

Avaliação dos efeitos toxicológicos do herbicida glifosato sobre o estômago de ratos Wistar machos

Carla Bruna Pietrobon¹; Jéssica Vencatto Senem²

Resumo: Os agrotóxicos passaram a ser amplamente utilizados em diferentes culturas, porém a cada dia o seu uso excessivo se intensifica. O glifosato é o herbicida mais utilizado atualmente no Brasil, sendo considerado um agroquímico sistêmico e pós-emergente. É classificado pela ANVISA (2010) como produto da classe IV, Pouco Tóxico. A pesquisa teve como objetivo avaliar as possíveis alterações histológicas causadas no estômago de ratos Wistar machos após a exposição oral ao herbicida. Foram utilizados 30 ratos, divididos em três grupos, sendo o controle G1, e G2 e G3 os grupos experimentais expostos à diferentes concentrações, nas doses de 0,346 µl e 1,73 µl respectivamente do herbicida, pelo método de gavage. Após 90 dias de tratamento a eutanásia foi induzida por exsanguinação e o estômago retirado, seguindo o processamento para microscopia de luz. Nas análises histológicas do corpo do estômago dos ratos submetidos às diferentes concentrações do agrotóxico foi observado que não houve quaisquer alterações em suas estruturas morfológicas.

Palavras-chaves: Agrotóxicos; células gástricas; cobaias.

Evaluation of the toxicological effects of the herbicide glyphosate on the stomach of male Wistar rats

Abstract: Pesticides have become widely used in different cultures, but every day its use intensifies. Glyphosate is the most widely used herbicide in Brazil, and is considered a systemic agrochemical and post-emergence. It is classified by ANVISA (2010) as a product of class IV, Slightly Toxic. The research aimed to evaluate the possible histological changes caused in the stomach of male Wistar rats after oral exposure to the herbicide. A total of 30 rats were used and divided into three groups: the control G1, G2 and G3, the experimental groups were exposed to different concentrations at doses of 0.346 µl and 1.73 µl from the respective herbicide, by the gavage method. After 90 days of treatment euthanasia was induced by exsanguination and the stomach removed, following processing for light microscopy. In the histological analysis of the body from the rat stomach subjected to the different concentrations of the pesticide it was observed that there were no changes in their morphological structures.

Keywords: Pesticides, Gastric cells, Guinea pig.

Introdução

A agricultura é praticada há mais de 10 mil anos pela humanidade, porém a intensificação do uso dos agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras se deu a pouco mais que meio século. O Brasil é o maior consumidor mundial destes produtos anualmente, utilizando mais de um milhão de toneladas de herbicidas por ano (LONDRES,

¹ Bióloga. Discente do Programa de Pós Graduação Stricto Sensu Biociências e Saúde (UNIOESTE). carlabpietrobon@hotmail.com

² Bióloga. Mestre em Biociências e Saúde (UNIOESTE). Docente da Faculdade Assis Gurgacz (FAG). jessivencatto@gmail.com

2011). Um destes agroquímicos é o glifosato, um herbicida não seletivo e pós-emergente, o qual pertence ao grupo das glicinas. Apresentam um largo espectro de ação permitindo que este tenha a capacidade de controlar uma grande quantidade de gramíneas, plantas daninhas anuais ou perenes, assim como folhas largas e estreitas (MONSANTO, 2005). Toxicologicamente a ANVISA (2010) classifica o glifosato como Pouco Tóxico, Classe IV.

Diversos estudos têm sido realizados para verificar os efeitos do herbicida glifosato na saúde de homens e animais (MADUREIRA; SILVA, 2012). Dentre estes Romano *et al.*, (2008) e Santos (2011) comprovaram que o glifosato causa alterações no sistema endócrino, em um período entre 30 à 90 dias de exposição. Além de se verificar uma suspensão da atividade da aromatase, responsável pela síntese de estrogênio (RICHARD *et al.*, 2005), também foram evidenciadas alterações significativas no ciclo estral de fêmeas e alterações no comportamento sexual das mesmas (BURKUHL *et al.*, 2006).

