

**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 2010.

**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  $\beta$ -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, 2000; 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, 1983; 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).

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

	<b>Linhagem:</b> S. <i>Typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535 e TA1538. <b>Delineamento:</b> 648, 1080, 3000, 5000 µg/placa; S9 <sup>+</sup> e S9 <sup>-</sup> .	revertentes ou alteração da RM.	dose testada para algumas linhagens.	
S9 <sup>+</sup> : com ativação metabólica; S9 <sup>-</sup> : 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	<b>Pureza:</b> 99,5%; <b>Linhagem:</b> células de linfoma murino (L5178Y); <b>Delineamento:</b> 1, 5, 10, 25, 50, 100 mg/mL (teste 1) e 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/mL (teste 2); S9 <sup>+</sup> e S9 <sup>-</sup> por 3 horas; 48 horas para expressão fenotípica (Ensaio HPRT).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não houve aumento significativo na frequência de mutação.</li> <li>• Citotoxicidade celular excessiva a partir de 50 mg/mL.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2x10<sup>5</sup> células tratadas (RD OECD 476: 6x10<sup>6</sup> células);</li> <li>• Eficiência de clonagem &lt;65% no teste 1. Por isso, no teste 2, a dose máxima foi 50 mg/mL.</li> </ul>	<b>NEGATIVO</b>
S9 <sup>+</sup> : com ativação metabólica; S9 <sup>-</sup> : 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  $\geq 0,2$  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  $\geq 0,2$  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><b>Pureza:</b> Não informada.  <b>Linhagem:</b> Cultura de linfócitos humanos de sangue periférico;  <b>Delineamento:</b> Teste de aberração cromossômica.  Exposição das células ao CBZ (0,5 mg/mL), S9<sup>-</sup>, em 4h após adição do agente mitógeno, até amostragem, após 44h de incubação.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Observação de aberrações cromossômicas do tipo cromatídica, sem aumento significativo na frequência, em relação ao grupo controle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de controle positivo;</li> <li>Apenas uma alta concentração testada;</li> <li>Ausência de análise de citotoxicidade;</li> <li>Somente uma condição experimental testada (não foram efetuadas as exposições de curto prazo (3-6 horas), S9<sup>+</sup> e S9<sup>-</sup> ;</li> <li>Análise de 100 metáfases (RD</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>



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

	<p>estimulação. I) para linfócitos isolados: 10, 15 e 20<math>\mu</math>M; II) para sangue total: 5, 10, 15, 20 e 25<math>\mu</math>M.</p>	<p>79% (5<math>\mu</math>M) e 89% (10<math>\mu</math>M),</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Indica efeito aneugênico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Avaliação da citotoxicidade pelo IR;</li> <li>Na cultura de linfócitos isolados (20<math>\mu</math>M), baixo rendimento de linfócitos binucleados, impossibilitando a análise de MN;</li> <li>Ausência de controle positivo.</li> </ul>	
<p>Van Hummelen et al., 1995b</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> cultura de linfócitos humanos isolados de sangue periférico;  <b>Delineamento:</b> Teste de MN. Exposição das células a raios <math>\gamma</math> (agente clastogênico) e ao CBZ (2<math>\mu</math>g/ml), S9<sup>-</sup>, 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"> <li>Para os dois protocolos: conteúdo de DNA dos MN nas células G2 foram 2x maior do que G1.</li> <li>MN em células G1 com <math>\uparrow</math>sg no conteúdo de DNA, área absoluta e relativa à célula total (P&lt;0,0001), comparado à indução por raios <math>\gamma</math> (em cultura com citoB);</li> <li><math>\uparrow</math>sg no conteúdo de DNA entre macronúcleos de linfócitos tratados com CBZ com (P &lt;0,0001) ou sem (P = 0,03) MN, em comparação ao controle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de controle positivo;</li> <li>RD OECD 487: início da exposição em 44-48h pós-estimulação;</li> <li>Número total de células analisadas inferior ao RD OECD 487 (2000 células binucleadas);</li> <li>Não foi relatada comparação entre n<sup>o</sup> MN nas células expostas e controle;</li> <li>Não foi relatada avaliação da citotoxicidade;</li> <li>Utilização de somente uma concentração de CBZ.</li> </ul>	<p><b>INCONCLUSIVO</b></p>
<p>Kithcching et al., 1996a<sup>1</sup> apud APVMA (2009)</p>	<p><b>Pureza:</b> 99,5%.  <b>Linhagem:</b> CHL.  <b>Delineamento:</b> Teste de MN, S9<sup>+</sup> e S9<sup>-</sup> (0,78-100<math>\mu</math>g/ml).</p>	<p>Indução de poliploidia em todas as doses testadas, mas sem efeito clastogênico.</p>	<p>-</p>	<p><b>POSITIVO</b>  Aneugênese (<math>\geq</math>0,78<math>\mu</math>g/ml)</p>
<p>Kithcching et al., 1996b<sup>1</sup> apud</p>	<p><b>Pureza:</b> 99,5%.  <b>Linhagem:</b> Culturas de linfócitos humanos.</p>	<p>Indução de poliploidia, em todas as doses</p>	<p>-</p>	<p><b>POSITIVO</b>  Aneugênese (<math>\geq</math>0,78<math>\mu</math>g/ml)</p>

