

Efeitos no duodeno de ratos Wistar machos expostos ao herbicida glifosato

Tânia Cardoso Pimentel¹; Pricilla Fabiani Marcon¹; Jefferson Fogaça Tomacheski¹; Gésica Moraes da Silva¹; Ellen Carolina Zawoski Gomes¹; Carla Bruna Pietrobon¹; Alana Lucia Vila Guerra¹; Jéssica Vencatto Senem².

Resumo: Com o crescente aumento do comércio de agrotóxicos, o herbicida glifosato vem sendo um dos mais utilizados em todo o mundo. Estudos comprovam efeitos tóxicos em humanos, como irritação ocular e dérmica, problemas cardiológicos, alterações respiratórias e digestivas, e diminuição das funções renais e hepáticas. Porém não há informações sobre seus efeitos no duodeno. Assim, esse estudo avaliou a ação do glifosato na morfologia das células duodenais de animais expostos ao herbicida. Para tanto, utilizou-se 30 ratos machos, com aproximadamente 60 dias de idade divididos em 3 grupos, um controle e dois grupos experimentais, os quais receberam 0, 0,346 e 1,73 µl/ 0,25ml por kg/PV, respectivamente. A morte dos animais ocorreu 90 dias após o início do tratamento, para posterior análise de sua histologia. Os resultados demonstraram que as vilosidades intestinais se apresentaram normais, porém, observaram-se alterações nas criptas de Lieberkühn.

Palavras-chave: Agrotóxico. Toxicidade. Intestino delgado.

Effects on the duodenum of Wistar rats exposed to glyphosate

Abstract: With the increasing commercial pesticide, herbicide glyphosate has been the most used worldwide. Studies show toxic effects in humans, such as eye and skin irritation, cardiac problems, respiratory and digestive disorders, and decreased renal and hepatic function. However there is no information on its effects in the duodenum, so this study evaluated the action of glyphosate in the morphology of duodenal cells of animals exposed to the herbicide. For this purpose, we used 30 male rats approximately 60 days of age divided into 3 groups, one control and two experimental groups which received 0, 1.73, and 0.346 uL / 0.25ml per kg / BW, respectively. The animals death occurred 90 days after initiation of treatment for analysis of their histology. The results showed that normal intestinal villi presented, however, changes were observed in the crypts of Lieberkühn.

Key words: Pesticides. Toxicity. Small intestine.

Introdução

Nos últimos anos o comércio de agrotóxicos vem crescendo consideravelmente, já que o uso da maioria dos herbicidas não impede o crescimento de ervas daninhas na agricultura. O glifosato é o herbicida de maior utilização mundial, visto que é muito eficiente no extermínio dessas plantas (AMARANTE JR; SANTOS, 2002).

O glifosato é classificado como um herbicida sistêmico, pós-emergente, não seletivo, derivado da glicina (GALLI; MONTEZUMA, 2005). Segundo a Agência Nacional de

¹ Acadêmicos do curso de Ciências Biológicas – Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel, Pr.

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

Vigilância Sanitária (ANVISA) (2010), os herbicidas são classificados em quatro categorias quanto à sua toxicidade, que vai do altamente perigoso (classe I) ao pouco perigoso (classe IV), sendo o glifosato classificado como pouco perigoso (classe IV).

Apesar dessa classificação, há relatos de estudos com o herbicida glifosato em peixes, indicando alterações como hipertrofia de células branquiais e descolamento de epitélio lamelar, dilatação e hiperemia dos seios venosos, formação de aneurisma, bem como hemorragia no fígado, necrose focal e vacuolização de hepatócitos (ALBINATI *et al.*, 2009).

Ramirez-Duarte *et al.*, (2008) observaram também em peixes expostos à diferentes concentrações do herbicida, hiperplasia de células de muco do estômago e pele, lesões necróticas em vários tecidos, degeneração de somas neurais no cérebro, lesões nas brânquias de grande gravidade, hipertrofia das células do epitélio, vacuolização de hepatócitos, congestão e alguns processos degenerativos no fígado. Segundo Anelli Júnior (2010), peixes expostos ao produto obtiveram mudanças estruturais nas brânquias, desregulando a sua tomada de oxigênio.

Em estudos realizados em ratos, foi possível observar uma significativa diferença quanto à separação balanoprepucial e exposição da glândula (ROMANO *et al.*, 2008). Esses animais também mostraram epidídimos e vesículas seminais mais pesados que o observado comumente (SANTOS, 2011). Alterações no ciclo estral de ratas foram relatadas por Buskül *et al.*, (2006).