Acredita-se que os maiores impactos na saúde humana e ambiental decorrem principalmente de contaminações, poluições e intoxicações pelo uso abusivo de agrotóxicos (THEOPHILO *et al.*, 2014).

Diversos foram os órgãos testados frente à exposição do herbicida glifosato, entretanto, a presente pesquisa não encontrou relatos bibliográficos acerca da histologia do estômago.

O estômago é o órgão mais distensível do trato gastrointestinal, responsável por realizar uma parcela da digestão, além de secretar algumas enzimas e hormônios. É dividido em quatro túnicas ou camadas, a camada da mucosa, a submucosa, a camada muscular e a serosa (VAN DE GRAFF, 2003). É subdividido em quatro regiões, sendo elas a cárdea, o fundo gástrico, o corpo e a região pilórica (DRAKE *et al.*, 2005), porém histologicamente o órgão apresenta apenas três regiões, pois o fundo e o corpo do estômago apresentam regiões com microscopias histológicas idênticas, sendo consideradas únicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Diante dos diferentes efeitos causados pelo herbicida glifosato, e a importância do estômago para a homeostase do organismo se faz necessário à realização de pesquisas nesta área, uma vez que não há registros histológicos científicos das consequências trazidas por este herbicida nas concentrações testadas.

Material e Métodos

A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética de Pesquisas em Animais (CEUA), da Faculdade Assis Gurgacz, aprovado conforme parecer 013/2014, de 04 de junho de 2014 (em anexo).

2.1 – Cobaias

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente 60 dias de idade e com peso médio entre 250 a 350 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade Assis Gurgacz.

Os animais foram divididos em três grupos, sendo cada um composto de 10 cobaias cada e nomeados G1, G2, G3, acondicionados em caixas de polipropileno autoclavável (49X34X16cm), forradas com maravalha, contendo dois ratos de cada grupo para cada caixa.

As cobaias foram mantidas em ambiente com a temperatura ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) e ciclos de fotoperíodos controlados. Durante todo o tratamento as cobaias receberam ração padrão e água natural *ad libitum*.

2.2 – Tratamento

A administração oral do herbicida se deu pelo método de gavage (Figura 1), sendo que o grupo controle (G1) recebeu apenas água natural, enquanto os grupos G2 e G3 receberam glifosato nas doses de 0,346 μl e 1,73 μl , na quantidade de 0,25ml de água, respectivamente. As dosagens foram determinadas conforme a metodologia adaptada de Romano e colaboradores (2008).

O tratamento foi realizado três vezes por semana, nas segundas, quartas e sextas, por volta das 18 horas, além da pesagem de todas as cobaias nestes mesmos períodos.

Figura 1 – Administração do herbicida pelo método de gavage.

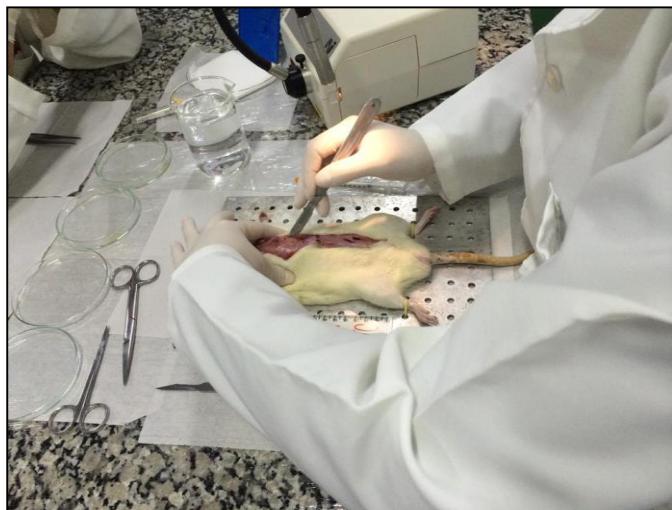


Fonte: o autor.

