce. Perreault et al (1992) verificaram que a exposição anterior ao acasalamento, na tarde do proestro – correspondente à maturação do oócito (condensação cromossômica, formação do fuso e conclusão da meiose I) – ou no início da manhã do estro, após o acasalamento noturno – quando a presença de espermatozoides induz a segunda divisão meiótica, resultam em perda gestacional precoce (no menor nível de dose testada - 250 mg/kg p.c.), decorrente das perdas pré-implantação e pós-implantação precoce. Entretanto, esse efeito adverso não ocorreu quando o CBZ foi administrado um pouco depois (08:00 ou 09:00 h), após a ocorrência dos eventos de fertilização dependentes de microtúbulos.

Zuelke & Perreault (1995) também demonstraram que a exposição *in vivo* ou *in vitro* de oócitos de hamster a CBZ durante o período de fertilização pode levar à perda gestacional decorrente de aneuploidia zigótica ou de arrasto na meiose. Ainda, Jeffay et al (1996) administraram CBZ em dose única via gavagem (1.000 mg/kg p.c.), na tarde do proestro, e relataram atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação, além de alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização – aparecimento de múltiplos pronúcleos e múltiplos corpos polares secundários em um pequeno, mas significativo, número de zigotos. Essas anormalidades morfológicas, também observadas em zigotos após a exposição *in vitro* ao CBZ de oócitos na metáfase II (Zuelke & Perreault, 1995), foram consideradas resultantes do mecanismo de ação do CBZ no processo de montagem dos microtúbulos, posto que também se verificou indução de aneuploidia em ovócitos de metáfase II, durante a sua maturação. Isso constitui uma evidência indireta de que o CBZ alcançou os ovários e causou danos à formação do fuso meiótico, conforme discussão apresentada no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº 1309909). O conjunto de dados indicou que os efeitos observados foram decorrentes de toxicidade direta aos ovócitos,

descartando alterações endócrinas na ovulação, uma vez que o número de ovócitos ovulados foi semelhante entre animais tratados e controle. Ademais, verificou-se que não houve impacto sobre a taxa de fertilização de ovócitos, o que indica que, aparentemente, o CBZ não afetou a fertilização em si (Jeffay et al., 1996).

Ou seja, o mesmo tratamento agudo com CBZ, mas programado para coincidir com a fertilização (exposição durante a meiose II), também resultou numa redução no número de fetos, com perda pré e pós-implantação (Perreault et al., 1992), e produziu um aumento significativo de zigotos aneuplóides avaliados na metáfase da primeira divisão de clivagem (Zuelke & Perreault, 1995). No entanto, a extensão da perda gestacional e da aneuploidia em zigotos foi maior com a administração de CBZ no proestro, o que indica que o oócito parece ser mais sensível aos efeitos induzidos pelo CBZ durante a formação do fuso (maturação do oócito) do que após ele ter sido formado, com interrupção do oócito em metáfase II (Jeffay et al., 1996).

Por fim, a PMRA (2019) relatou atraso na abertura vaginal de fêmeas F1 e F2 na maior dose testada no estudo de uma geração estendida (EOGRTS, 2014) (Quadro 1), o único que avaliou esse parâmetro. Entre as causas de aumento da idade de abertura vaginal podem estar o antagonismo estrogênico ou a inibição da esteroidogênese. No entanto, a USEPA (2020) não relatou esse resultado para o mesmo estudo, concluindo que não houve efeitos relacionados à exposição nos marcos de desenvolvimento. Como a CREAV não teve acesso ao estudo, que foi descrito muito resumidamente por essas duas agências, não é possível se tirar uma conclusão assertiva com base nesse resultado.

Mecanismos de toxicidade no sexo feminino

Estudos mecanísticos *in vitro* corroboram a ocorrência de danos ao fuso induzidos por CBZ, por meio de marcação imunofluorescente de α -tubulina durante a maturação de oócitos em camundongos (Can & Albertini, 1997) e a fertilização *in vitro* em hamsters (Zuelke & Perreault, 1995). Tais resultados indicam que o CBZ afeta adversamente a montagem do fuso durante a maturação de oócitos e a integridade do fuso em oócitos em metáfase II. Como resultado, a meiose pode ser interrompida ou pode dar origem a zigotos com anormalidades, como as descritas acima.

Essa relação entre a exposição a compostos que se ligam à tubulina, como o CBZ, e a indução de aneuploidia na prole, já foi bem caracterizada na AOP 106 (<https://aopwiki.org/aops/106> - Figura 1), onde a ligação química à tubulina consiste no evento molecular iniciador (EMI) e os eventos-chave (EC) são: despolimerização dos microtúbulos, desorganização do fuso meiótico, alteração do alinhamento e da segregação cromossômica, com geração de oócitos aneuplóides. Tais oócitos, por sua vez, podem ser fertilizados e gerar descendentes aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole, o que corresponde ao evento adverso observável (*adverse outcome* - AO).

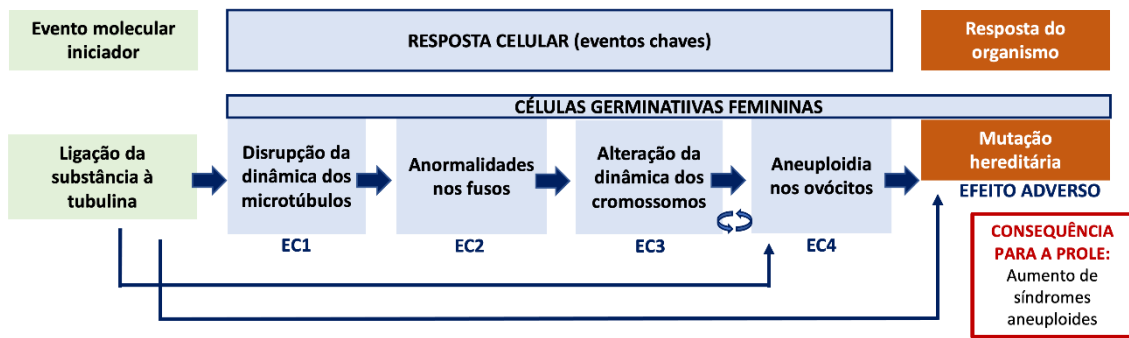


Figura 1. Via de Efeito Adverso para efeitos aneugênicos na prole decorrentes do evento molecular indicador (ligação de substâncias químicas à tubulina). Setas azuis representam a relação entre os eventos-chaves (EC). Essa relação pode ser adjacente (um evento-chave desencadeia a ocorrência do evento seguinte) ou não-adjacente (um evento-chave desencadeia outros eventos-chaves paralelamente à via principal).

Adaptado de: <https://aopwiki.org/aops/106>

O EMI foi devidamente investigado para o CBZ, incluído na AOP como exemplo de substância capaz de desencadeá-lo. Além disso, esse IA também foi associado ao EC de indução de aneuploidia em ovócitos de hamsters, conforme exposto nos parágrafos anteriores. Nessa AOP, estabeleceu-se como janela de sensibilidade para a indução de aneuploidia a exposição no período próximo à ovulação. Relatou-se ainda que, a depender da dose e do tempo de exposição, os compostos inibidores do fuso podem induzir aneuploidia em quase 100% dos oócitos. Então, os dados corroboram que a interrupção na dinâmica dos fusos é um alvo bastante sensível nas células germinativas femininas e que pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II.