Estudos comprovam efeitos tóxicos em humanos, como irritação ocular e dérmica, problemas cardiológicos, alterações respiratórias e digestivas, e diminuição das funções renais e hepáticas (BRADBERRY *et al.*, 2004). Em ratos utilizados em laboratório, foram observadas alterações das células do intestino (VASILUK *et al.*, 2005), alterações respiratórias com sangramentos, diarreia, e até a morte dos mesmos (ADAM *et al.*, 1997). Entretanto, ainda não foi evidenciado o estudo do duodeno de ratos submetidos à exposição ao glifosato. O duodeno compõe a primeira porção do intestino delgado, e é o órgão responsável pela digestão de gorduras e absorção de nutrientes provenientes do estômago (GUYTON; HALL, 2011; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Assim, tendo em vista a importância deste órgão para o bom funcionamento das atividades intestinais e do organismo como um todo, esse estudo avaliou os efeitos que o herbicida glifosato pode trazer à saúde humana e animal. Dessa forma, esse estudo investigou os efeitos do glifosato nas células do duodeno de ratos Wistar machos.

Material e Métodos

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com aproximadamente 60 dias de idade, com peso médio entre 250 a 350 gramas, provenientes do Biotério do Hospital Veterinário da Faculdade Assis Gurgacz. Os animais foram divididos em três grupos com dez indivíduos o G1, G2 e G3, sendo acondicionados no total de duas cobaias em cada gaiola de polipropileno autoclavável, forradas com maravalha. A temperatura foi controlada (entre 20 e 24°C), bem como a luminosidade em ciclos de fotoperíodo claro/escuro de 12 horas cada. Durante todo o tratamento os animais receberam diariamente ração padrão *ad libitum* e água natural.

A administração do herbicida se deu com a contenção manual dos animais, para introdução da sonda de gavage. Dessa forma, o grupo controle (G1) recebeu apenas 0,25mL de água natural, enquanto os grupos G2 e G3 receberam glifosato nas doses de 0,346 µL e 1,73 µL por kg/PV, no volume de 0,25mL de água, respectivamente, segundo o método proposto por Romano et al. (2008). O tratamento era realizado três vezes por semana (segundas, quartas e sextas), em torno das 18 horas, além da pesagem de todos os animais nestes períodos.

Após noventa dias de tratamento, os animais foram levados ao laboratório de Fisiologia da Faculdade Assis Gurgacz onde permaneceram 24 horas em jejum. A seguir, as cobaias foram anestesiadas com cetamina (75mg/kg de rato) e com xilazina (1mg/kg de rato) por via intraperitoneal (IP). Esse momento, bem como todas as etapas do método, se deu em ambiente silencioso, visando à tranquilidade do animal. Após certificado o efeito anestésico, foi efetuada a exsanguinação por punção da veia cava inferior para induzir a morte dos animais.

Posteriormente, foi realizada incisão cirúrgica longitudinal ventral abdominal para extração do duodeno, indicado nas figuras (Figura 1 e 2). O órgão foi fracionado e fixado em formol para dar seguimento ao processamento histológico de rotina para microscopia de luz segundo protocolo proposto por Junqueira e Junqueira (1983), e as lâminas confeccionadas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As imagens obtidas foram fotomicrografadas para análise de sua morfologia. Durante todo o procedimento com uma cobaia, as demais estavam reservadas em sala isolada, não presenciando as etapas do método umas com as outras.

Figura 1 - Incisão cirúrgica longitudinal ventral abdominal para extração do duodeno.



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores.

Figura 2 - Extração do duodeno.