APVMA (2009) e EFSA (2009a)	<b>Delineamento:</b> Teste de MN, S9 <sup>+</sup> e S9 <sup>-</sup> (0,78-100µg/ml).	testadas, mas sem efeito clastogênico.		
Elhajouji et al., 1995, 1997 <sup>1</sup> apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005) <sup>1</sup>	<b>Pureza:</b> 99,5%. <b>Linhagem:</b> Culturas de linfócitos humanos. <b>Delineamento:</b> Teste de MN. Exposição ao CBZ (0-2 µg/ml), S9 <sup>+</sup> e S9 <sup>-</sup> . 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"> <li>• 1ª concentração na qual ocorreu um ↑sg foi superior para a perda cromossômica, quando comparada à não-disjunção;</li> <li>• Indução de aneuploidia em concentrações ≥0,2 µg/ml.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limiar modelado.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> Aneugênese (≥0,2 µg/ml NOEL = 0,1µg/ml)
Marshall et al., 1996 apud <sup>1</sup> APVMA (2009); JMPR/FAO (2005); EFSA	<b>Pureza:</b> 99,7%. <b>Linhagem:</b> Culturas de linfócitos humanos. <b>Delineamento:</b> Teste de MN. Exposição de linfócitos humanos ao CBZ (0-5 µg/ml), S9 <sup>+</sup> e S9 <sup>-</sup> . Análise de linfócitos humanos binucleados com bloqueio da citocinese, com uso de FISH e marcação de centrômeros/cinetócoros.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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.</li> <li>• Formato quase idêntico das dose-resposta para os seis cromossomos para os diferentes desfechos investigados;</li> <li>• Limiares para não-disjunção: 600 ng/ml – cromossomos 17 e X; 700 ng/ml – cromossomo 1;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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).</li> <li>• Análise de 1000 células, em duplicata, com classificação das anormalidades numéricas em: perda ou ganho cromossômico, não-disjunção ou poliploidia.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> Aneugênese (≥0,6 µg/ml NOEL = 0,5 µg/ml)

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

		<p>nos mononucleados contêm essencialmente cromossomos perdidos, ao invés de fragmentos acêntricos característicos de clastogenicidad e;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Não-disjunção é o desfecho mais sensível para aneuploidia induzida por CBZ.</li> </ul>	<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., 2000<sup>1</sup> apud APVM A (2009); JMPR/FAO (2005)</p>	<p><b>Pureza:</b> Benomil (95%) e CBZ (97%).  <b>Linhagem:</b> Cultura de linfócitos humanos.  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Não disjunção foi o desfecho mais sensível para detecção de aneuploidia, com limiares de dose consistentes entre os seis cromossomos analisados;</li> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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;</li> <li>• Anormalidades classificadas como perda ou ganho de cromossomo, não disjunção ou poliploidia.</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  Aneugênese (≥0,6 µg/ml NOEL= 0,5 µg/ml)</p>
<p>De Stoppelaar et al., 2000.</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Fibroblastos da pele de ratos wistar ♂;</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de clastogênese;</li> <li>• ↑sg aneuploidia,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ usado como modelo;</li> <li>• GPA usado no ensaio de MN:</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  (≥ 2,5 mg/ml)</p>

	<p><b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑sg e dose-dependente na frequência MN em células binucleadas (≥ 2,5 mg/mL);</li> <li>• ↑sg perda cromossômica (1 e 2,5 µg/ml) e ↑ não-disjunção (2,5 µg/ml), em células binucleadas;</li> <li>• ↓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.</li> </ul>	<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"> <li>• Análise de 1000 células binucleadas (ensaios <i>in vitro</i>);</li> <li>• 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.</li> </ul>	
<p>Ermler et al., 2013</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI) <b>Linhagem:</b> CHO-K1. <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑ dose-dependente de MN para CBZ e outros IA, com limiar. Mistura com efeito aditivo (proporcional à concentração);</li> <li>• Limiar modelado CBZ: <math>1,81 \times 10^{-6} M</math> (IC: <math>1,4 - 2,34 \times 10^{-6} M</math>).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de controle positivo;</li> <li>• N° de células contabilizadas &gt;1000 (RD OECD: ≥ 2000);</li> <li>• Sistema automatizado subestimou a contagem de MN (avaliação conservadora para reduzir contagem de falsos-positivos);</li> <li>• Doses não claramente relatadas;</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> (NOEL=0,27 µg/ml)</p>
<p>S9<sup>+</sup>: com ativação metabólica; S9<sup>-</sup>: 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.