Há ampla evidência que embasa essa AOP e o peso geral da evidência é forte. A etiologia da aneuploidia humana ainda não é bem compreendida, embora existam fortes evidências de uma ocorrência preferencial durante a meiose feminina I e uma correlação positiva com a idade materna. As semelhanças na oogênese entre roedores e humanos sugerem que o EMI e EC são conservados e ocorreriam em oócitos humanos também. Além disso, a sequência temporal dos eventos, desde as interações bioquímicas iniciais (EMI), que ocorrem dentro de segundos a minutos de exposição; passando pela ocorrência de danos ao fuso (EC2) e falha no alinhamento e segregação cromossômica na meiose (EC3), o que ocorre nas horas seguintes; até a formação e ovulação de um oócito aneuploide (EC4) e sua possível fertilização, que ocorreria posteriormente; é totalmente coerente e consistente com a linha do tempo de desenvolvimento e fertilização do oócito (Marchetti et al., 2016).

Na maioria dos casos, a condição aneuploide resultará na morte do conceito em diferentes estágios do desenvolvimento embriofetal, dependendo do cromossomo envolvido na aneuploidia, com ocorrência de aborto espontâneo precoce após alteração de cromossomos maiores ou que possuem mais genes, por exemplo. Quando os fetos aneuploides sobrevivem ao nascimento, eles manifestam diferentes síndromes, caracterizadas por sintomas variáveis, os quais também dependem do cromossomo específico envolvido (Marchetti et al., 2016).

Essa condição aneuploide que surge durante a meiose em células germinativas representa a anormalidade cromossômica mais comum no nascimento e é a principal causa de perda gestacional em humanos. É amplamente aceito que oócitos humanos são particularmente suscetíveis à indução de aneuploidia. Em humanos, a maioria dos embriões aneuploides sobrevivem até o estágio de blastocisto e são perdidos na época da implantação. Os dados de sobrevivência de aneuploidias em humanos geralmente correspondem aos de camundongos: aneuploidias dos cromossomos sexuais são viáveis e todas as monossomias autossômicas e a maioria das trissomias morrem antes do nascimento, com exceção das trissomias 13, 18 e 21 que, em alguns casos, sobrevivem algum tempo após o nascimento ou por um maior período (como no caso da síndrome de Down). Mesmo no caso da trissomia do 21, a mais viável das trissomias humanas, estima-se que aproximadamente 80% dos fetos têm morte intrauterina. Embora compatíveis com a vida, tais condições aneuploides apresentam uma gama de efeitos adversos à saúde, desde infertilidade (por exemplo, síndrome de Klinefelter devido ao cariótipo XXY) à grave deficiência mental e física e redução da expectativa de vida (por exemplo, síndrome de Edwards devido à trissomia 18) (Marchetti et al., 2016).

Limiar para os efeitos no sexo feminino

Não foi possível estabelecer um NOAEL para os efeitos do CBZ no sexo feminino (≥ 250 mg/kg), pois as doses testadas em todos os estudos disponíveis foram muito altas, e em todas foram observados efeitos adversos.

Os estudos discutem que certo nível de dano ao fuso é necessário para prejudicar a sua função, com relato de que em doses mais altas a severidade do efeito aneugênico aumenta, com mais oócitos contendo não um, mas vários cromossomos supranumerários. No entanto, é importante destacar que não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP. De modo geral, sabe-se que substâncias que interferem na montagem de microtúbulos já em baixas concentrações *in vitro* tendem a ser fortes aneugênicos *in vivo*, entretanto, não foi determinada uma relação quantitativa especificamente para essa comparação (Marchetti et al., 2016).

Então, com base na AOP acima descrita, conclui-se que a indução de aneugênese nos oócitos é o mecanismo por meio do qual o CBZ acarreta TR; e, conforme já discutido minuciosamente no Parecer Nº 1/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1309909](#), que avaliou o potencial de mutagenicidade do CBZ, há evidências robustas que demonstram uma maior susceptibilidade dos ovócitos à aneuploidia, em relação aos espermatozoides e às células somáticas, ainda com agravamento decorrente do processo de envelhecimento. Por essa razão, as doses obtidas de estudos com células somáticas ou germinativas masculinas não podem ser extrapoladas para ovócitos, não sendo possível, portanto, o estabelecimento adequado de um limiar de dose para a ocorrência desse efeito.

Quadro 4: Avaliação dos potenciais efeitos na função sexual ou capacidade reprodutiva feminina após exposição única ao CBZ.

Referência	Protocolo	Resultados segundo autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Jeffay et al., 1996	<p>Pureza: 95%;</p> <p>Linhagem: Hamsters sírios ♀;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única (gavagem, 1000 mg/kg p.c.; n = 10), na tarde do proestro (maturação meiótica dos oócitos). Eutanásia após a ovulação (D₁ pós-tratamento) para amostragem de oócitos e avaliação de aneuploidia; ou entre os DG₁₋₅, para avaliar a fertilização e o desenvolvimento do embrião pré-implantação, bem como enumerar sítios de implantação precoces.</p>	<ul style="list-style-type: none">• ↑* ovócitos aneuploides (37,2% CBZ x 13,5% controle), sem anormalidades estruturais;• Sem alteração na taxa de fertilização e no n^o ovócitos recuperados; ↓* n^o médio de sítios de implantação;• Atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação: ↑* embriões com menos de oito células (DG₃) e embriões que não atingiram o estágio de blastocisto (DG₄);• Dados indicam maior sensibilidade do oócito aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (maturação do ovócito) do que após esse processo.	<ul style="list-style-type: none">• CBZ usado como modelo de TR;• Dose muito alta;• O estudo de Perreault (1992) indicou que CBZ induziu perda gestacional precoce quando administrado na tarde do proestro ou no início da manhã do estro, mas não quando administrado após a fertilização;• 121 e 52 oócitos analisados, nos grupos CBZ e ctl, respectivamente.	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 1000 mg/kg p.c. (única dose testada)</p>
Perreault et al., 1992 Também avaliado por PMRA, 2011	<p>Pureza: 95%;</p> <p>Linhagem: Hamsters sírios (90 dias de idade);</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vivo</i>: CBZ administrado em dose única via gavagem durante a meiose I (n = 10; 0, 250, 500, 750 ou 1000 mg/kg p.c. – tarde do proestro – maturação do oócito) antes do acasalamento ou durante a meiose II (n = 5-6; 0 ou 1000 mg/kg p.c. – manhã do estro – fertilização) após o acasalamento noturno. Avaliação</p>	<ul style="list-style-type: none">• Durante a meiose I: ↓* % animais prenhes (≥750 mg/kg); ↓* n^o médio de filhotes vivos (≥250 mg/kg), efeito atribuível às perdas pré e pós-implantação.• Durante meiose II: ↓ n^o médio de filhotes vivos (s/ alteração no % fêmeas prenhes). Este efeito desapareceu com a administração de CBZ um pouco depois (08:00 ou 09:00 h), após a ocorrência dos eventos de fertilização dependentes de microtúbulos.• Exposição única a CBZ em momentos críticos, coincidente com eventos meióticos dependentes de microtúbulo, pode resultar em perda gestacional precoce.	<ul style="list-style-type: none">• Doses altas.• CBZ usado como modelo de TR: alteração de eventos dependentes de microtúbulos que ocorrem no oócito durante a maturação meiótica e fertilização;	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 250 mg/kg p.c. (menor dose testada)</p>