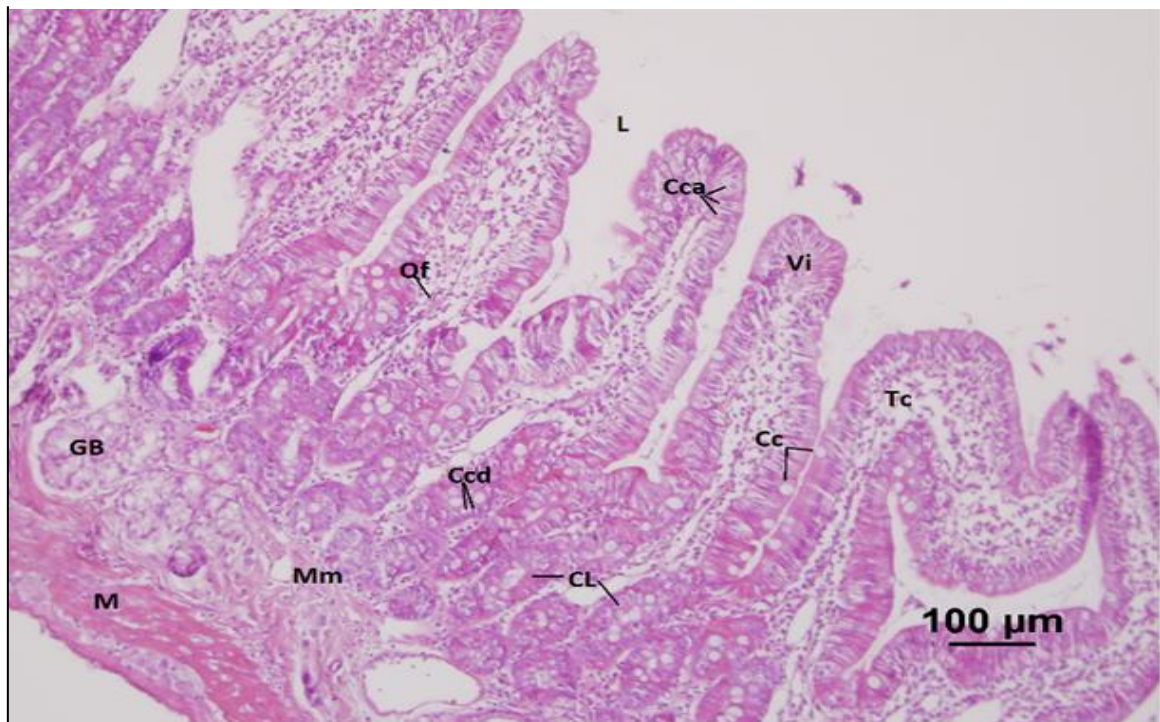
Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores.

Resultados e Discussão

Na análise morfológica do duodeno foi possível verificar que este órgão é formado por músculo liso, dividido em quatro camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Internamente é formado por vilosidades intestinais, que são evaginações da mucosa voltadas para o lúmen (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), elas são compostas por tecido conjuntivo (lâmina própria) e por células absorptivas que formam microvilosidades, apresentando borda em escova; entre essas células, se localizam as células caliciformes (GARTNER; HIATT, 2007), conforme observado na figura 3.

Na porção inferior das vilosidades encontram-se as criptas de Lieberkühn, que se estendem até a muscular da mucosa, e as glândulas de Brunner, cujas secreções são capazes de neutralizar o ácido gástrico existente no quimo. Essas secreções são impelidas dentro das criptas de Lieberkühn por meio de ductos, que então lançam secreções entre as vilosidades (TORTORA; GRABOWSKI, 2002). Internamente às criptas de Lieberkühn, encontram-se as células de Paneth, responsáveis pelo controle microbiano do intestino. Na lâmina própria é possível encontrar canais em fundo cego, chamados de quilíferos, por onde passam os nutrientes absorvidos pelas células epiteliais (GARTNER; HIATT, 2002), conforme observado em G1 (Figura 3).