2.3 – Coleta de dados

Após 90 dias de tratamento, os animais foram levados ate o laboratório de fisiologia da Faculdade Assis Gurgacz, anestesiados a 10% do seu peso corporal com cetamina por uma via intraperitoneal (IP) e com xilazina, pela mesma via e após verificado o efeito dos anestésicos foi realizada uma incisão cirúrgica longitudinal ventral na linha média do abdome (FIGURA 2) e a morte dos animais foi induzida pelo método de exsanguinação por punção da veia cava inferior e o estômago foi coletado, fracionado na região de interesse, sendo esta o corpo do estômago. O material foi fixado em solução de aldeído fórmico à 10%, e depois de 24 horas transferido para solução alcoólica à 70% até ser submetido ao processamento histológico.

Figura 2 – Incisão cirúrgica longitudinal ventral na linha média do abdome.



Fonte: o autor.

Enquanto uma cobaia estava sendo manipulada as demais permaneceram reservadas em uma sala isolada, não participando das etapas de coleta umas com as outras, para evitar que as mesmas ficasse expostas a resíduos que poderiam desencadear sinais olfatórios de alarme, causando alterações comportamentais como o medo, sendo assim todos os materiais que foram utilizados para a realização do processo era devidamente limpo para cada uma das cobaias (CONCEA, 2013).

2.4 - Processamento histológico para microscopia de luz

O material foi processado para a microscopia de luz, segundo o protocolo adaptado de Junqueira e Junqueira (1983) (FIGURA 3). Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia com cortes de 5 μ m, com auxílio do micrótomo Leica RM 2125 RTS da Faculdade

Assis Gurgacz, em seguida as lâminas foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE) e então fotomicrografadas com fotomicroscópio Olympus BX60 com câmera digital DP71 da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) para análise dos resultados e discussão dos mesmos.

Figura 3 - Bateria para o processamento histológico de rotina adaptado.



Fonte: o autor.

Resultados e Discussão

A análise do laminário permitiu observar a histologia típica do corpo estômago, contendo glândulas gástricas, principais responsáveis pela secreção se suco gástrico. Uma glândula gástrica presente na camada da mucosa apresenta cinco grupos de células principais, sendo elas: (1) células mucosas do colo, localizadas na porção estreita da glândula (istmo da glândula gástrica), adjacente à fosseta gástrica, (2) células principais ou células pepsinogênicas, predominantes na porção inferior da glândula, apresentam uma forma colunar com núcleo ovóide e basal, (3) células parietais ou células oxínticas, são encontradas principalmente na região superior do corpo, com formato arredondado ou piramidal e núcleo esférico e central, (4) células fonte estão presentes na região próxima ao colo das glândulas, (5) células enteroendócrinas, são pequenas e arredondadas, apresentam núcleo apical e citoplasma claro, localizadas na região inferior do corpo. A região da fosseta gástrica é revestida por um epitélio simples formado por um grupo de células da mucosa superficial, as quais apresentam núcleos ovais e muco produzido por elas. (KIERSZENBAUM, 2008), como representado na Figura 4.

Além da camada da mucosa, foi possível se observar as camadas posteriores à mesma, a camada da submucosa, formada por tecido conjuntivo frouxo, contendo fibras colágenas e

fibras elásticas, nesta região se encontram uma grande quantidade de arteríolas, plexos venosos e vasos linfáticos. Já a camada muscular composta por uma musculatura lisa, nas direções circular, oblíqua e longitudinal (KIERSZENBAUM, 2008), como representado na Figura 5.

Figura 4^a - Fragmento de estômago de rato Wistar macho, exibindo detalhes das camadas da região do corpo. G1. Coloração H&E. Aumento 100x. **Fg:** Fosseta gástrica; **Cms:** Células mucosas superficiais; **Cmc:** Células mucosas do colo, **Co:** Células parietais ou células oxínticas.

Figura 4^b - Fragmento de estômago de rato Wistar macho exibindo detalhes das camadas da região do corpo. G1. Coloração H&E. Aumento 100x. **Ce:** Células enteroendócrinas, **Cp:** Células principais.