	do resultado da gestação no dia 15 (na tarde antes do parto).			
Zuelke & Perreault, 1995	<p>Pureza: 95%;</p> <p>Linhagem: Hamsters sírios;</p> <p>Delineamento: CBZ administrado durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 µg/mL) e <i>in vivo</i> (1000 mg/kg p.c., gavagem, n=6). Imunofluorescência de microtúbulos, cultura de zigotos e avaliação microscópica dos zigotos e embriões.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>: ↑* anormalidades morfológicas na cromatina materna de zigotos (6-8h; múltiplos corpos polares secundários, múltiplos pronúcleos e arrasto meiótico) e de embriões (26h; blastômeros micronucleados, múltiplos corpos polares secundários e arrasto na metáfase); ↓* embriões que progrediram para 2 células; Imunofluorescência confirmou danos aos fusos meióticos na fertilização <i>in vitro</i>; Dose única de CBZ, na fertilização <i>in vivo</i>, induziu aneuploidia no zigoto. 	<ul style="list-style-type: none"> Dose alta. Pequeno grupo amostral. Indução de superovulação não detalhada; Perda precoce na prenhez pode ser explicada por dois mecanismos: arrasto na meiose, sem clivagem do zigoto; ou indução de aneuploidia no zigoto, com subsequente arrasto no desenvolvimento. 	<p>POSITIVO</p> <p>LOAEL = 1000 mg/kg p.c. (única dose testada)</p>
Kawaratani et al., 2015	<p>Pureza: Benomil e CBZ (pureza não informada);</p> <p>Linhagem: Células MCF-7;</p> <p>Delineamento: Estudo <i>in vitro</i>: incubação com Benomil ou CBZ (1, 10, 25, 50 e 100 µM) por 72 h. Análise do ciclo celular e imunofluorescência.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inibição de histona desacetilase (HDAC) 1 e acúmulo de histona H3 acetilada em células MCF-7; ↑ proteína e RNAm aromatase, embora em altas concentrações; É provável tenha ocorrido aumento da atividade do promotor do gene da aromatase via acetilação da histona H3. 		<p>ND</p> <p>(Evidência inadequada para análise de desfechos reprodutivos induzidos pelo CBZ)</p>
<p>Legenda: *= alteração estatisticamente significativa; sg= significativa; CBZ= Carbendazim; ST= substância teste; ctl= controle; D= dia; DG= dia gestacional; DPN= dia pós-natal; ND= não determinado; NI = não informado; p.c.= peso corpóreo; TR= toxicidade reprodutiva.</p>				

Quadro 5. Estudo epidemiológico da literatura que avaliou o risco de exposição ao Carbendazim.

Referência	Delineamento	Resultados segundo o autor	Limitações, inconsistências e considerações relevantes	Conclusão
Petrelli et al. 2003	<p>Pureza: Não se aplica.</p> <p>Linhagem: Estudo em humanos;</p> <p>Delineamento: Estudo epidemiológico transversal.</p>	<ul style="list-style-type: none"> 48 trabalhadores expostos x 136 não-expostos: 30/48 foram expostos ao Benomil e 6/48 ao CBZ; ocorrência de 5 abortos espontâneos (13,9%); ↑sg taxa de aborto espontâneo entre os cônjuges de trabalhadores expostos. O 	<ul style="list-style-type: none"> Estudo apenas descritivo, com limitações inerentes ao desenho de estudos transversais: determinação da exposição e dos efeitos à saúde dentro do mesmo intervalo de tempo, viés de memória; baixo tamanho da amostra (reduz a precisão do risco estimado); ausência de análise detalhada quanto 	<p>INCONCLUSIVO</p> <p>(Evidência descartada da análise do WoE)</p>

<p>Entrevista de 184 trabalhadores de estufas (Itália, ano 2000), casados e com filhos. Registro de relato de exposição ocupacional dos homens e de exposições ocupacionais e domésticas de suas esposas durante a gravidez e nos meses antecedentes (primeira gravidez de cada casal para obtenção de observações independentes). Avaliação do risco de aborto espontâneo.</p>	<p>modelo de regressão logística confirmou o risco aumentado de aborto espontâneo (OR* = 11,8; IC 95% 2,3–59,6).</p> <p>* valor ajustado com base em todas as variáveis que podem ser fatores de confusão para o aborto espontâneo: idade, hábito de fumar, nível educacional de ambos os parceiros, tipo de trabalho do cônjuge e o tempo entre o resultado da gravidez e a entrevista.</p>	<p>ao período de exposição e de dados específicos do CBZ. Permitem apenas o levantamento de hipóteses, sem a possibilidade de testá-las, por isso esse tipo de estudo é excluído para a tomada de decisão.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Risco de aborto espontâneo foi avaliado por meio de um modelo de regressão logística. • Grupo controle: trabalhadores que não relataram uso de nenhum dos compostos listados. 	
---	--	---	--

CLASSIFICAÇÃO TOXICOLÓGICA DO CARBENDAZIM EM FUNÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS À FISIOLOGIA REPRODUTIVA

Não há estudos epidemiológicos satisfatórios que tenham avaliado os efeitos do CBZ em seres humanos.

Com base nos dados apresentados neste parecer, conclui-se que o CBZ possui evidência suficiente de efeitos tóxicos na fisiologia reprodutiva em animais experimentais, devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva, ou seja, como um produto que presumidamente possui o potencial de causar toxicidade reprodutiva em seres humanos (RDC nº 294/2019). Essa classificação do CBZ foi corroborada pelas demais agências internacionais (APVMA, 2009; EFSA, 2010; PMRA, 2019; USEPA, 2020), bem como pela FT (Innvitro, 2020), conforme detalhado no Quadro 6.

O Art. 33 da RDC nº 294/2019 prevê que o pedido de avaliação toxicológica será indeferido quando as etapas de identificação do perigo e de avaliação dose-resposta indicarem evidências suficientes para os produtos serem categorizados como presumidamente causadores de danos ao aparelho reprodutor, e não for possível determinar um limiar de dose para algum desses desfechos que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco. Assim, conforme discutido nos itens 2.1.1 e 2.1.2, não é possível determinar um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos induzidos pelo CBZ sobre a fisiologia reprodutiva, o que impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

CONCLUSÃO

As evidências fornecidas pelos estudos da literatura científica, pelos documentos das principais agências reguladoras internacionais e pelo relatório da FT indicam que o CBZ induz TR, com efeitos adversos sobre a fisiologia reprodutiva. No sexo masculino, os principais efeitos são alterações no peso testicular, aumento do diâmetro e atrofia dos túbulos seminíferos (contendo espermatogônias e fragmentos de células de Sertoli), obstrução de dutos eferentes, descamação de células germinativas, anormalidades morfológicas de espermátides e de espermatozoides, diminuições na contagem e na motilidade espermáticas e inibição da espermatogênese, culminando em infertilidade irreversível. No sexo feminino, os efeitos descritos foram geração de oócitos aneuplóides; atraso/interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação e redução nos sítios de implantação; alterações morfológicas nos óvulos após a fertilização; perda gestacional precoce decorrente de perda embrionária pré e pós-implantação; aumento significativo de zigotos aneuplóides, com incidência aumentada de síndromes na prole.