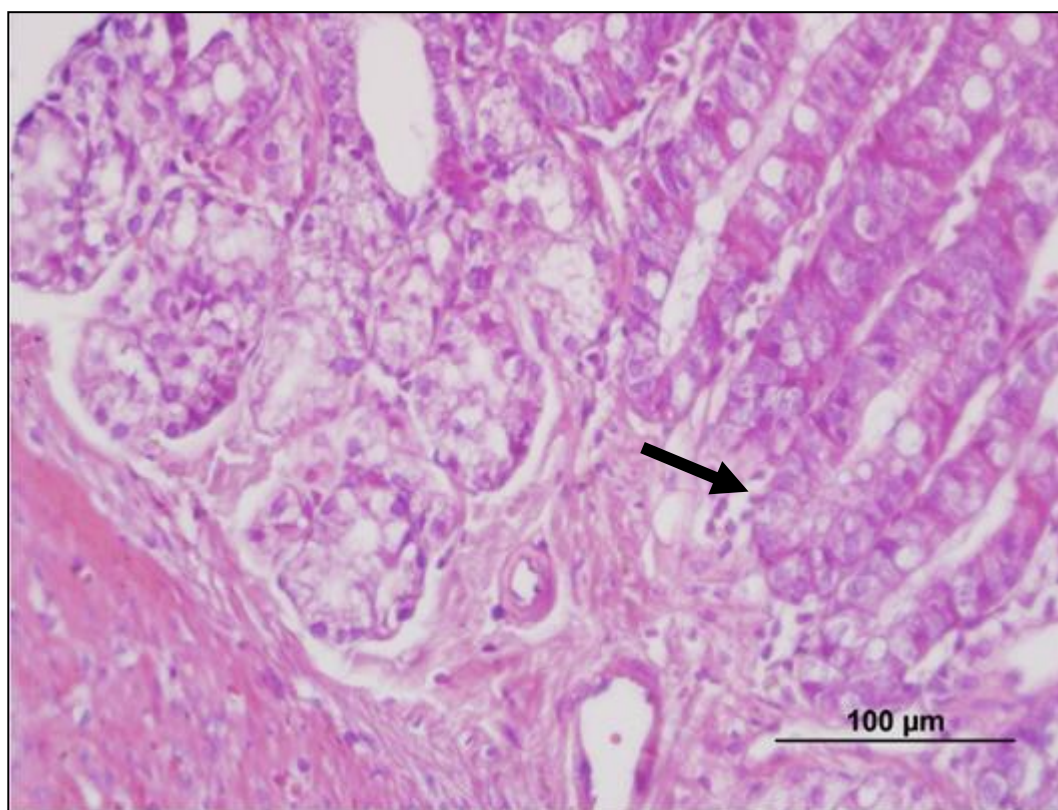
Figura 3 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G1).



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Coloração H&E. 100X. Cc: célula caliciforme; Cca: células colunares absorptivas; Ccd: célula cilíndrica; CL: criptas de Lieberkühn; GB: glândulas de Brunner; L: lúmen; M: muscular; Mm: muscular da mucosa; Qf: Quilífero; Tc: tecido conjuntivo; Vi: vilosidade intestinal.

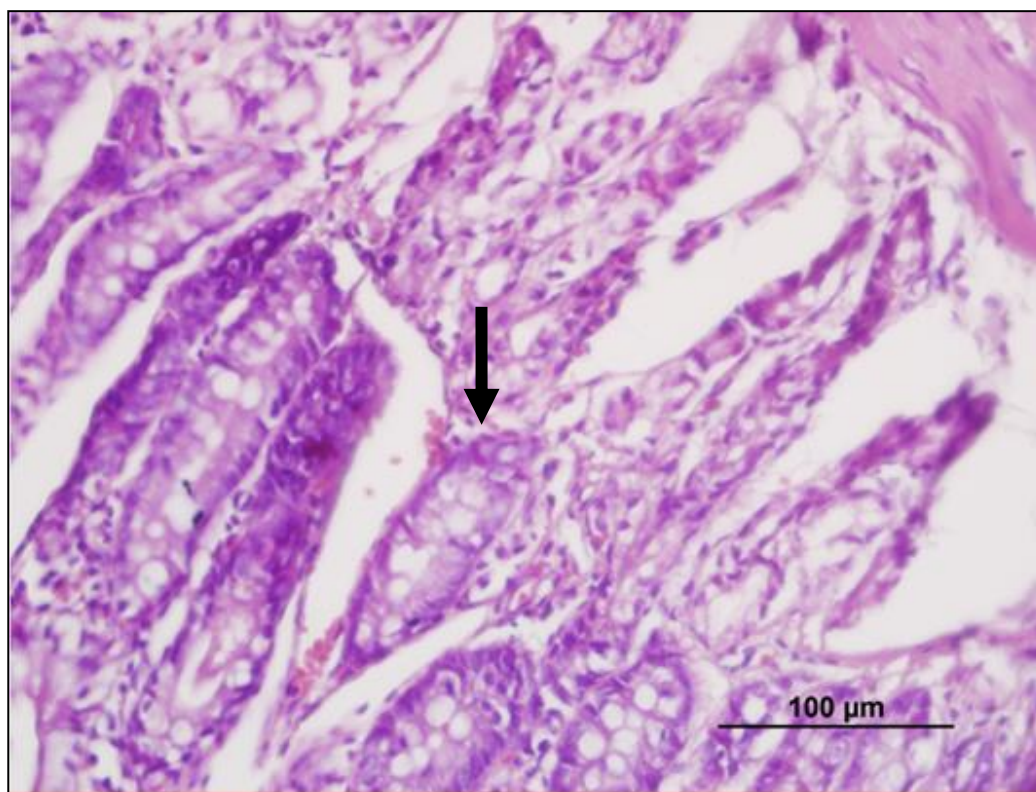
Quando comparados G1 com G2 e G3, foi possível observar um espaço entre as criptas de Lieberkühn, (Figuras 4, 5 e 6), resultado obtido também por Kundu *et al.* (2011), mostrando que os agrotóxicos podem atuar na desintegração de células, causando espaços entre algumas estruturas. Porém, essas alterações dependem de vários fatores, como o grau de toxicidade, a concentração do agrotóxico e o tempo de exposição. As vilosidades intestinais se apresentaram normais em todos os grupos, não demonstrando nenhum tipo de alteração (Figura 7, 8 e 9).