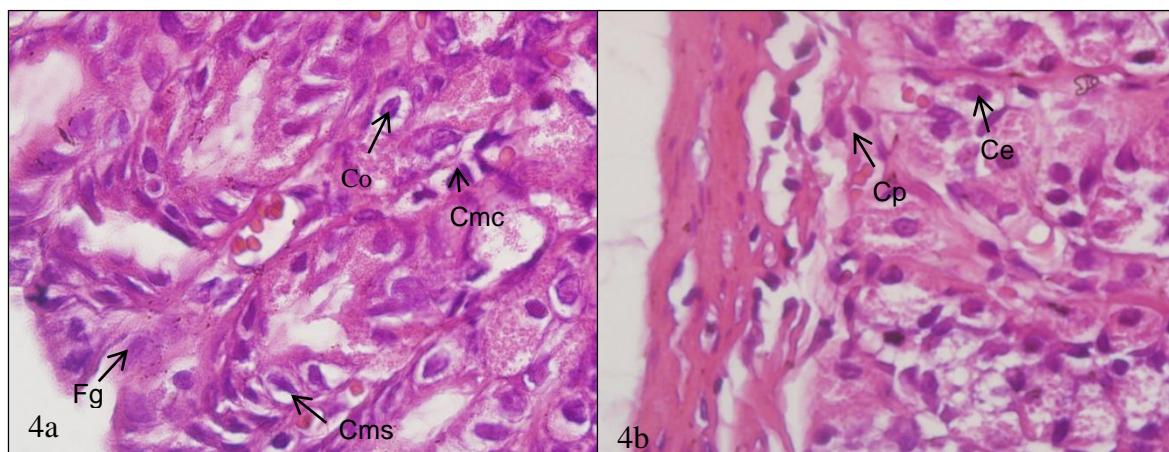
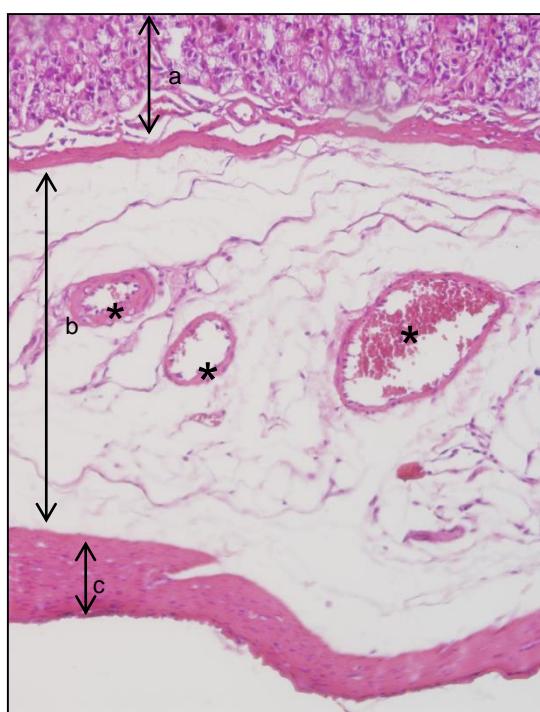


Figura 5 - Fragmento da região do corpo do estômago de rato Wistar macho. G1. Coloração H&E. Aumento 20X. **a:** Camada da mucosa. **b:** Camada da submucosa. **c:** Camada muscular. **Asterisco:** Vasos sanguíneos.



Quando comparado os grupo controle com os grupos G2 e G3 foi possível verificar que não houve quaisquer alterações morfológicas e histológicas entre os principais grupos celulares presentes na camada da mucosa do estômago (FIGURA 6 e 7). Também não foram encontradas alterações significativas nas camadas da submucosa e muscular. Estes resultados se diferem de resultados encontrados na literatura que comprovam alterações nas células epiteliais da mucosa gástrica e a degeneração de glândulas do estômago de ratos expostos a 375mg/kg de glifosato (TIZHE, 2013), uma dose bastante elevada quando comparada ao tratamento da presente pesquisa.