Esse conjunto de efeitos adversos foi associado à interação do CBZ à β -tubulina, com impedimento da montagem adequada dos fusos acromáticos nos processos de mitose e meiose ocorridos durante a espermatogênese/ovogênese, resultando em falha na segregação cromossômica e, conseqüentemente, aneuploidia nas células germinativas masculinas/femininas. Na ovogênese, especificamente, há um AOP bem caracterizado (AOP 106 - <https://aopwiki.org/aops/106>) para a relação entre a exposição a compostos que se ligam à tubulina, como o CBZ, e a indução de aneuploidia na prole. Entretanto, não foram desenvolvidos modelos quantitativos para a relação entre os eventos dessa AOP, o que impede o estabelecimento de limiar de dose seguro associado à ocorrência desses efeitos.

Além desse efeito antimitótico, outros mecanismos relacionados à despolimerização dos microtúbulos devem estar envolvidos na geração dos efeitos adversos relatados no sexo masculino, pois, além da formação adequada do fuso acromático, os MT desempenham diversas e importantes funções nas células, quais sejam: localização do centro da célula e posicionamento de diferentes organelas (aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndrias, dentre outras) no interior da célula; manutenção do formato e migração celular, transporte de carga dentro das células etc.

Desse modo, considerando que o CBZ é um agente aneugênico, conforme já discutido no Parecer nº 1/2021/SEI/CREAV/GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI nº [1309909](#)), e que induz os efeitos de TR descritos no presente parecer por meio desse mecanismo de aneuploidia nos oócitos e espermatozoides, além de outros efeitos testiculares diretos decorrentes da inibição da polimerização dos microtúbulos; considerando ainda que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses danos cromossômicos às células germinativas em humanos; e, principalmente, que não há evidências que permitam estimar uma dose segura *in vivo* em que não se espera a ocorrência desses efeitos sobre a fisiologia reprodutiva, os quais já foram verificados na menor dose testada (0,1 mg/kg p.c./dia), a qual é 500 vezes inferior ao LOAEL definido para aneugenicidade em células germinativas; conclui-se que não é possível definir um limiar de dose capaz de impedir a ocorrência dos efeitos sobre a fisiologia reprodutiva induzidos pelo CBZ (Quadro 6). Portanto, com base na avaliação do peso das evidências disponíveis e considerando a legislação brasileira, conclui-se que o CBZ preenche os requisitos proibitivos de registro estabelecidos pela Lei nº 7.802, de julho de 1989 e pelo Decreto nº 4.074, de janeiro de 2002; devendo ser classificado na Categoria 1B em função da toxicidade reprodutiva, conforme estabelecido na Seção 6, Anexo IV da RDC nº 294, de 29 de julho de 2019. Em tais dispositivos legais, fica estabelecida a proibição do registro de agrotóxicos categorizados como conhecidos ou presumidamente causadores de dano ao aparelho reprodutor, e para os quais não seja possível determinar um limiar de dose que permita proceder com as demais etapas da avaliação do risco.

Quadro 6. Conclusões das principais autoridades reguladoras de agrotóxicos acerca do potencial de toxicidade para a reprodução do CBZ, bem como proposta da FT e conclusão da Anvisa.

Agência reguladora	Conclusão	NOAEL/ LOAEL reprodução	Doses de referência para avaliação do risco de humanos	Observações
APMVA (2009)	Tóxico para a reprodução	LOAEL: 50 mg/kg p.c	<ul style="list-style-type: none"> IDA = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 2,5 mg/kg p.c./dia (estudo crônico de toxicidade em cães) com fator de incerteza padrão (100x). Considerado suficientemente protetivo dos efeitos para a reprodução. DRfA = 0,05 mg/kg p.c./dia - LOAEL de 50 mg/kg p.c./dia (toxicidade 	CBZ permitido em culturas alimentares.

			testicular em ratos) com fator de incerteza de padrão (100x) e fator adicional de 10x para a extrapolação de LOAEL para NOAEL.	
EFSA (2010)	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS).	NOAEL: 100 mg/kg p.c.	<ul style="list-style-type: none"> • IDA, DrfA e AOEL = 0,02 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 5x, devido aos efeitos terem sido observados na ausência de toxicidade materna. 	Em 2010, foi proposta pela EFSA a manutenção do CBZ. No entanto, a legislação europeia mudou e passou a prever a proibição de produtos classificados na categoria 1B, de forma que o CBZ está proibido na Comunidade Europeia.
PMRA (2011, 2019)	Tóxico para a reprodução	LOAEL: 50 mg/kg p.c (toxicidade testicular)	<ul style="list-style-type: none"> • DRfA/IDA mulheres em idade reprodutiva = 0,01 mg/kg p.c. - NOAEL de 10 mg/kg p.c. (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 10x devido às incertezas residuais quanto à sensibilidade potencial dos jovens. • DRfA homens acima de 13 anos = 0,16 mg/kg p.c. - LOAEL de 50 mg/kg p.c. (toxicidade testicular), com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 3x devido à falta de dados de aprendizagem e memória no EOGRTS e incertezas residuais quanto à sensibilidade potencial dos jovens. • IDA geral = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 9 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães) com fator de incerteza padrão (100x) e fator adicional de 3x devido às incertezas residuais 	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial. Definição de doses de referência e AR em razão de ser um metabólito do TM, que tem uso em culturas alimentares.

			quanto à sensibilidade potencial dos jovens.	
USEPA (2020)	Tóxico para a reprodução	NOAEL: 14 mg/kg p.c./dia (EOGRS: alterações histopatológicas e nos hormônios tireoidianos na dose de 53 mg/kg p.c./dia - considerado protetivo dos efeitos testiculares observados nos estudos via gavagem)	<ul style="list-style-type: none"> • IDA = 0,14 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 14 mg/kg p.c./dia (EOGRS) com fator de incerteza padrão (100x); • DRfA mulheres em idade reprodutiva = 0,10 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos) com fator de incerteza padrão (100x) (considerou-se que não há necessidade de um fator adicional para bebês e crianças pequenas, pois a base de dados para o CBZ é completa e não há incertezas residuais). 	Permitido apenas em plantas ornamentais e como preservativo industrial. Definição de doses de referência e AR em razão de ser um metabólito do TM, que tem uso em culturas alimentares.
JMPR (2005)	Tóxico para a reprodução	NOAEL: 50 mg/kg p.c. (estudo de toxicidade para o sistema reprodutor masculino em ratos; apoiado pelos estudos de indução de aneuploidia <i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • IDA = 0,03 mg/kg p.c./dia - NOAEL de 2,5 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães) com fator de segurança padrão (100x). • DRfA mulheres em idade fértil = 0,1 mg/kg p.c. - NOAEL de 10 mg/kg p.c./dia (toxicidade para o desenvolvimento em ratos e coelhos) com fator de segurança padrão (100x). • DRfA geral = 0,5 mg/kg p.c. - NOAEL de 50 mg/kg p.c. (toxicidade testicular e indução de aneuploidia <i>in vivo</i>) com fator de segurança padrão (100x). 	Para a população geral, inclusive crianças, efetuou-se a aplicação de fator de incerteza padrão (100x).
Proposta da FT (Innvitro, 2020)	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva	NOAEL: 7,5 mg/kg p.c./dia (toxicidade crônica em cães)	<ul style="list-style-type: none"> • IDA = 0,075 mg/kg p.c./dia – NOAEL de 7,5 mg/kg p.c./dia com fator de incerteza padrão (100x) 	