Figura 4 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G1).



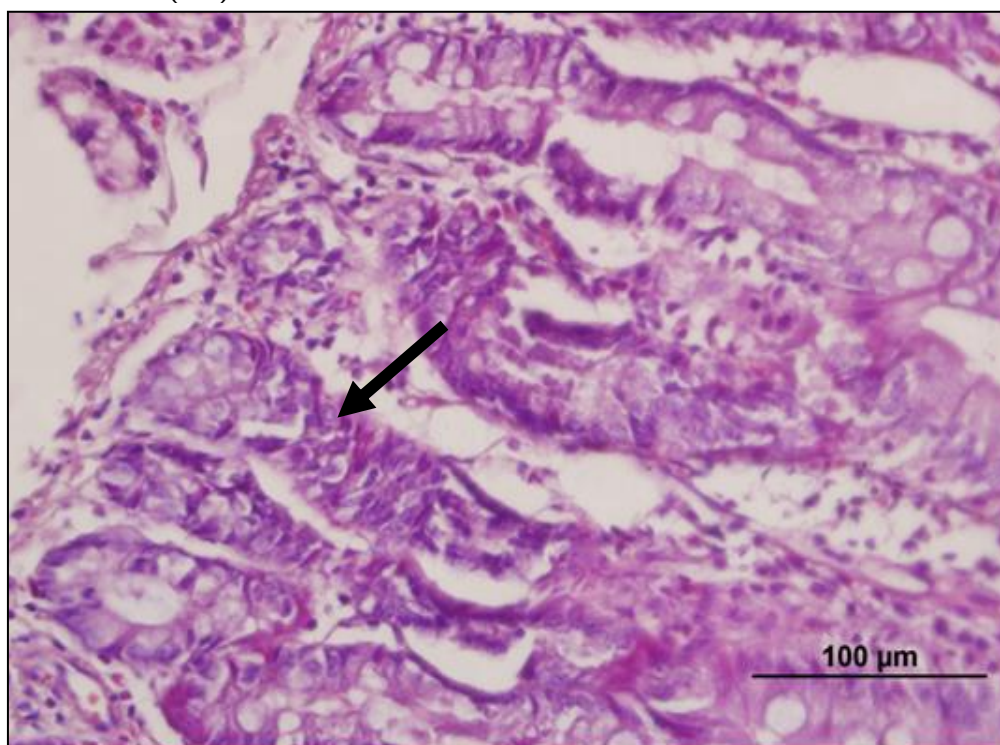
Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Criptas de Lieberkühn indicadas pela seta. Coloração H&E. 400X.

Figura 5 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G2).



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Criptas de Lieberkühn indicadas pela seta. Coloração H&E. 400X.

Figura 6 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G3).



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Criptas de Lieberkühn indicadas pela seta. Coloração H&E. 400X.

Figura 7 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G1), mostrando as vilosidades intestinais.