Figura 6^a - Fragmento da região do corpo do estômago de rato Wistar macho. G2. Coloração H&E. Aumento 100X. **Fg:** Fosseta gástrica. **Cms:** Células mucosas superficiais. **Cmc:** Células da mucosa do colo. **Co:** Células parietais ou oxínticas. **Figura 6b:** Fragmentação da região do corpo do estômago. Coloração H&E. Aumento 100X. **Cp:** Células principais. **Ce:** Células enteroendócrinas.

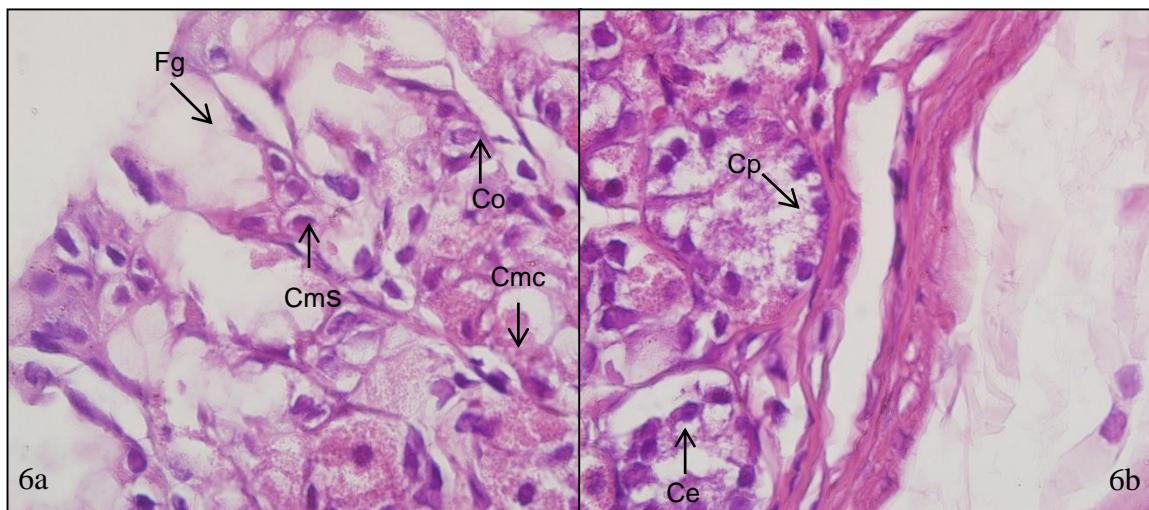
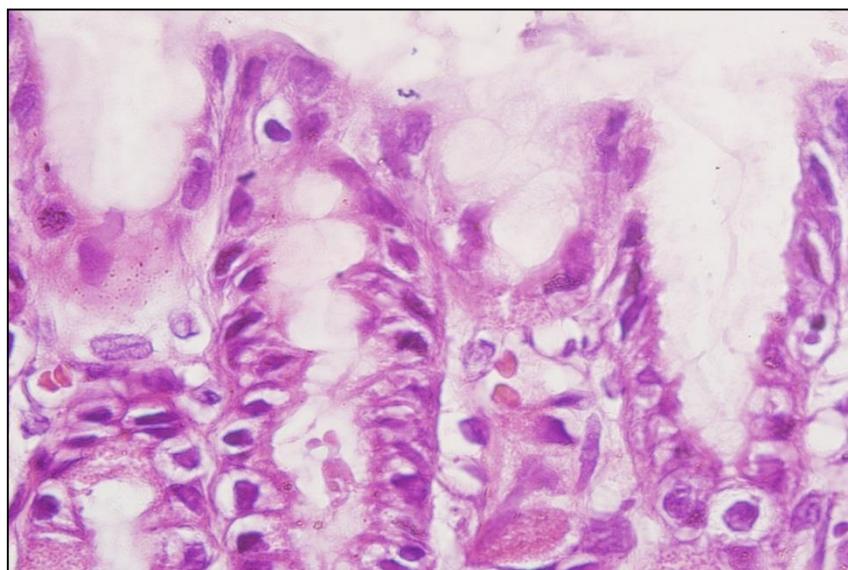


Figura 7 - Fragmento da região do corpo do estômago de rato Wistarr macho. G3. Coloração H&E. Aumento 100X. **Fg:** Fosseta gástrica. **Cms:** Células mucosas superficiais. **Cmc:** Células da mucosa do colo. **Co:** Células parietais ou oxínticas.