Anvisa	Tóxico para a reprodução - classificado na categoria 1B de toxicidade reprodutiva (GHS; RDC 294/2019).	NOAEL: ND LOAEL: 0,1 mg/kg p.c. (redução da motilidade espermática)	<ul style="list-style-type: none"> Não há dose experimental sem efeito adverso para a reprodução que possa ser considerado um limiar de acordo com a RDC nº 294/2019. Além disso, o mecanismo de ação subjacente a alguns efeitos adversos para a reprodução envolve a indução de aneuploidia em células germinativas pelo CBZ, para o qual também não foi definido limiar. 	A não definição de um limiar de dose seguro impede que se possa proceder com as demais etapas da avaliação do risco, conforme previsto na RDC nº 294/2019.
--------	--	--	--	--

REFERÊNCIAS

Adedara IA, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP, Farombi EO. **Kolaviron prevents carbendazim-induced steroidogenic dysfunction and apoptosis in testes of rats.** Environ Toxicol Pharmacol. May;35(3):444-53. doi: 10.1016/j.etap.2013.01.010. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23474402. 2013.

Akbarsha, M.A., Vijendrakumar, S., Kadalmani, B., Girija, R., Faridha, A. **Curative property of Withania somnifera Dunal root in the context of carbendazim-induced histopathological changes in the liver and kidney of rat.** Phytomedicine, Volume 7, Issue 6, 2000, Pages 499-507, [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80036-7](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80036-7).

Akbarsha MA, Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Hamid KS. **Spermatotoxic effect of carbendazim.** Indian J Exp Biol. 2001 Sep;39(9):921-4. PMID: 11831377.

APMVA. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. Office of Chemical Safety and Environmental Health Office of Health Protection. Chemical Review Program. **Human health risk assessment of Carbendazim.** Volume 2. December 2009.

Breslin WJ, Paulman A, Sun-Lin D, Goldstein KM, Derr A. **The inhibin B (InhB) response to the testicular toxicants mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), 1,3 dinitrobenzene (DNB), or carbendazim (CBZ) following short-term repeat dosing in the male rat.** Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):72-81. doi: 10.1002/bdrb.21043. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348955. 2013.

Campion S.N., Catlina N., Housemanb E.A., Hensleyc J., Suib Y., Gaidoc K.W., Wub Z., Boekelheide K. **Molecular alterations underlying the enhanced disruption of spermatogenesis by 2,5-hexanedione and carbendazim co-exposure.** Reproductive Toxicology, v. 33, p. 382–389. 2012.

Carter SD, Hess RA, Laskey JW. **The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats.** Biol Reprod. Oct;37(3):709-17. doi: 10.1095/biolreprod37.3.709. PMID: 3676414. 1987.

Correa LM, Nakai M, Strandgaard CS, Hess RA, Miller MG. **Microtubules of the mouse testis exhibit differential sensitivity to the microtubule disruptors Carbendazim and colchicine.** Toxicol Sci. 2002 Sep;69(1):175-82. doi: 10.1093/toxsci/69.1.175. PMID: 12215672.

Dere, E., Wilson, S., Anderson, L., Boekelheide, K. **Sperm Molecular Biomarkers Are Sensitive Indicators of Testicular Injury Following Subchronic Model Toxicant Exposure.** Toxicological Sciences. 153. kfw137. 10.1093/toxsci/kfw137. 2016.

Durand P, Martin G, Blondet A, Gilleron J, Carette D, Janczarski S, Christin E, Pointis G, Perrard MH. **Effects of low doses of carbendazim or iprodione either separately or in mixture on the pubertal rat seminiferous epithelium: An ex vivo study.** Toxicol In Vitro. 2017 Dec;45(Pt 3):366-373. doi: 10.1016/j.tiv.2017.05.022. Epub May 30. PMID: 28576679. 2017.

EFSA. European Food Safety Authority. **Draft Re-Assessment Report. Carbendazim.** Volume 3. Annex B-6- Toxicology and Metabolism. 16 July 2009a.

EFSA. European Food Safety Authority. **Conclusion on Pesticide Peer Review. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance carbendazim.** EFSA Journal 2010; 8(5):1598. 2010.

EOGRTS. **An F1-Extended Two-Generation Reproductive Toxicity Study with Carbendazim in the Wistar Rat.** DACO 4.8. 2014. Apud USEPA (2020; MRID49547201) e PMRA (2019; PMRA#2490664).

Erdos Z, Pearson K, Goedken M, Menzel K, Sistare FD, Glaab WE, Saldutti LP. **Inhibin B response to testicular toxicants hexachlorophene, ethane dimethane sulfonate, di-(n-butyl)-phthalate, nitrofurazone, DL-ethionine, 17-alpha ethinylestradiol, 2,5-hexanedione, or carbendazim following short-term dosing in male rats.** Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. Feb;98(1):41-53. doi: 10.1002/bdrb.21035. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23348767. 2013.

Evenson DP, Janca FC, Jost LK. **Effects of the fungicide methyl-benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) on mouse germ cells as determined by flow cytometry.** J Toxicol Environ Health. 20(4):387-99. doi: 10.1080/15287398709530992. PMID: 3560261. 1987.

Goldman JM, Rehnberg GL, Cooper RL, Gray LE Jr, Hein JF, McElroy WK. **Effects of the benomyl metabolite, carbendazim, on the hypothalamic-pituitary reproductive axis in the male rat.** Toxicology. Jul 17;57(2):173-82. doi: 10.1016/0300-483x(89)90163-7. PMID: 2501910. 1989.

Gotoh Y, Netsu J, Nakai M, Nasu T. **Testicular damage after exposure to carbendazim depends on the number of patent efferent ductules.** J Vet Med Sci. Jul;61(7):755-60. doi: 10.1292/jvms.61.755. PMID: 10458097. 1999.

Gray LE Jr, Ostby J, Linder R, Goldman J, Rehnberg G, Cooper R. **Carbendazim-induced alterations of reproductive development and function in the rat and hamster.** Fundam Appl Toxicol. Aug;15(2):281-97. doi: 10.1016/0272-0590(90)90055-o. PMID: 2227156. 1990.

Hess R.A.; Nakai M. **Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl.** Histology and Histopathology, v. 15, p. 207-224. 2000.

Hood, Ronald D. **Developmental and reproductive toxicology a practical approach: a practical approach.** 3. ed. London: Informa Healthcare, 2012.

Innvitro Pesquisa & Desenvolvimento S/S Ltda (Vilella et al). P16/20-4 - **Relatório de Reavaliação do Ingrediente Ativo Carbendazim. Reprodução e Desenvolvimento.** Contratante: FT Carbendazim. Revisão 1, 28p., 09/10/2020.

Jeffay SC, Libbus BL, Barbee RR, Perreault SD. **Acute exposure of female hamsters to carbendazim (MBC) during meiosis results in aneuploid oocytes with subsequent arrest of embryonic cleavage and implantation.** *Reprod Toxicol.* May-Jun;10(3):183-9. doi: 10.1016/0890-6238(96)00020-2. PMID: 8738554. 1996.

JPMR/FAO (2005). **Carbendazim 87–106**, 2005.

Kadalmani B, Girija R, Faridha A, Akbarsha MA. **Male reproductive toxic effects of carbendazim: hitherto unreported targets in testis.** *Indian J Exp Biol.* Jan;40(1):40-4. PMID: 12561966. 2002.

Kawaratani Y, Matsuoka T, Hirata Y, Fukata N, Nagaoka Y, Uesato S. **Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7.** *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015 Jan;39(1):292-9. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.032. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25543211.

Kawata R, Kagawa T, Koya Y, Kajiyama H, Oda S, Yokoi T. **Exploration of small RNA biomarkers for testicular injury in the serum exosomes of rats,** *Toxicology*, Volume 440, 2020.

Li H., Zhangb P., Zhao Y., Zhangc H. **Low doses of carbendazim and chlorothalonil synergized to impair mouse T spermatogenesis through epigenetic pathways.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 188, p. 1-10. 2020.

Lim J., Miller M.G. **Role of testis Exposure Levels in the Insensitivity of Prepubertal Rats to Carbendazim-Induced Testicular Toxicity.** *Fundamental and Applied Toxicology*, v. 37, p. 158-167. 1997a.

Lim J., Miller MG. **The Role of the Benomyl Metabolite Carbendazim in Benomyl-Induced Testicular Toxicity,** *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 142, Issue 2, Pages 401-410, ISSN 0041-008X, <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8042>. 1997b.

Liu J, Zhang P, Zhao Y, Zhang H. **Low dose carbendazim disrupts mouse spermatogenesis might Be through estrogen receptor related histone and DNA methylation.** *Ecotoxicol Environ Saf.* 176:242-249. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.103. Epub 2019 Mar 30. PMID: 30939404. 2019.

Lu SY, Liao JW, Kuo ML, Wang SC, Hwang JS, Ueng TH. **Endocrine-disrupting activity in carbendazim-induced reproductive and developmental toxicity in rats.** *J Toxicol Environ Health A.* Oct 8;67(19):1501-15. doi: 10.1080/15287390490486833. PMID: 15371226. 2004.

Marchetti F, Massarotti A, Yauk CL, Pacchierotti F, Russo A. **The adverse outcome pathway (AOP) for chemical binding to tubulin in oocytes leading to aneuploid offspring.** *Environ Mol Mutagen.* 2016 Mar;57(2):87-113. doi: 10.1002/em.21986. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26581746. 2016.

Markelwicz R.J. Jr., Hall S.J, Boekelheide K. **2,5-Hexanedione and Carbendazim Coexposure Synergistically Disrupts Rat Spermatogenesis Despite Opposing Molecular Effects on Microtubules.** *Toxicological Sciences*, v. 80, p. 92–100. 2004.

- Moffit JS, Bryant BH, Hall SJ, Boekelheide K. **Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis.** Toxicol Pathol. Aug;35(5):719-27. doi: 10.1080/01926230701481931. PMID: 17763286. 2007.
- Moffit, J., Her, L., Mineo, A., Knight, B., Phillips, J., Thibodeau, M.. **Assessment of Inhibin B as a Biomarker of Testicular Injury Following Administration of Carbendazim, Cetrorelix, or 1,2-Dibromo-3-Chloropropane in Wistar Han Rats.** Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology. 98. 10.1002/bdrb.21045. 2013.
- Nakai M, Hess RA, Moore BJ, Guttroff RF, Strader LF, Linder RE. **Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive system in the rat.** J Androl. 1992 Nov-Dec;13(6):507-18. PMID: 1293130.
- Nakai, M., B. Moore and R. Hess. **Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis.** The Anatomical Record 235: n. pag. 1993.
- Nakai M, Hess RA. **Morphological changes in the rat Sertoli cell induced by the microtubule poison carbendazim.** Tissue Cell. 1994 Dec;26(6):917-27. doi: 10.1016/0040-8166(94)90041-8. PMID: 7886678.
- Nakai M, Hess RA, Netsu J, Nasu T. **Deformation of the rat Sertoli cell by oral administration of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate).** J Androl. 16(5):410-6. PMID: 8575980. 1995.
- Nakai, M., Hess, R.A., Matsuo, F., Gotoh, Y., Nasu, T. **Further observations on carbendazim-induced abnormalities of spermatid morphology in rats,** Tissue and Cell, Volume 29, Issue 4, Pages 477-485, ISSN 0040-8166, [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(97\)80033-X](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(97)80033-X). 1997a.
- Nakai M, Hess RA. **Effects of carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate; MBC) on meiotic spermatocytes and subsequent spermiogenesis in the rat testis.** Anat Rec. 1997 Mar;247(3):379-87. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199703)247:3<379::AID-AR9>3.0.CO;2-P. PMID: 9066915. 1997b.
- Nakai M, Toshimori K, Yoshinaga K, Nasu T, Hess RA. **Spermatids of prepubertal male rats are susceptible to carbendazim during early spermiogenesis.** Arch Histol Cytol. (5):433-7. doi: 10.1679/aohc.61.433. PMID: 9990427. 1998a.
- Nakai, M., Toshimori, K., Yoshinaga, K. et al. **Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis.** Cell Tissue Res 294, 145–152. <https://doi.org/10.1007/s004410051164>. 1998b.
- Nakai M, Miller MG, Carnes K, Hess RA. **Stage-specific effects of the fungicide carbendazim on Sertoli cell microtubules in rat testis.** Tissue Cell. 2002 Apr;34(2):73-80. doi: 10.1016/s0040-8166(02)00006-x. PMID: 12165241.
- OECD. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris; 2018.
- Pacheco SE, Anderson LM, Sandrof MA, Vantangoli MM, Hall SJ, Boekelheide K. **Sperm mRNA transcripts are indicators of sub-chronic low dose testicular injury in the Fischer 344 rat.** PLoS One. 7(8):e44280. doi: 10.1371/journal.pone.0044280. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22952946; PMCID: PMC3432073. 2012.

Petrelli G, Figà-Talamanca I, Lauria L, Mantovani A. **Spontaneous abortion in spouses of greenhouse workers exposed to pesticides.** *Environ Health Prev Med.* Jul;8(3):77-81. doi: 10.1007/BF02897919. PMID: 21432103; PMCID: PMC2723369. 2003.

Perreault SD, Jeffay S, Poss P, Laskey JW. **Use of the fungicide carbendazim as a model compound to determine the impact of acute chemical exposure during oocyte maturation and fertilization on pregnancy outcome in the hamster.** *Toxicol Appl Pharmacol.* Jun;114(2):225-31. doi: 10.1016/0041-008x(92)90072-z. PMID: 1609414. 1992.

Pisani C, Voisin S, Arafah K, Durand P, Perrard MH, Guichaoua MR, Bulet P, Prat O. **Ex vivo assessment of testicular toxicity induced by carbendazim and iprodione, alone or in a mixture.** *ALTEX.* 2016;33(4):393-413. doi: 10.14573/altex.1601253. PMID: 27155993. 2016.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Carbendazim.** PRD2011-04. 2011.

PMRA. Health Canada Pest Management Regulatory Agency. **Proposed Registration Decision. Thiophanate-Methyl and Its Associated End-use Products.** PRVD2019-07. 28 June 2019.

Rama EM, Bortolan S, Vieira ML, Gerardin DC, Moreira EG. **Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim.** *Regul Toxicol Pharmacol.* 2014 Aug;69(3):476-86. doi: 10.1016/j.yrtph.2014.05.016. Epub May 24. PMID: 24863245. 2014.

Rajeswary S, Kumaran B, Ilangovan R, Yuvaraj S, Sridhar M, Venkataraman P, Srinivasan N, Aruldhas MM. **Modulation of antioxidant defense system by the environmental fungicide carbendazim in Leydig cells of rats.** *Reproductive Toxicology*, Volume 24, Issues 3–4, 2007.

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction prevents disruption of histomorphometry and marker enzymes of testicular function in carbendazim-treated rats.** *Andrologia.* Dec;49(10). doi: 10.1111/and.12782. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28102023. 2017a

Salihu M, Ajayi BO, Adedara IA, de Souza D, Rocha JBT, Farombi EO. **6-Gingerol-rich fraction from Zingiber officinale ameliorates carbendazim-induced endocrine disruption and toxicity in testes and epididymis of rats.** *Andrologia.* Jun;49(5). doi: 10.1111/and.12658. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546232. 2017b.

Sakr SA, Shalaby SY. **Carbendazim-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats: ameliorative effect of licorice aqueous extract.** *Toxicology and Industrial Health*;30(3):259-267. 2014.

Upadhyay, J., Rana, M., Bisht, S. S., Rana, A., Durgapal, S., & Juyal, V. **Biomarker responses (Serum biochemistry) in pregnant female wistar rats and histopathology of their neonates exposed prenatally to pesticides.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55, 1–9. 2019.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive toxicity risk assessment.** EPA/630/R-96/009. Federal Register 61(212), 56274–56322. 1996.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Memorandum. **Thiophanate-Methyl and Carbendazim: Amended Draft Human Health Risk Assessment for Registration Review.** Decision no 551693. DP D458977. 27 August 2020.

Yamada T., Sumida K., Saito K., Ueda S., Yabushita S., Sukata T., Kawamura S., Okuno Y., Seki T. **Functional genomics may allow accurate categorization of the benzimidazole fungicide**

Benomyl: lack of ability to act via steroid-receptor-mediated mechanisms. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 205, p. 11–30. 2005.

Yu G, Guo Q, Xie L, Liu Y, Wang X. **Effects of subchronic exposure to carbendazim on spermatogenesis and fertility in male rats.** Toxicol Ind Health. Feb;25(1):41-7. doi: 10.1177/0748233709103033. PMID: 19318503. 2009.

Zari T.A., Al-Attar A.M. **Therapeutic effects of olive leaves extract on rats treated with a sublethal concentration of carbendazim.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v. 15, p. 413-426. 2011.

Zuelke K.A.; Perreault, S.D. **Carbendazim (MBC) Disrupts Oocyte Spindle Function and Induces Aneuploidy in Hamsters Exposed During Fertilization (Meiosis 11).** Molecular Reproduction and Development, v. 42, p. 200-209. 1995.



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Muratori Aguiar, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 13/07/2021, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Camila Queiroz Moreira, Especialista em Regulação e Vigilância Sanitária**, em 13/07/2021, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 15/07/2021, às 19:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1517596** e o código CRC **737B14E5**.



PARECER Nº 26/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Processo nº 25351.945793/2019-57

Interessado: Coordenação de Reavaliação, Gerência de Monitoramento e Avaliação do Risco, GGTOX

Assunto: Analisa os dados do Sisagua em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA

Avalia a exposição dietética da população brasileira ao Carbendazim pelo consumo de água por meio da análise dos dados do Sisagua no período de 2014 a 2019, em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA.

Resumo

Em complemento ao PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA, o Sisagua foi analisado detalhadamente para os anos de 2014 a 2019 em relação à detecção de Carbendazim (CBZ). Os bancos de dados foram obtidos do portal de dados abertos do governo federal e, após exclusão dos registros com inconsistências, uma análise descritiva foi realizada. Foram obtidos 68.941 registros e 5.624 (8,2%) foram excluídos por apresentarem inconsistências. Foram analisados 63.317 registros de amostras e destas, 15,45% (9.784/63.310) apresentaram detecção de CBZ, com mediana da concentração em 2 µ/L (mínimo 0,01 e máximo de 662,0). Duas amostras apresentaram valores acima do valor máximo permitido (VMP). Nas amostras coletadas nos sistemas de abastecimento de água (SAA), 16,44% (6.413/39.008) detectaram CBZ, sendo que 13,12% (3.761/28.660) das amostras coletadas na saída do tratamento e 28,58% (1.041/3.519) das amostras coletadas no sistema de distribuição, foram amostras com detecção de CBZ. Entre as amostras coletadas nas soluções alternativas coletivas (SAC), 10,33% (2.383/23.060) foram amostras com detecção de CBZ. Nas SAC, entre as amostras coletadas no ponto de consumo, 22,5% (198/898) foram amostras com detecção de CBZ. Das amostras obtidas dos SAI, 79,10% (988/1.249). Conclui-se que a exposição dietética ao CBZ na água de abastecimento humano no Brasil é relevante e os métodos de tratamento não foram capazes de eliminar os resíduos de CBZ antes de chegar aos consumidores da água.

1. INTRODUÇÃO

A CREAV elaborou o PARECER Nº 3/2021/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA (SEI 1392941) que incluiu a análise dos dados do Sisagua. As primeiras análises do Parecer nº 3 suscitaram a necessidade de detalhar os dados de detecção do Carbendazim (CBZ) no âmbito do Sisagua. Neste sentido, para melhor compreender como se dá a interpretação dos dados do Sisagua no âmbito da Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM), responsável pela gestão do Sisagua, a GEMAR oficiou a CGVAM solicitando esclarecimentos quanto a interpretação do campo "resultados" (Ofício 4 – SEI 1604051). A CGVAM respondeu com os esclarecimentos necessários para a elaboração deste Parecer.

O presente Parecer descreve os dados de detecção do CBZ nas amostras analisadas no âmbito do Sisagua de 2014 a 2019.

2. MÉTODO

Os bancos de dados foram obtidos, em 09 de março de 2021, do portal de dados abertos do governo federal (<https://dados.gov.br/>), buscando-se a palavra Sisagua. A busca retornou 11 possibilidades. Os bancos selecionados foram o "SISAGUA - Vigilância (demais parâmetros): Dados do monitoramento da qualidade da água realizado pelo setor saúde conforme planos de monitoramento específicos, contemplando os resultados de análises de qualidade da água de alta complexidade." e o "SISAGUA - Controle Semestral: Dados do monitoramento da qualidade da água realizado pelo prestador de serviço em frequência superior à mensal, contemplando os resultados das análises de qualidade da água de alta complexidade".

Os bancos de dados foram unificados e foram selecionados os registros que apresentavam o campo "Parâmetro" preenchido com o texto 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L'. A seguir, os registros inconsistentes foram excluídos. Foram considerados inconsistentes, conforme orientação do Ofício 75/2021/CGVAM/DSASTE/SVS/MS (SEI 1634236), os registros que apresentaram qualquer uma das seguintes condições:

- registros com resultado 'menor que LQ', sem o valor de LQ;
- registros com resultado 'menor que LD', sem o valor de LD;
- registros com valor de LD ou LQ igual a 0;
- registros com valor de LD superior ou igual ao valor de LQ;
- registros com resultado quantificado, igual a 0 (zero);
- registros com resultado quantificado, inferior ao LQ;
- registros com valor de resultado quantificado, igual ou inferior ao LD;
- registros com valor de resultado deixado em branco.

Para os registros restantes, aqueles com valor de resultado quantificado foram considerados "amostras com detecção de CBZ". Os registros que apresentavam o campo 'resultado' preenchido com 'menor que LD' ou 'menor que LQ' foram consideradas neste parecer como "amostras sem detecção do CBZ".

Os dados foram analisados no software Epiinfo 7.2.4.0.

3. RESULTADOS

O Sisagua registrou, de 2014 a 2019, 68.941 amostras nas quais o parâmetro 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L' foi analisado. Foram considerados inconsistentes 5.624 (8,2%) registros, restando 63.317 registros válidos. As análises descritivas a seguir se referem a estes 63.317 registros.

A tabela 1 apresenta a distribuição das amostras segundo a UF. Observa-se, como já destacado no Parecer nº 3, uma representatividade inadequada por localidade em relação a coleta das amostras para análise do parâmetro 'Carbendazim + benomil - VMP: 120,0 µg/L'. Devido a esta representatividade inadequada, optou-se por não avaliar os dados em nível estadual ou municipal.

Tabela 1. Distribuição das coletas de amostras de água para análise do parâmetro 'Carbendazim + benomil' segundo a UF, Siságua 2014 a 2019.

UF	Total	%
AC	0	0,00
AL	3	0,00
AM	75	0,11
AP	0	0,00
BA	639	0,93
CE	792	1,15
DF	193	0,28
ES	1.305	1,89
GO	212	0,31
MA	2	0,00
MG	4.276	6,20
MS	2.331	3,38
MT	1.055	1,53
PA	53	0,08
PE	0	0,00
PB	141	0,20
PI	22	0,03
PR	8.127	11,79
RJ	710	1,03
RN	0	0,00
RO	0	0,00
RR	0	0,00
RS	1.388	2,01
SC	3.866	5,61
SE	302	0,44
SP	41.947	60,84
TO	1.502	2,18
TOTAL	68.941	100,00

Entre 2014 e 2019, 15,45% (9.784/63.317) das amostras foram consideradas amostras com detecção de CBZ. A mediana da concentração de CBZ foi de 2 µ/L (mínimo 0,01 e máximo de 662,0). Duas amostras (0,003%) apresentaram detecção de CBZ acima do VMP de 120,0 µg/L.

Em relação ao responsável pela coleta e análises, as empresas prestadoras de serviço coletaram 94,98% das amostras (60.139/63.317) amostras e o setor saúde coletou 5,02% (3.178/63.317).

Em relação ao tipo de sistema de abastecimento, 61,61% (39.008/63.317) das amostras foram coletadas em sistema de abastecimento de água (SAA), 36,42% (23.060/63.317) das amostras foram obtidas de solução alternativa coletiva (SAC) e 1,97% (1.249/63.317) das amostras foram obtidas de solução alternativa individual (SAI). A tabela 2 apresenta a distribuição das faixas de resultados em função do tipo de sistema de abastecimento.

Tabela 2. Distribuição dos resultados das amostras coletadas para detecção do parâmetro 'Carbendazim + benomil' segundo o tipo de sistema de abastecimento, Sisagua 2014 – 2019.

	Amostras com detecção n (%)				Amostras sem detecção n (%)		Total (n)
	<=1	>1-60	>60-120	>120*	MENOR_LD	MENOR_LQ	
	Total n (%)				Total n (%)		
SAA	2.553 (6,54)	3.345 (8,58)	514 (1,32)	1 (0,003)	4.080 (10,46)	28.515 (73,10)	39.008
		6.413 (16,44)			32.595 (83,56)		
SAC	1.104 (4,79)	1.152 (5,00)	126 (0,55)	1 (0,004)	1.103 (4,78)	19.574 (84,88)	23.060
		2.383 (10,33)			20.677 (89,67)		
SAI	258 (20,66)	730 (58,45)	0 (0,00)	0 (0,00)	19 (1,52)	242 (19,38)	1.249
		988 (79,10)			261 (20,90)		
TOTAL	3.915 (6,18)	5.227 (8,26)	640 (1,01)	2 (0,003)	5.202 (8,22)	48.331 (76,34)	63.317**
		9.784 (15,45)			53.533 (84,55)		

SAC – solução alternativa coletiva; SAA – Sistema de abastecimento de água; Vigilância – amostras coletadas pelo setor saúde;

* Resultado maior que o valor máximo permitido. ** Inconsistências excluídas da análise.

Entre as amostras coletadas nos SAA, as amostras com detecção de CBZ representaram 16,44% (6.413/39.008). Para as amostras coletadas na saída do tratamento, 13,12% (3.761/28.660) foram amostras com detecção de CBZ. Para as amostras coletadas no sistema de distribuição, 24,60% (1.062/4.317) foram amostras com detecção de CBZ.

Das amostras coletadas nas SAC, 10,33% (2.383/23.060) foram amostras com detecção de CBZ. Destaca-se que 22,5% (198/898) das amostras coletadas no ponto de consumo foram amostras com detecção de CBZ.

Para as amostras coletadas nas SAI, foi detectado CBZ em 79,10% (988/1.249) das amostras.

4. CONCLUSÃO

Apesar do baixo percentual de amostras com detecção de CBZ acima do VMP, a exposição dietética ao CBZ pelo consumo de água no Brasil é relevante em função da conclusão da avaliação toxicológica de que não há limiar seguro para exposição a este ingrediente ativo.

Houve detecção de CBZ em amostras de água coletadas após o sistema de tratamento utilizado, ou seja, na água pronta para o consumo humano. Portanto, os métodos de tratamento da água utilizados não foram capazes de eliminar o CBZ.



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Roberto Coradi de Freitas, Coordenador(a) de Reavaliação**, em 10/12/2021, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10543.htm.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.anvisa.gov.br/autenticidade>, informando o código verificador **1705915** e o código CRC **619DEBC8**.