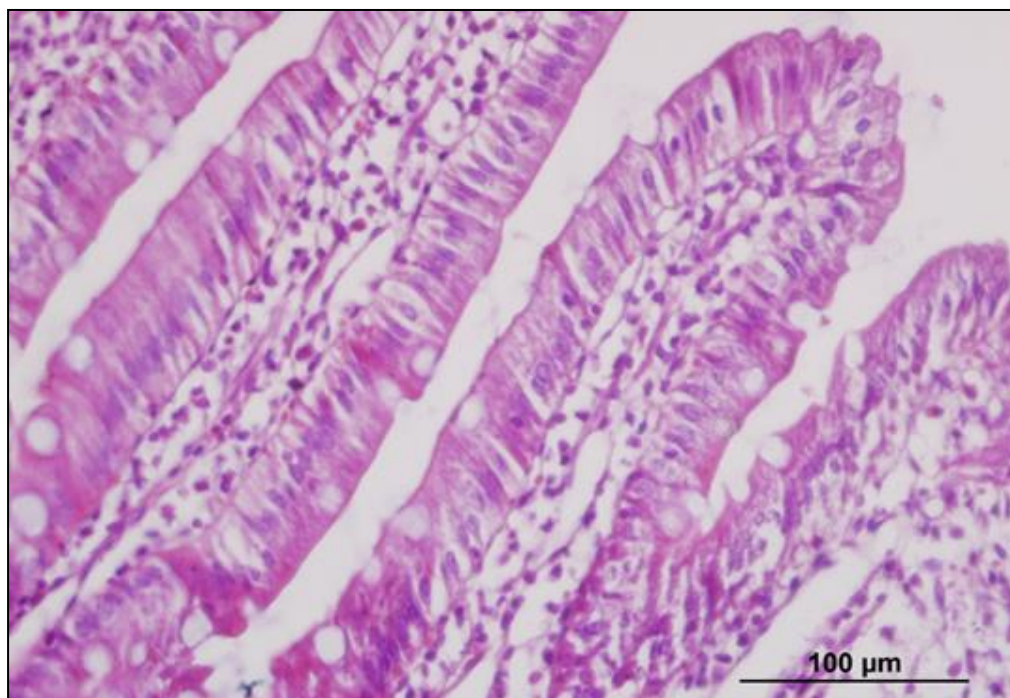
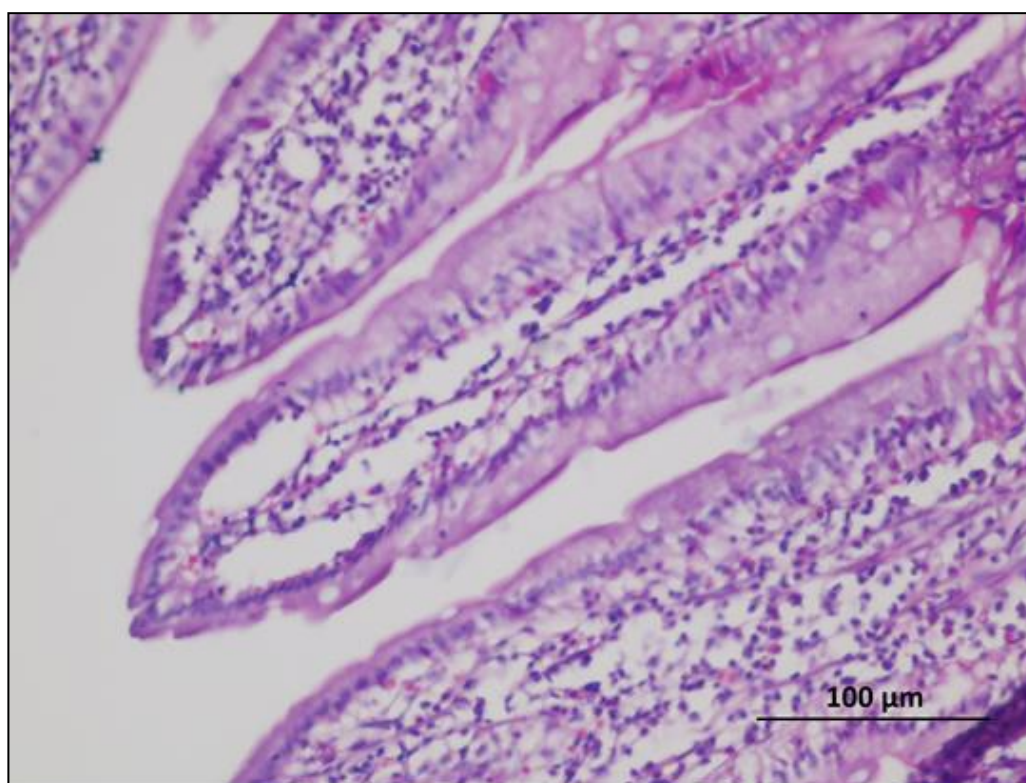
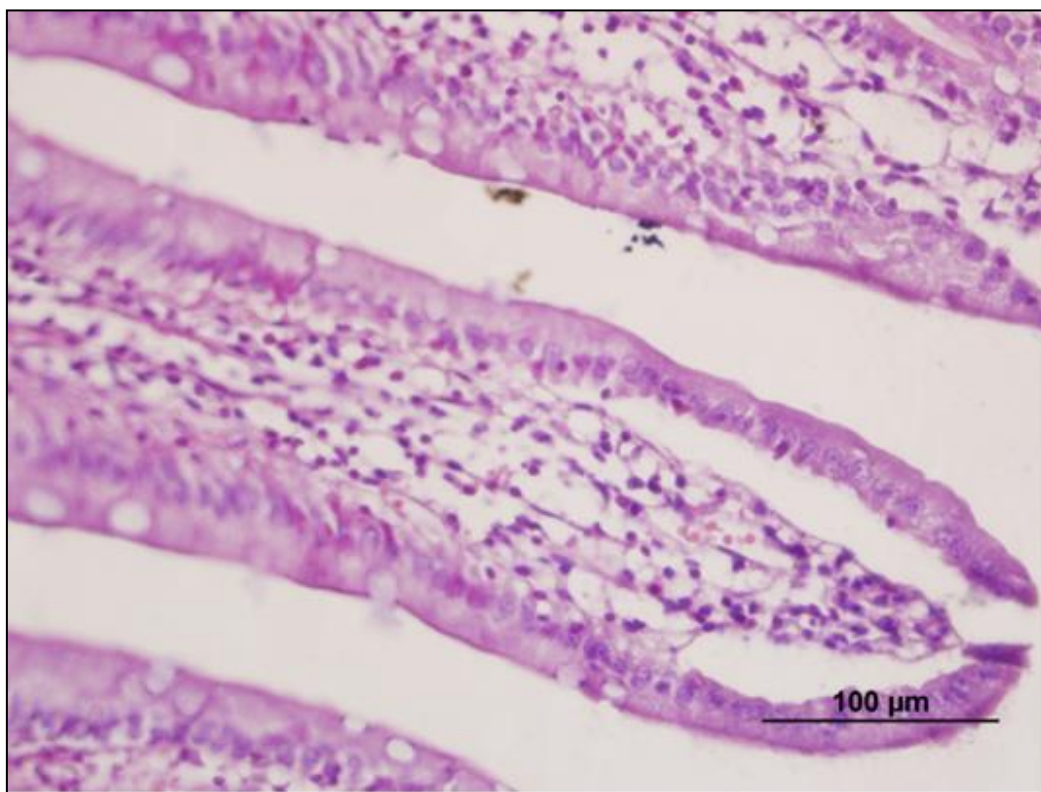