A avaliação do herbicida em trabalhos anteriores comprovou alguns efeitos no trato gastrointestinal, tais como irritações e úlceras após a ingestão oral do glifosato-surfactante em seres humanos (CHANG *et al.*, 1999), além de alterações após a exposição ao glifosato em doses menores que 10mg/ml o qual desequilibra de forma relevante as propriedades das barreiras de células intestinais (VASILUK, 2005).

Outras alterações no trato gastrointestinal foram encontradas por Chen e colaboradores (2013) no esôfago de pessoas após a ingestão do glifosato, onde foram identificadas lesões esofágicas de grau um e dois, após a ingestão foi observado que a toxicidade sistêmica apresentou complicações com um rápido desenvolvimento, além de sofrerem maior quantidade de doenças gastrointestinais.

Sugere-se que as doses utilizadas não foram suficientes para causar quaisquer tipos de alteração histológica entre os grupos tratados. Outras pesquisas encontradas na literatura relatam hiperplasia nas células da mucosa de peixes (*Piaractus brachypomus*) expostos a diferentes tratamentos com doses de até 120 mg L⁻¹ de glifosato (RAMÍREZ-DUARTE *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da massa corporal dos animais expostos ao herbicida durante o tratamento não apresentou diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos expostos. O ganho de massa corpórea entre os animais se apresentou bastante similar, demonstrando que o glifosato não comprometeu o crescimento das cobaias, onde as mesmas não apresentaram quaisquer efeitos negativos durante a manipulação diária, assim como os resultados encontrados em trabalhos com diferentes concentrações do herbicida glifosato (SANTOS, 2011; ROMANO, 2008).

A avaliação do peso corporal das cobaias tem como princípio indicar a saúde do animal, caso a massa corporal do animal se encontrar abaixo da média e durante o tratamento não indicar um ganho ou uma perda acentuada pode ser um indício de viabilidade do animal no experimento (KITA, 2004).

Conclusão

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa pode se concluir que o herbicida glifosato não apresentou interferência na evolução do peso corporal dos animais expostos e que o mesmo não apresentou quaisquer alterações histológicas nas doses testadas nos animais.

Demostrando assim a importância da utilização de diferentes protocolos, tais como análises estruturais como microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão, e também se testar outras técnicas de coloração e expor estes animais à diferentes concentrações, realizando uma avaliação completa do potencial toxicológico do herbicida em questão.

Referências

ANVISA, **ÍNDICE MONOGRAFICO.** Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias>. Acesso 28 fev 2014, 2010.

BUSKUHL, H.; ALMEIDA, R. C.; MARTIN, M. R. C. Desempenho sexual de ratos Winstar machos e fêmeas, submetidos à exposição sub-crônica ao herbicida glifosato - Roundup®. **Revisa Brasileira de Toxicologia.** v. 19, n. 1, p. 17-23, 2006.

CHANG, C. Y.; PENG, Y. C.; HUNG, D. Z.; HU, W.H.; YANG, D. Y.; LIN T.J. **Clinical impact of upper gastrointestinal tract injuries in glyphosate-surfactant oral intoxication.** Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462358>. Acesso 29 out 2014, 1999.

CHEN, H. H.; LIN, J. L.; HUANG, W. H.; WENG, C. H.; LEE, S. Y.; HSU, C. W.; CHEN, K. H.; LIANG, C. C.; YEN, T. H. Spectrum of corrosive esophageal injury after intentional paraquat or glyphosate-surfactant herbicide ingestion. **International Journal of General Medicine.** v. 6, p. 677-683, 2013.

CONCEA, **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea** – Ministério da Ciência, tecnologia e inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – Concea. Brasília/DF, 2013.

DRAKE, R. L.; VOLG, W.; MITCHELL. **GRAY'S: Anatomia para estudantes.** Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005, 1058 p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013, 556 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** 1ed. São Paulo: Editora Santos, 1983, 124p.