<sup>1</sup> 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 (Vanhauwaert 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><b>Pureza:</b> PT (%NI)  <b>Linhagem:</b> camundongos B6D2F1/Cr-1BR;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑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.</li> <li>• Indução de MN predominantemente com cinetócoro, indicando presença de cromossomos intactos - indução de aneuploidia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior dose: toxicidade à medula óssea (redução da proporção de PCE/ 1000 eritrócitos);</li> <li>• Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Dados do controle concorrente dentro do controle histórico;</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  Aneugênese (LOAEL = 1646 mg/kg p.c.)</p>
Barale et al., 1993	<p><b>Pureza:</b> Benomil 99% e CBZ 95%;  <b>Linhagem:</b> Camundongos <i>Swiss</i>;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑sg MN, aneuploidia, hiperdiploidia e poliploidia, principalmente em 30, 38 e 40h.</li> <li>• Indução menos evidente de quebras cromossômicas e lacunas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de controle positivo;</li> <li>• Dose única;</li> <li>• 3000 PCE contabilizados (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Nº animais abaixo do RD OECD 474 (5).</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  Micronúcleo (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)</p>
Sarrif et al., 1994 <sup>1</sup> Apud JMPR/FAO (2005)	<p><b>Pureza:</b> Benomil 99,3%.  <b>Linhagem:</b> Camundongos B6D2F1/Cr-1BR ♂ e ♀;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑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.);</li> <li>• MNPCE c/ cinetócoro &gt;80%;</li> <li>• ↑sg MN-PCE s/ cinetócoro em fêmeas (3293 mg / kg p.c.) não considerado evidência de clastogenicidade (↑similar ao controle positivo aneugênico);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclofosfamida e sulfato de vincristina usados como controles clastogênicos e aneugênicos positivos, respectivamente;</li> <li>• Seleção de doses: estudo preliminar com toxicidade da medula óssea (↓PCE/1000 eritrócitos nos maiores níveis de dose);</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  Aneugênese (LOAEL=1646 mg/kg p.c.)</p>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓sg proporção de PCE/1000 eritrócitos em fêmeas (1646 e 3293 mg/kg p.c.).</li> </ul>		
Vargas, 1995 (Adama)	<p><b>Pureza:</b> PT (95%);</p> <p><b>Linhagem:</b> Camundongos Swiss ♀ e ♂;</p> <p><b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Sem ↑sg de MN nas doses testadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior dose: 75% da dose letal;</li> <li>• Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Sem dados de controle histórico.</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>
Costa, 2001 (UPL)	<p><b>Pureza:</b> PT (98%).</p> <p><b>Linhagem:</b> camundongos Swiss ♀ e ♂.</p> <p><b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Sem ↑sg de MN.</li> <li>• Porém, ↑ aparentemente dose-dependente e maior do que o dobro do controle negativo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior dose: 75% da dose letal;</li> <li>• Contagem de 1000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Sem dados de controle histórico;</li> <li>• Não foi feito teste de tendência.</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>
Vanhauwaert et al., 2001 <sup>1</sup> Apud APVMA (2009); JMPR/FAO (2005)	<p><b>Pureza:</b> 97%.</p> <p><b>Linhagem:</b> Camundongos Swiss.</p> <p><b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑sg MN em ambas as doses e intervalos de amostragem (em células epiteliais), sem efeito dose-dependente;</li> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise de 1000 células epiteliais intestinais. Tipo de célula não previsto na RD OECD 474.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> Micronúcleo em células epiteliais (LOAEL=500 mg/kg p.c.)
Igarashi et al., 2007	<p><b>Pureza:</b> Alta;</p> <p><b>Linhagem:</b> Camundongos ddY ♂;</p> <p><b>Delineamento:</b> Teste de MN. Administração única vo (125, 250, 500 e 1000 mg/kg) 1 dia antes ou</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efeitos sg somente com administração após HP;</li> <li>• ↑sg MN (todas as doses); ↑sg células binuclead</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausência de controle positivo;</li> <li>• Grupos de 3-5 machos (RD OECD 474: 5);</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> 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"> <li>• Indução de fragmentação nuclear (apoptose) nas doses de 250 (0,3%), 500 (11,8%) e 1000 mg/kg (0,7%).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliação de 2000 hepatócitos intactos (tipo de célula não previsto na RD OECD 474);</li> <li>• Cálculo do HPI pela mesma fórmula do Índice de Proliferação de Bloqueio de Citocinese;</li> </ul>	
Costa, 2008 (Ourofino)	<p><b>Pureza:</b> PT (98%); <b>Linhagem:</b> Camundongos Swiss ♀ e ♂. <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Sem ↑sg de MN nas doses testadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Dados dentro do controle histórico.</li> </ul>	<b>NEGATIVO</b>
Costa, 2009 (UPL)	<p><b>Pureza:</b> PT (&gt;98%); <b>Linhagem:</b> Camundongos Swiss ♀ e ♂; <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Sem ↑sg de MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo, acima do controle histórico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>• Uma única dose testada.</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>
Coffing et al., 2011	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI) <b>Linhagem:</b> Ratos <i>Sprague Dawley</i>; <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↑sg PCE no ensaio com células da medula óssea, indicando ocorrência de toxicidade, com ↑sg MN na maior dose;</li> <li>• No cólon, não houve alteração sg em nenhuma dose. No duodeno, observou-se ↑sg MN em todas as doses.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nº animais abaixo do recomendado pela RD OECD 474 (5);</li> <li>• Protocolo proposto mostrou que uso de células do TGI pode ser uma alternativa para a avaliação de MN.</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> 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"> <li>Diferenças na formação de MN nos diferentes tecidos.</li> </ul>		
Bowen et al., 2011	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos ♂ Han-Wistar;  <b>Delineamento:</b> 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 (T<sub>48</sub>); II) Grupo satélite (n = 5): coletas em 24h (T<sub>69</sub>) e 44h (T<sub>89</sub>) após 3ª dose.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou ↓ ganho de peso;</li> <li>1500 e 2000 mg/kg p.c.: citotoxicidade na medula óssea (↓sg PCE) e sangue periférico (↓sg reticulócitos);</li> <li>↑sg e dose-dependente MN em reticulócitos (2x maior que controle, acima do intervalo de confiança de 95% do controle histórico);</li> <li>↑sg MN-PCE, nas 3 doses testadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Maior dose: DMT;</li> <li>Ausência de controle positivo;</li> <li>Registro diário de peso corporal e sinais clínicos;</li> <li>Citometria de fluxo para separação de reticulócitos no sangue periférico;</li> <li>Análise de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000) e de MN em reticulócitos em 20000 reticulócitos/amostra.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> Micronúcleo em eritrócitos de MO e reticulócitos (LOAEL = 1000 mg/kg p.c.)
Bastelli, 2012 (Nortox)	<p><b>Pureza:</b> PT (99%);  <b>Linhagem:</b> Camundongos Swiss ♀ e ♂;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>Sem ↑sg MN, mas houve ↑ maior do que o dobro do controle negativo para machos, acima do controle histórico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de 2000 PCE (RD OECD 474: 4000);</li> <li>Uma única dose testada.</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>
Itoh et al., 2012a	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos F344/DuCrjCrlj ♀ e ♂;  <b>Delineamento:</b> Teste de MN em hepatócitos. Administração única vo (gavagem – 62,5 e 125 mg/kg; n = 4) logo após hepatectomia parcial (D<sub>1</sub>), com eutanásia e coleta de hepatócitos no D<sub>4</sub>; análise de HMN por microscopia de fluorescência. Controle positivo: colchicina.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑sg dose-dependente HMN (nas duas doses), com maior incidência em ♂ que em ♀;</li> <li>Sem alteração no peso relativo do fígado, na frequência de células mono e multinucleadas, bem como de células em metáfase e com</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 níveis de dose utilizados ao invés de 3;</li> <li>Análise de 2000 hepatócitos;</li> <li>Registro do nº células metafásicas e com fragmentos nucleares.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5mg/kg)

		<p>fragmentos nucleares;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ células binucleadas, nos dois níveis de dose, apenas em machos.</li> </ul>		
Itoh et al., 2012b	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos ♂ F344;  <b>Delineamento:</b> 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 D<sub>4</sub>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ não induziu MN quando administrado antes da HP, mas houve ↑sg MN na menor dose para exposição após HP. (resultado semelhante à Colchicina).</li> <li>• Demonstrou-se que, em ratos, assim como camundongos (estudo prévio), é necessária a dosagem após HP para detecção de MN.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ usado como modelo para validação do ensaio.;</li> <li>• Pequeno grupo amostral (4 animais/grupo).</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5 mg/kg)</p>
Itoh et al., 2015a	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos ♂ F344;  <b>Delineamento:</b> 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 D<sub>4</sub>. Grupo controle positivo: colchicina (0; 0,5; 1; 2 mg/kg; n = 5). 1ª dose no D<sub>1</sub>, com HP no D<sub>2</sub>; 2ª dose no D<sub>3</sub>; remoção do fígado em regeneração no D<sub>6</sub>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ e Colchicina: ↑ sg e dose-dependente de MN nos hepatócitos, a partir da menor dose testada, sem ↑ no peso relativo do fígado;</li> <li>• Incidência de células binucleadas em 125 e 250 mg/kg CBZ foi maior do que no controle, sugerindo a inibição da regeneração hepática;</li> <li>• Ocorreu incidência relativamente alta de células em metáfase, células multinucleadas e fragmentos nucleares na maior dose de CBZ, respostas típicas de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2000 hepatócitos analisados;</li> <li>• Anteriormente, mostraram que, no ensaio de MN em hepatócitos, as substâncias clastogênicas precisam ser administradas antes da HP e as aneugênicas após a HP;</li> <li>• Nesse estudo, foi demonstrado que substâncias clastogênicas e aneugênicas podem ser avaliadas num mesmo ensaio e com o mesmo regime de dose;</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> Micronúcleo em hepatócitos (LOAEL = 62,5 mg/kg p.c.)</p>

		<p>indutores de aberrações cromossômicas numéricas;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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);</li> <li>• CBZ usado como modelo.</li> </ul>	
Itoh et al., 2015b	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos F344/DuCrjCrlj ♂;  <b>Delineamento:</b> 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 (D<sub>1</sub>); administração concomitante de buprenorfina (15 e 30 µg/kg; 2x dia por 2d pós-HP). Eutanásia e coleta de hepatócitos no D<sub>4</sub>; análise de HMN por microscopia de fluorescência.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem alteração significativa no peso corporal;</li> <li>• 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;</li> <li>• Conclusão do estudo: Administração de buprenorfina (destinada à redução da dor provocada pela HP) é contraindicada para esse tipo de ensaio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Somente um nível de dose utilizado;</li> <li>• Contagem de 2000 hepatócitos;</li> <li>• 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.</li> </ul>	<b>NÃO RELEVANTE</b>
Hashem et al., 2017	<p><b>Pureza:</b> 98%.  <b>Linhagem:</b> ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♀.  <b>Delineamento:</b> Administração vo (gavagem – 200 mg/kg p.c., n=8) por 2 semanas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑sg MN, fragmentação de DNA e aberração cromossômica (d eleção, quebras, lacunas, associação, fragmentação,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Somente um nível de dose utilizado;</li> <li>• Citotoxicidade não relatada;</li> <li>• CBZ usado como modelo;</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> 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"> <li>• Retorno aos níveis próximos ao basal em 15 dias após tratamento (somente para aberração cromossômica).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise de MN em número inferior de células (RD OECD 474: 4000 PCE/animal);</li> <li>• Análise de aberração cromossômica com amostragem divergente da RD OECD 475: coleta da medula óssea 12-18h após tratamento e 24h após primeira amostragem.</li> </ul>	<p>(LOAEL = 200 mg/kg/p.c.)</p>
<p>De Stoppelaar et al., 2000.</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI) <b>Linhagem:</b> Fibroblastos da pele de ratos wistar ♂; <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Ausência de clastogênese;</li> <li>• ↑sg aneuploidia, sendo a não-disjunção o erro prevalente;</li> <li>• ↑sg e dose-dependente na frequência MN em células binucleadas (≥ 2,5 mg/mL);</li> <li>• ↑sg perda cromossômica; ↑dose-dependente de não-disjunção cromossômica;</li> <li>• ↓ frequência de poliploidia (dados <i>in vitro</i> indicaram que citob interfere na indução de poliploidia pelo CBZ).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ usado como modelo;</li> <li>• Análise do maior n° possível de células binucleadas em 2-3 três lâminas, em vez das 1000 células habituais (devido à baixa frequência de células binucleadas nas lâminas).</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> ≥ 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><sup>1</sup> 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><b>Pureza:</b> Não informada.  <b>Linhagem:</b> Roedor <i>Microtus oeconomus</i>.  <b>Delineamento:</b>            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"> <li>• ↑sg frequência de não-disjunção cromossômica em espermatócitos primários jovens no dia 10;</li> <li>• Sem evidência de indução de espermátides diploides;</li> <li>• Autor relata que são dados iniciais, obtidos em um n<sup>o</sup> reduzido de animais, sem análise em duplicata.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise de 2000 núcleos esféricos de espermátides precoces/ animal para não-disjunção cromossômica (n+1) e diploidia (2n);</li> <li>• Não informa n<sup>o</sup> animais;</li> <li>• Somente um nível de dose utilizado;</li> <li>• Ausência de controle positivo e negativo concorrente; adoção de controle negativo não-concorrente (exposição à radiação).</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>
Zuelke & Perreault, 1995	<p><b>Pureza:</b> 95%.  <b>Linhagem:</b> Hamsters sírios.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>: ↑sg</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indução de superovulação não detalhada;</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> CBZ alcança ovário e causa

	<p><b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Imunofluorescência confirmou danos aos fusos na fertilização <i>in vitro</i>;</li> <li>• Dose única de CBZ, na fertilização <i>in vivo</i>, induziu aneuploidia no zigoto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeno grupo amostral;</li> <li>• 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.</li> </ul>	<p>dano aos fusos mitóticos, aneuploidia nos ovócitos e perda pré-implantação (1000 mg/kg)</p>
<p>Jeffay et al., 1996</p>	<p><b>Pureza:</b> 95%. <b>Linhagem:</b> Hamsters sírios fêmeas. <b>Delineamento:</b> Administração única vo (gavagem, 1000 mg/kg p.c.; n=10). Eutanásia após a ovulação (D<sub>1</sub> 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"> <li>• ↑sg ovócitos aneuplóides (37,2% CBZ x 13,5% controle), sem anormalidades estruturais;</li> <li>• Sem alteração na taxa de fertilização e no nº ovócitos recuperados; ↓sg nº médio de sítios de implantação;</li> <li>• Atraso/ interrupção no desenvolvimento embrionário pré-implantação: ↑sg embriões com menos de</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ usado como modelo;</li> <li>• 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;</li> <li>• No presente estudo, CBZ foi administrado na tarde do proestro,</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b> 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"> <li>Dados indicam maior sensibilidade do oócito aos efeitos induzidos por CBZ durante a formação do fuso (maturação do ovócito) do que após esse processo.</li> </ul>	<p>coincidindo com a maturação meiótica dos oócitos;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>121 e 52 oócitos analisados, nos grupo CBZ e controle, respectivamente.</li> </ul>	
Matsuo et al., 1999	<p><b>Pureza:</b> Não informada;  <b>Linhagem:</b> Rato <i>Sprague-Dawley</i>;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>50 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística;</li> <li>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;</li> <li>400 mg/kg: leve ↑MN, sem significância estatística;</li> <li>Indução de aberrações cromossômicas numéricas em espermátides, com alta incidência de aneuploidia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Contagem de 1500 espermátides na fase 1;</li> <li>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).</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  Micronúcleo em espermátides; aneugênese (≥50 mg/kg)</p>
De Stoppelaar et al., 1999 <sup>1</sup> Apud APVMA (2009) e JMPR/FAO (2005)	<p><b>Pureza:</b> Não informada;  <b>Linhagem:</b> Ratos <i>Wistar</i>;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>Indução de espermatozoides diplóides (800 mg/kg p.c.) e ↑ espermatozoides hiperhaplóides em doses ≥ 150 mg/kg p.c. (maioria de espermatozoides diploides);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/ animal, com categorização adicional de espermatozoides hiperhaplóides (44Y, 4YY, 44) por tamanho nuclear, a fim</li> </ul>	<p><b>POSITIVO</b>  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"> <li>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).</li> </ul>	<p>de se avaliar quais espermatozoides foram realmente diploides;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Análise de 2000 eritrócitos periféricos/ animal.</li> </ul>	
<p>Adler et al., 2001, 2002 Apud JMPR/FAO (2005)</p>	<p><b>Pureza:</b> 99,1%. <b>Linhagem:</b> camundongos C3H ♂ <b>Delineamento:</b> 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"> <li>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 ;</li> <li>Comparação das incidências agrupadas de espermatozoides anormais de todos os animais dentro de um grupo tratado com o grupo controle,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Grupo controle positivo (colchicina);</li> <li>Análise de, no mínimo, 10000 espermatozoides/ animal, com determinação dos seguintes fenótipos: haplóide normal (X8 ou Y8), hipohaplóide (08, 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.</li> </ul>	<p><b>NEGATIVO</b></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	<b>Pureza:</b> >99%; <b>Linhagem:</b> Linfócitos humanos de sangue periférico; <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• CBZ não foi citotóxico (viabilidade &gt;90%) e não induziu danos ao DNA, tanto imediatamente quanto em 24h pós-exposição.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise de poucas células por imagem (25).</li> <li>• Sem controle negativo.</li> </ul>	<b>INCONCLUSIVO</b>

<p>Dikić et al. 2012b</p>	<p><b>Pureza:</b> 95%;  <b>Linhagem:</b> Camundongos <i>Swiss</i> ♀/♂;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• ↓sg ganho de peso corporal, sem impacto significativo no peso corporal; sem alteração no peso do fígado;</li> <li>• ↑sg proteína total no fígado, atividade de AST, ALT; ↓sg atividade de ALP;</li> <li>• ↑sg comprimento de cauda s/ diferença sg no momento e intensidade da cauda (tratados x controle, com inclusão de ♀ e ♂);</li> <li>• ↑sg intensidade e momento de cauda em ♂ (tratados x controle);</li> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 lâminas/ animal;</li> <li>• Análise de 100 cometas/ animal (RD OECD 489: 150)</li> <li>• N° núcleos de cauda longa foi contado como um n° células no percentil 95 do comprimento da cauda do cometa/ grupo/ sexo;</li> <li>• Ausência de controle positivo concorrente;</li> <li>• Dose única (RD OECD 489: 3 doses)</li> <li>• Não foi informado intervalo de amostragem (RD OECD 489: coleta em 2-6h).</li> </ul>	<p><b>NEGATIVO</b></p>
<p>Bowen et al., 2011</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Ratos Han-Wistar ♂;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Ausência de mortalidade, sinais clínicos de toxicidade ou redução no ganho de peso;</li> <li>• Níveis aceitáveis de citotoxicidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maior dose: DMT;</li> <li>• Eletroforese com 3 lâminas/ animal/ tecido;</li> <li>• Ausência de controle positivo concorrente;</li> </ul>	<p><b>NEGATIVO</b></p>

	estômago em 3h após 3ª dose (T <sub>48</sub> ).	<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"> <li>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> &gt; 70% em relação ao controle).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausência de controle histórico para sangue periférico;</li> <li>Análise de 100 células/ animal; 50 células/ gel (RD OECD 489: 150 células/ tecido/ animal);</li> <li>Citotoxicidade: frequência de "<i>hedgehog</i>" e m 100 células/ lâmina (RD 489: 150 células/ amostra).</li> </ul>	
Vigreux et al., 1998	<p><b>Pureza:</b> &gt;99%;  <b>Linhagem:</b> CHO;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>Sem citotoxicidade na concentração limite de 250 µM;</li> <li>Ausência de danos ao DNA (proporção de células danificadas foi baixa em todas as concentrações testadas; s/ ↑sg do momento de cauda).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Citotoxicidade avaliada pelo método XTT (2 dias após tratamento);</li> <li>Limite de dose mais alta testada (250 µM), por insolubilidade do CBZ.</li> </ul>	<b>NEGATIVO</b>
Rai & Mercurio, 2020	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> Camundongo <i>Swiss</i>;  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>Sem diferença de dano ao DNA entre controle negativo com linfócitos de camundongo não-expostos e</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A concentração usada é inferior à concentração encontrada em água superficial (apud Rajput et al., 2018);</li> <li>Uma única dose testada.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b>

	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"> <li>• Grupo 1 e 2: verificação de maior dano ao DNA, em comparação aos controles negativos, e em níveis semelhantes ao do controle positivo (30%);</li> <li>• Sem alteração no consumo de água/ alimento ou ganho de peso corporal.</li> </ul>		
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 conseqüente 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).

<b>Quadro 7.</b> Avaliação de ensaios sobre mecanismos de genotoxicidade com o ingrediente ativo CBZ.				
<b>Referência</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Resultados segundo autor</b>	<b>Limitações, inconsistências e considerações relevantes</b>	<b>Conclusão</b>
Can e Albertini., 1997	<b>Pureza:</b> 99,7%; <b>Linhagem:</b> Culturas primárias de células da granulosa humanas; <b>Delineamento:</b> Culturas de células	Efeito na proliferação celular: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑sg índice mitótico em todas as concentrações entre os dias 2-9.</li> <li>• &gt;95% células com metáfase anormais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ atua como agente mitostático por meio de interferência seletiva</li> </ul>	<b>CBZ induziu efeitos na divisão celular e despolimerização de microtúbulos</b> (≥ 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"> <li>• Alteração na forma, simetria e nº polos do fuso (afeta integridade do centrossomo);</li> <li>• Ação seletiva em células na metáfase;</li> <li>• Alteração na composição de MT, com despolimerização de MT não acetilados.</li> </ul>	na organização de MT e centrossomos; <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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.</li> </ul>	
Lim et al., 1997b	<b>Pureza:</b> Benomil (>95%; contaminação 10% CBZ); CBZ (alta pureza, %NI); <b>Linhagem:</b> Ratos <i>Sprague-Dawley</i> ♂; <b>Delineamento:</b> <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"> <li>• Identificação de subunidades α e β-tubulina;</li> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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>.</li> </ul>	<b>POSITIVO</b> 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	<b>Pureza:</b> Alta (%NI) <b>Linhagem:</b> Cultura primária de células de túbulos seminíferos de ratos <i>Sprague-Dawley</i> ; <b>Delineamento:</b> Coleta e incubação de células de túbulos seminíferos de ratos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cada amostra de túbulo seminífero, utilizada para gerar as culturas controle, veículo e tratada, foi</li> </ul>	<b>CBZ induziu despolimerização de MT, que parece estar associada à redução da tirosinação de tubulina, ao invés de perda de tubulina.</b> (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"> <li>• Sem alteração no nível ou distribuição de proteínas <math>\alpha</math> e <math>\beta</math>-tubulina acetiladas (frações solúvel e polimerizada).</li> <li>• <math>\downarrow</math> nível <math>\alpha</math>- tubulina na fração de tubulina polimerizada, indicando que CBZ induziu <math>\uparrow</math> tubulina solúvel via despolimerização;</li> <li>• CBZ não induziu <math>\downarrow</math> ATP, (manutenção fisiologia normal dos túbulos seminíferos).</li> </ul>	<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"> <li>• Ensaio de ELISA com n = 3-4.</li> </ul>	
<p>Winder et al., 2001</p>	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)  <b>Linhagem:</b> ratos <i>Sprague-Dawley</i> (100-103 dias).  <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• 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.</li> <li>• Adição de albumina não alterou ação inibitória do CBZ (redução da inibição é específica para MAP).</li> <li>• CBZ afetou a iniciação da polimerização dos MT, mas não os MT já formados.</li> <li>• CBZ preveniu a associação de GTP à tubulina dose-dependente. Adição de GTP <math>\downarrow</math>sg a inibição da polimerização pelo CBZ.</li> <li>• Não houve diferença na formação de GDP com ou sem CBZ.</li> <li>• 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.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maioria dos resultados sem diferença estatística.</li> </ul>	<p><b>CBZ interfere nos eventos iniciais de polimerização dos microtúbulos.</b> (100 µM)</p>

Markelewicz, 2004	<p><b>Pureza:</b> Alta (%NI)</p> <p><b>Delineamento:</b> <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 <math>\mu</math>M).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HD <math>\downarrow</math>tempo e <math>\uparrow</math>velocidade máxima de formação de MT;</li> <li>• Normalização pela exposição concomitante de CBZ.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CBZ usado como agente inibidor da polimerização de MT para avaliação da resposta de HD.</li> </ul>	<p><b>Tubulina+HD é resistente aos efeitos inibitórios do CBZ (70 <math>\mu</math>M)</b></p>
Lim and Miller, 1997a	<p><b>Pureza:</b> &gt; 97%;</p> <p><b>Linhagem:</b> Ratos <i>Sprague-Dawley</i> pré- (23-28 dias) e pós-puberais (83-90 dias);</p> <p><b>Delineamento:</b> <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 <math>\mu</math>M pré-incubado com tubulina por 20 minutos).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição da associação de MT pelo CBZ foi similar para tubulina de ratos pré (IC50 = 4,6 <math>\mu</math>M) e pós-puberais (IC50 = 4,9 <math>\mu</math>M).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparação da inibição pelo CBZ da associação de tubulinas de ratos pré e pós-puberais.</li> </ul>	<p><b>CBZ inibiu a polimerização de tubulina de ratos pré e pós-puberais de forma similar (4,6 <math>\mu</math>M)</b></p>
Zuelke e Perreault, 1995	<p><b>Pureza:</b> 95%;</p> <p><b>Linhagem:</b> Hamsters sírios.</p> <p><b>Delineamento:</b> Exposição durante a fertilização <i>in vitro</i> (6 <math>\mu</math>g/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"> <li>• Imunofluorescência confirmou danos aos fusos meióticos durante a fertilização <i>in vitro</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeno grupo amostral;</li> <li>• Descrição completa desse estudo no Quadro 5.</li> </ul>	<p><b>CBZ induziu dano aos fusos mitóticos (6 <math>\mu</math>g/mL)</b></p>
Warr et al., 1982	<p><b>Pureza:</b> Não informada.</p> <p><b>Linhagem:</b> linhagem mutante CRM<sub>795</sub> de células CHO.</p> <p><b>Delineamento:</b> investigação da viabilidade celular da linhagem mutante: plaqueamento de 5 x 10<sup>6</sup> em CBZ 10<sup>-5</sup>M</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linhagem CRM<sub>795</sub> 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</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Descrição incompleta da metodologia;</li> <li>• Análise em triplicata;</li> <li>• Colônias com mais de 50 células</li> </ul>	<p><b>INCONCLUSIVO</b></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"> <li>• Desvio padrão da triplicata &lt;15.</li> <li>• Cada experimento feito em duplicata.</li> </ul>	
Tollstadius et al., 2019	<b>Pureza:</b> 97%; <b>Linhagem:</b> Células alveolares A549; <b>Delineamento:</b> 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"> <li>• Monocamada exposta a concentrações não citotóxicas mostrou apenas arrasto na fase G2/M.</li> <li>• Sistema 3D AIL: ↑sg expressão de Caspase 3, α-tubulina e EROs; ↓sg atividade mitocondrial.</li> <li>• CBZ é citotóxico para células pulmonares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avaliações feitas para dose que causou pouco impacto na viabilidade celular, ou seja com baixa citotoxicidade (12,5 µM).</li> </ul>	<b>Arrasto na mitose e aumento da expressão de α-tubulina (12,5 µM)</b>
<p>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.</p>				

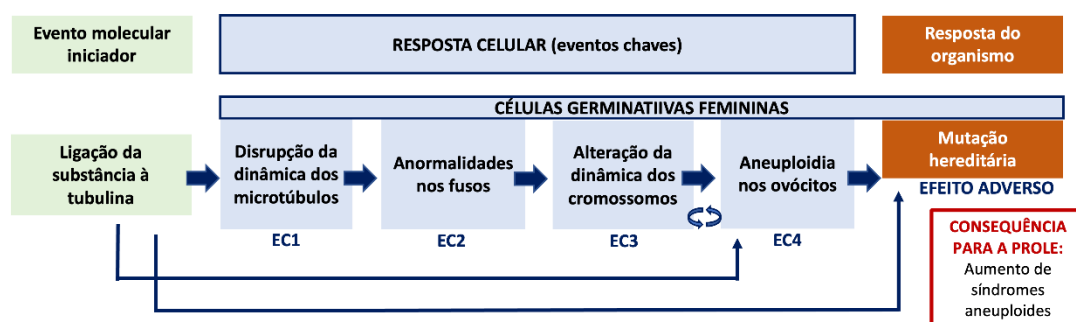
## 2.5 Estudos de toxicidade aos órgãos reprodutivos e às células germinativas

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 aneuploides. Ovócitos aneuploides 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 conceitos 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 conseqüente 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 pronúcleo 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.

<b>Quadro 8. Conclusões das principais autoridades internacionais sobre a mutagenicidade do Carbendazim.</b>			
<b>Autoridade Regulatória</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Resultados Experimentais</b>	<b>Dose de referência humana</b>
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 da 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 da 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](https://doi.org/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](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](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](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](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**.