Figura 8 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G2), mostrando as vilosidades intestinais.



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Coloração H&E. 400X.

Figura 9 - Corte histológico longitudinal de duodeno de rato Wistar macho (G3), mostrando as vilosidades intestinais.



Fonte: Fotomicrografia elaborada pelos autores. Coloração H&E. 400X.

Vasiluk *et al.*, (2005) observaram em teste *in vitro*, que as barreiras de transporte do intestino são interrompidas com a ação do glifosato; em outros testes, também pôde observar que o intestino é o local onde ocorre maior acúmulo do produto. Estudos realizados com alimentos transgênicos resistentes ao glifosato mostram alterações nas criptas intestinais, como o seu alongamento; vilosidades interrompidas; aumento de lisossomos (PUSZTAI, 2001) e de enterócitos nas vilosidades; degeneração de mitocôndrias, deterioração da lâmina basal bem como uma diminuição na quantidade de microvilosidades (FARES; SAYED, 1998); atrofia muscular intestinal, redução de eritrócitos, ruptura de vilosidades, e hipertrofia de núcleos das células também puderam ser observadas (KUNDU *et al.*, 2011), divergindo dos resultados obtidos por Sbruzzi *et al.*, (2013) e Battistelli *et al.*, (2010), que não observaram nenhuma alteração estrutural e celular no intestino.

É conhecido que soluções de diversas características químicas podem influenciar o trato gastrointestinal; estudos realizados com ratos submetidos a doses de etanol resultaram na deficiência de enzimas; toxicidade nos neurônios mioentéricos do duodeno, que alterou regiões das células como o núcleo e o citoplasma, resultando na deficiência de síntese de

proteínas (ARCELES *et al.*, 2012). Teixeira *et al.*, (2007) observaram em pintos tratados com betaína, engrossamento da mucosa e da lâmina própria, causado por um aumento das criptas; produção excessiva de muco e áreas com bastante sangue.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o glifosato administrado em diferentes concentrações pode apresentar alterações nas criptas de Lieberkühn nas células duodenais de ratos Wistar machos. Para tanto, serão necessárias mais pesquisas nessa área, a fim de identificar a interação do herbicida glifosato com o duodeno, e poder estabelecer maiores relações com as alterações aqui encontradas.

Referências

ADAM, A.; MARZUKI, A.; ABDUL, R. H.; ABDUL A. M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 39, n.3, p.147-151, 1997.

ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61 n.3, 2009.

AMARANTE JR, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**. v.25, n.4, 2002.

ANELLI JÚNIOR, L.C. **Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup sobre a função cardiorrespiratória de matrinxã, Brycon amazonicus (Teleostei, characidae)**. 91f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Critérios para a classificação Toxicológica**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 15 de out 2014, 2010.

ARCELES, M. L.; KUHN, S. B.; PIMENTEL, A. L.; BIANCHI, F. J.; OLIVEIRA-BIANCHI, L. R.; MELLO, S. A. Estudo Morfométrico do Plexo Mientérico do Duodeno de Ratos Submetidos ao Alcoolismo. **Revista UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 14, n. 1, p. 21-4, 2012.

BATTISTELLI, S.; CITTERIO, B.; MALATESTA, M. Histochemical and morpho-metrical study of mouse intestine epithelium after a long term diet containing genetically modified soybean. **European jornal of histochemistry**. v. 54, n. 3, p. 1-5, 2010.

BRADBERRY, S.M.; PROUDFOOT, A.T.; ALLISTER VALE, J. Glyphosate Poisoning. **Toxicological Reviews**. v. 23, n.3, p. 159-167. 2004.

BUSKÜHL, H.; ALMEIDA, R.F.; CALLIARI-MARTIN, M.R. . Desempenho sexual de ratos Wistar, machos e fêmeas, submetidos à exposição sub-crônica ao herbicida glifosato-Roundup. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v.19, n.1, p. 17-23, 2006.

FARES, N.; SAYED, A. K. Fine structural changes in the ileum of mice fed on endotoxin-treated potatoes. **Natural Toxins**. v. 6, p. 219-233, 1998.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M. C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: ACADCOM Gráfica, 2005, 66p.

GARTNER, L.P., HIATT J.L. **Atlas colorido de histologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 413p.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia em cores**. 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 592p.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, 973 p.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 427p.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1ed. São Paulo: Santos, 1983, 124p.

KUNDU, C. R.; ROYCHOUDHURY, S.; CAPCAROVA, M. Malathion-induced sublethal toxicity on the intestine of cricket frog (*Fejervarya limnocharis*). **Journal of Environmental Science and Health**. v. 46, n. 8, p. 691-6, 2011.

PUSZTAI, A. Alimentos Genéticamente Modificados: ¿Son un Riesgo para la Salud Animal o Humana?. **Action Bioscience**. 2001.

RAMÍREZ- DUARTE, W.F.; RONDÓN-BARRAGÁN, 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, 2008.

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 of Veterinary Research Animal Science**. v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

SANTOS, L.D. **Efeito da exposição perinatal ao herbicida glifosato-roundup na diferenciação sexual e endocrinologia reprodutiva**. 89f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2011.

SBRUZZI, F. A.; VENÂNCIO, V. P.; RESCK, M.C. C.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; AZEVEDO, L. Transgenic and conventional Brazilian soybeans don't cause or prevent

preneoplastic colon lesions or oxidative stress in a 90-day in vivo study. **Revista de nutrição**. v. 26, n. 4, p. 443-453, 2013.

TEIXEIRA, M.; NIANG, T. M. S.; GOMES, A. V. C.; FILHO, W. L.T.; LOPES, C. W. G. Alterações clínicas e patológicas durante a infecção experimental com *Eimeria acervulina* em frangos de corte suplementados com betaína. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 14, n. 3, p. 127-132, 2007.

TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1048p.

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