KITA, D. H. **Efeitos do pesticida Roundup® sobre o sistema reprodutor de ratos Winstar.** 43f. Monografia (Graduação) – Programa de Graduação em Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

KIERSZENBAUN, A. L. **Histologia e Biologia celular: Uma introdução à patologia.** 2ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008, 677p.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** 1º edição. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011, 191 p.

MADUREIRA, J. V. C.; SILVA, L. L. Herbicida glifosato: Efeitos tóxicos na saúde humana e de animais. **Revista de Biologia e Saúde da Unisep.** v.05, n.1, p.44-41, 2012.

MONSANTO, **Matéria prima: Glifosato, forma de atuação nas plantas.** Disponível em <http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/glifosato/capitulo1/capitulo1.asp>. Acesso 18 fev 2014, 2005.

RAMÍREZ-DUARTE, W. F.; BARRAGÁN-RONDÓ,I.S.; ESLAVA-MOCHA, P. R. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 28, n. 11, p. 547-554, 2008.

RICHARD, S.; MOSLEMI S.; SIPAHUTAR H.; BENACHOUR N.; SERELINI G. E.; Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. **Environmental Health Perspectives.** v. 113, n. 6, p. 716-720, 2005.

RIGOTTO, R. M.; SILVA, A. M. C.; FERREIRA, M. J. M.; ROSA, I. F.; AGUIAR, A. C. P. Tendências de agravos crônicos à saúde associados a agrotóxicos em região de fruticultura no Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de epidemiologia.** v. 16, n.3, p. 763-773, 2013.

ROMANO, R. M.; ROMANO M. A.; MOURA M. O.; OLIVEIRA C. A. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science.** v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

SANTOS, L. D. **Efeitos da exposição perinatal ao herbicida glifosato-Roundup® na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva.** 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração de Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2011.

SMITH, E. A.; OEHME, F. W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. **Veterinary and human toxicology.** v. 34, n. 6, p. 531-543, 1992.

THEOPHILO, C. F.; POLI, M. F. P.; CUERVO, M. R. M.; MILANEZ, J. F.; MELGAREJO, L.; PIZZATO, A. C.; Agrotóxicos permitidos no cultivo das frutas e verduras mais consumidas pela população brasileira e algumas de suas implicações na saúde. **Revista eletrônica PUCRS.** v.7, n. 1, p. 1-17, 2014.

TIZHE, E. V.; GIGINYA, N. D.; SHALLANGWA, J. M. Influence of zinc supplementation on histopathological changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure os Wistar rats to glyphosate. **Comparative Clinical Pathology.** v. 23, n. 5, p.1535-1543, 2013.

VAN DE GRAFF, K. M. **Anatomia humana.** 6ed. São Paulo: Editora Manole, 2003, 840p.

VASILUK, L.; PINTO, L. J.; MOORE, M.M. Oral bioavailability of glyphosate: studies using two intestinal cell lines. **Environmental Toxicology Chemistry**. v. 24, n. 1, p. 153-160, 2005.

Anexo



PARECER 013 / 2014 - CEUA/FAG

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade Assis Gurgacz – CEUA/FAG, reunida em sessão ordinária, no dia 04/06/2014, considera que o projeto abaixo especificado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, sendo **APROVADO**.

PROTOCOLO: **021 / 2014**

PESQUISADOR / PROFESSOR: Jéssica Vencatto Senem

RELATO DE CASO: Efeitos do Herbicida Glifosato sobre a Histologia do Estômago e do Duodeno de Ratos Wistar machos

Ao final do projeto, o pesquisador / professor deverá encaminhar à CEUA/FAG para acompanhamento da pesquisa o relatório final e a publicação de seus resultados, até 60 dias após o término do projeto, conforme formulário protocolado, bem como a comunicação de qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas à CEUA/FAG de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

O pesquisador / professor deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pela CEUA/FAG que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao animal participante que requeiram ação imediata.

Cascavel, 05 de Junho de 2014.


Renné L. S. Gomiero
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais