

EFEITOS DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE O PÂNCREAS E A GLICEMIA DE RATOS WISTAR MACHOS

TOMACHESKI, Jefferson Fogaça¹
SEMEM, Jéssica Vencatto²

RESUMO

O herbicida glifosato é o mais procurado mundialmente, por sua ação rápida e eficiente no controle de plantas daninhas e pragas agrícolas. Estudos demonstram que o herbicida classificado como pouco tóxico, causa diversos tipos de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, em animais e também humanos. O presente trabalho visa à análise histológica do pâncreas e a glicemia de ratos Wistar machos, expostos oralmente ao herbicida por método de gavagem, nas concentrações de 0,346 µl e 1,73 µl. Os resultados dos grupos G2 e G3 demonstraram que as cobaias sofreram necrose por coagulação nos ácinos pancreáticos e estavam hiperglicêmicos, porém, as ilhotas de Langerhans mantiveram sua integridade celular.

PALAVRAS-CHAVE: Ácinos Pancreáticos. Hiperglicemia. Necrose.

EFFECTS OF GLYPHOSATE HERBICIDE ON PANCREAS AND BLOOD GLUCOSE OF MALE WISTAR RATS

ABSTRACT

Glyphosate herbicide is the most wanted worldwide for their quick and efficient action in control weed and agricultural pests. Studies show that the herbicide, classified as slightly toxic, causes various types of morphological, biochemical and physiological alterations, in animals and humans. The present work aims the histological analysis of the pancreas and blood sugar on male Wistar rats exposed orally to the herbicide by gavage method, with concentrations of 0,346 and 1,73 ul. The results of the G2 and G3 groups have shown that guinea pigs suffered coagulation necrosis of the pancreatic acinar and were hyperglycemic, however, the Langerhan's islet maintained their integrity.

KEYWORDS: Pyramidal cells. Hyperglycemia. Necrosis.

1. INTRODUÇÃO

Devido à economia avançar gradativamente, com importações e exportações globalizadas, tornaram-se necessárias novas maneiras de cultivo, investindo em pesquisas tecnológicas, sendo uma das principais a produção de insumos artificiais, capazes de nutrir o solo, suprimindo a carência de nutrientes e ao mesmo tempo, combater pragas agrícolas, aumentando a produção (ELIAS, 2003). No intuito de controlar pragas agrícolas, os agrotóxicos são divididos quanto a sua aplicação em campo, sendo eles herbicidas, inseticidas, fungicidas, acaricidas, entre outros (OPAS; OMS, 1997).

O glifosato Roundup[®], patente da Monsanto, é um herbicida de difícil monitoramento em amostras ambientais, ocorrendo diversos trabalhos científicos devido a sua ampla utilização. A classificação como herbicida é não seletivo e de ação sistêmica. Quanto ao nível de risco ambiental,

¹ Biólogo. Discente no Programa de Pós-Graduação em Entomologia (UFPR). jeffersontomacheski@gmail.com.

² Bióloga. Mestre em Biociências e Saúde (UNIOESTE). jessivencatto@gmail.com:

seu grau toxicológico está classificado como Classe IV, descrito como pouco tóxico (ANVISA, 2010). Seu uso implica diretamente como potente inibidor de atividade da enzima EPSPS (5-enol-piruvil-shiquimato-3-fosfato sintase), responsável por catalisar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina, tirosina e triptofano (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Diante de tal classificação, ainda que seja considerado como pouco tóxico, diversas pesquisas básicas apontam efeitos encontrados em diferentes órgãos, tecidos e seres, que incluem os animais e inclusive, humanos (ALBINATI et al., 2009; RODRIGUES, 2008; ROMANO et al.; 2008; VASCONCELLOS et al., 2009). Entretanto, tais pesquisas não incluem o estudo sobre a histologia pancreática.

O pâncreas é o órgão responsável por secretar enzimas e pró-enzimas, como tripsinogênio, quimotripsinogênio, carboxipolipeptidase, ribonuclease, desoxirribonuclease, triacilglicerol lipase, entre outras que realizam a digestão de nutrientes; além disso, produz insulina e glucagon, envolvidos na regulação da glicemia (GUYTON; HALL, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Dessa forma o presente estudo, teve como objetivo analisar a histologia do pâncreas e a glicemia de ratos Wistar machos, submetidos à exposição oral do herbicida glifosato.

2. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) Wistar machos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Hospital Veterinário da Faculdade Assis Gurgacz, autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FAG), registrada sob o parecer 015/2014 (Em anexo). Foram formados três grupos: G1, G2 e G3, com 10 animais cada, mantidos em caixas de polipropileno forradas com maravalha, água natural e ração padrão comercial *ad libidum*, em ambiente climatizado à $\pm 20^{\circ}\text{C}$, permanecendo em ciclo claro/escuro de 12 horas. As cobaias foram submetidas ao método de gavagem, adaptado de Romano et al. (2008), onde o grupo G1 recebeu água destilada, e os grupos G2 e G3 receberam doses de glifosato em soluções de 0,346 μl e 1,73 μl , respectivamente, três vezes por semana, durante oito semanas, no volume de 0,25ml.

Após 90 dias de tratamento, as cobaias permaneceram oito horas em jejum, e em seguida foi realizada a eutanásia, inicialmente com método anestésico e relaxante muscular (cetamina e xilazina, dosados a 10% do peso corporal), e posteriormente feito exsanguinação via veia cava inferior (CONCEA, 2013). Nesse momento, foi verificada a glicose com glicosímetro Optium Xceed. A seguir foram realizados cortes ventrais, para extração do pâncreas, seu fracionamento e

fixação em aldeído fórmico à 10% por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram transferidas para solução de álcool 70%, e então foram submetidas ao processamento histológico de rotina para microscopia de luz conforme as técnicas básicas de citologia e histologia propostas por Junqueira e Junqueira (1983).

Ao término do processamento, as lâminas obtidas nessa etapa foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Olympus BX60 com câmera digital DP71, no laboratório de fotomicroscopia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), para posterior discussão dos resultados.

Os resultados foram analisados estatisticamente através do quadro de análise de variância (ANOVA) e aplicou-se o teste de comparação de médias de Tukey, com significância de 95%.

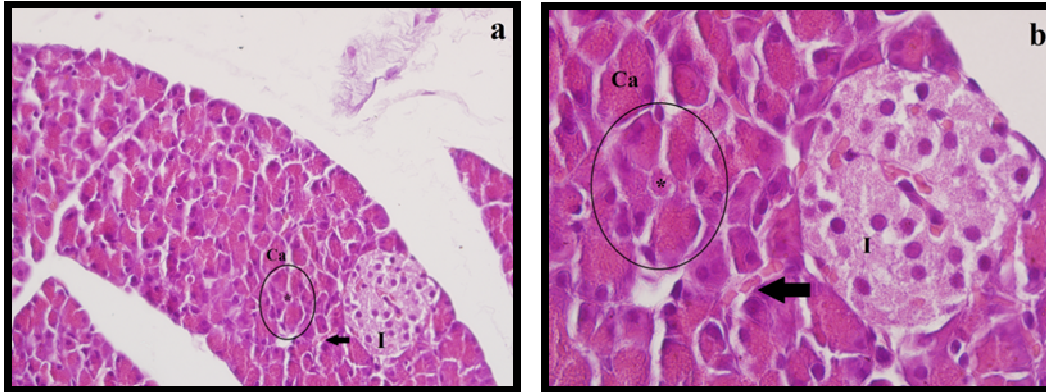
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise histológica do tecido pancreático, pode-se evidenciar sua morfologia sendo constituída por uma delicada cápsula de tecido conjuntivo, formando septos, subdividindo-os em lóbulos, que são envoltos por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e ductos excretores (GARTNER; HIATT, 2010). A porção exócrina da glândula é composta pelos ácinos pancreáticos, células piramidais que possuem diversos grânulos de secreção, responsáveis pela liberação de enzimas e pró-enzimas, como tripsinogênio, quimotripsinogênio, carboxipolipeptidase, ribonuclease, desoxirribonuclease, triacilglicerol lipase, entre outras. Várias células acinosas formam um ácino arredondado ou oval, cuja luz é ocupada por três ou quatro células centroacinosas, início do sistema de ductos do pâncreas, constituindo o ducto excretor intralobular, que em conjunto formam o ducto interlobular, e posteriormente anastomosam-se, formando o ducto pancreático. (GARTNER; HIATT, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A porção endócrina do pâncreas é constituída pelas ilhotas pancreáticas, um conglomerado esférico, altamente vascularizado. O parênquima das ilhotas contém células α (Alfa), β (Beta), δ (Delta), F e G (GLERAN, 2003). Dentre estas, possui grande importância as células α e β , por secretarem glucagon e insulina, respectivamente. As células β constituem a maioria das células das ilhotas, secretando também amilina. A insulina exerce maior função sobre a glicose sanguínea, aumentando a captação, uso e armazenamento nos tecidos muscular e adiposo (CARROLL, 2007). As células α secretam glucagon, que aumenta os níveis de glicose sanguínea e a gliconeogênese no fígado, captando aminoácidos e os convertendo em glicose (GUYTON; HALL, 2011). A

distribuição destas células no tecido é facilmente reconhecida, devido as características morfológicas, conforme observado por esse trabalho através do grupo G1 (Fig. 1).

Figura 1 – Grupo G1 – Tecido pancreático de rato Wistar macho: Ácino Pancreático (Circulado), Célula Acinar (Ca), Célula Centro Acinosa (*), Ilhota de Langerhans (I) e Ducto Intralobular (Seta). Coloração: HE. Aumento de 400x (a) e 1000x (b).



Quando analisadas as lâminas dos grupos G2 e G3, foram observadas alterações histológicas, comparadas com o grupo G1. Na porção exócrina do tecido, os ácinos apresentaram-se edemaciados, com as delimitações da membrana plasmática indefinidas, citoplasma opaco e núcleos parcialmente ou totais degenerados, porém, não apresentaram indícios de fibrose, hemorragia ou infiltração de células de defesa, que possa caracterizar uma inflamação (Fig. 2 e 3).

Figura 2 – Grupo G2 - Tecido pancreático de rato Wistar macho: Necrose (N), Ilhota de Langerhans (I) e Veia Pancreática (V). Destaque na área acinar, onde ocorreu necrose por coagulação. Coloração: HE. Aumento de 400x (a) e 1000x (b).

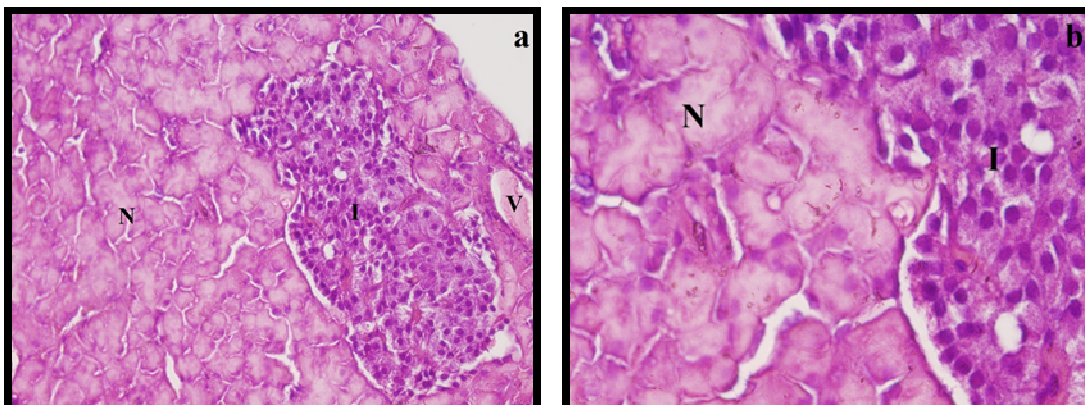
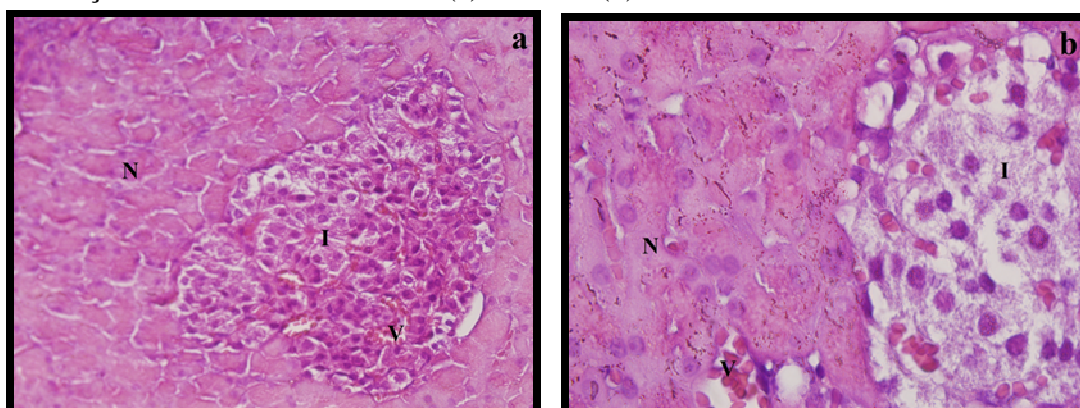


Figura 3 – Grupo 3 - Tecido pancreático de rato Wistar macho: Necrose (N), Ilhota de Langerhans (I) e Veia Pancreática (V). Neste grupo também fica evidente a área necrótica circundando a ilhota. Coloração: HE. Aumento de 400x (a) e 1000x (b).



A quantidade de produtos químicos que produzem lesão celular é interminável, pois substâncias simples como a glicose ou sal em concentrações hipertônicas, podem causar alterações celulares diretas ou indiretas, devido ao desequilíbrio homeostático eletrolítico das células. Outras substâncias que estão presentes no nosso dia-a-dia também causam estes efeitos, como poluentes do meio ambiente ou do ar, inseticidas ou herbicidas (ROBBINS; COTRAN, 2010).

As membranas celulares permanecem intactas até seus últimos estágios, até tornarem-se permeáveis a solutos, geralmente contidos fora do interior da célula, caracterizando uma apoptose celular ou necrose. A necrose por coagulação é descrita conforme as alterações no citoplasma e no núcleo, apresentando citoplasma eosinófilo, o núcleo apresenta inicialmente um acúmulo de cromatina, e posteriormente, evoluindo para três possíveis alterações: Picnose (núcleo menor e mais basófilico), Cariorrexe (núcleo fragmentado) e Cariólise (núcleo pode ser expulso da célula ou perder a coloração da cromatina progressivamente). Alterações específicas da necrose, responsáveis por diversas variações de morte celular, são descritas como necrose por liquefação, gordurosa, caseosa e fibrinóide (FRANCO; MONTENEGRO, 2010; ROBBINS; COTRAN, 2010; RUBIN; FARBER, 2002).

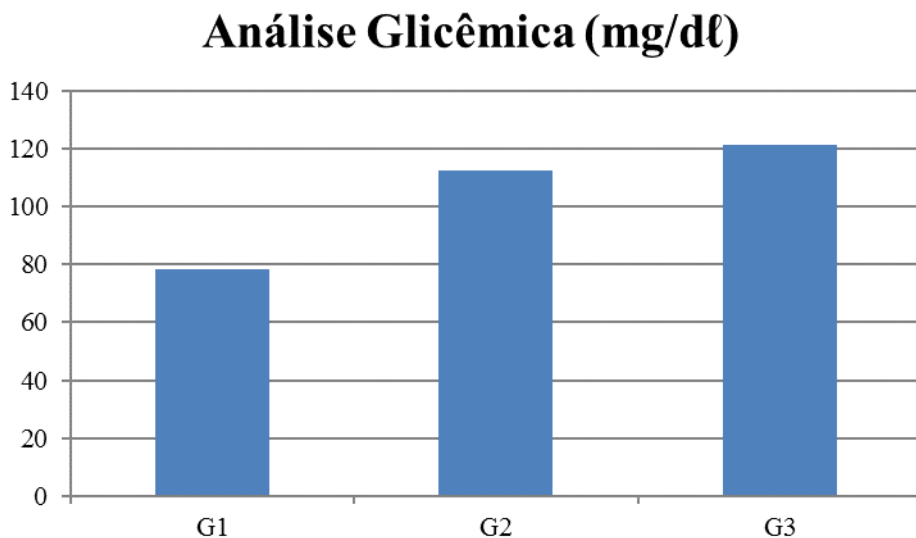
Beuret e colaboradores (2004) relataram em seu experimento com glifosato a lipoperoxidação lipídica, afetando o fígado e o leite materno de ratas grávidas, e Langiano e Martinez (2008) utilizando o peixe *Prochilodus lineatus*, demonstraram que em concentrações subletais, o glifosato apresenta alterações histológicas, bioquímicas e fisiológicas. Por não haver presença de infiltrado inflamatório e ou células de defesa, sugere-se que o herbicida agiu no citoplasma dos ácinos pancreáticos, causando um estresse oxidativo, que levou a morte celular devido à exposição aos radicais livres.

Radical livre hidroxila (OH) é um radical peróxido que reage com a membrana plasmática, retirando um átomo de hidrogênio da parede fosfolipídica e transformando em um novo radical livre. Este, por sua vez, reage com o oxigênio dissolvido no citoplasma, formando um novo radical peróxido, surgindo assim, uma reação em cadeia, destruindo a membrana celular. Por ser uma glândula exócrina, o ácino pancreático produz grandes quantidades de enzimas, estas retidas nos grânulos de zimogênio, até o momento em que for necessário seu uso. Com a quebra fosfolipídica, além de destruir a membrana da célula, também é corrompida a membrana do grânulo de zimogênio, liberando o conteúdo enzimático no citoplasma, supondo a necrose encontrada nos ácinos pancreáticos sem a presença de células fagocitárias. O DNA, quando exposto extensamente ao radical hidroxila, sofre quebra de filamentos, bases modificadas e ligações cruzadas entre os filamentos, ocorrendo a morte celular devido a lesão oxidativa, conhecida como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (KING, 2007; LIMA; ABDALLA, 2001; RUBIN; FARBER, 2002).

As células endócrinas mantiveram-se normais, com a delimitação celular da ilhota pancreática intacta, células α e β com suas membranas celulares e formatos iguais tanto em G2 quanto em G3, quando comparados com G1. Quanto à secreção de insulina e glucagon, não foram feitos testes bioquímicos medindo suas concentrações. Tizhe et al. (2014) utilizaram o glifosato em concentração 375 mg/kg e zinco como suplementação a fim de evitar danos crônicos, demonstraram a evidência da degeneração celular dos ácinos pancreáticos e a ilhota pancreática em cobaias tratadas somente com o herbicida, havendo presença de inflamação, células de defesa e necrose. O grupo de animais tratados com glifosato e zinco apresentou hiperplasia das células acinares e os septos intralobulares estavam distendidos por transudato.

A análise dos dados (ANOVA) efetuada a partir da glicemia revelou que houve alterações nas concentrações plasmáticas de glicose em G2 e G3, quando comparados com G1. Os resultados foram significativos a 99% de probabilidade, sendo assim, foram analisados pelo teste de comparação Tukey, ao nível de 95% de significância, conforme mostra a figura 4.

Figura 4 – Análise glicêmica (mg/dl) dos ratos que receberam água destilada (G1) e glifosato nas concentrações de 0,346 µl (G2) e 1,73 µl (G3).



A média do grupo G1 foi diferente do grupo G2 e G3, porém, os grupos G2 e G3, estatisticamente, possuem médias iguais. Este resultado demonstra o que foi visualizado nas análises glicêmicas, onde G2 e G3 foram expostos a concentrações diferentes do herbicida, mas o dano causado é proporcionalmente parecido, levando ambos a desenvolver hiperglicemia e necrose das células acinares. Conforme relatado neste trabalho, a ilhota pancreática permaneceu intacta nas concentrações de glifosato utilizadas, e comparando-as com o experimento de Tizhe et al. (2014), no qual houve necrose da ilhota e infiltrado inflamatório, sugere-se que em concentrações baixas, o glifosato causa dano progressivo, levando a morte celular dos ácinos pancreáticos, e posteriormente, da ilhota pancreática, visto que mesmo com suas células morfológicamente normais, sua via metabólica está alterada, causando hiperglicemia, demonstrando que ambas as patologias parecem estar ligadas ao estresse oxidativo, que varia sua toxicidade frente à concentração exposta ao herbicida pela cobaia.

Estudos realizados com mulheres grávidas expostas a agrotóxicos organofosforados (preparo da calda, aplicação em campo ou manutenção de equipamentos de aplicação), mostraram que 506 mulheres relataram ter adquirido diabetes mellitus gestacional (SALDANA et al., 2007). Montgomery et al. (2008) associaram pesticidas organoclorados e organofosforados à aplicadores de pesticidas com incidência de diabetes, relacionando a exposição aos agrotóxicos à longo prazo com maior risco de ocorrência de diabetes. Outro estudo, envolvendo as esposas de agricultores, avaliou a incidência de casos de diabetes em mulheres que relataram nunca ter tido contato com misturas ou aplicações de agrotóxicos, supostamente contaminadas através do ar, água ou alimento (STARLING et al., 2014). Relações entre o glifosato e estas pesquisas aparentam ser semelhantes,

porém não foi encontrado nada descrito. Patologias agudas, crônicas e subcrônicas apresentando necrose do tecido pancreático e hiperglicemia, são relatadas envolvendo desequilíbrio hormonal de insulina e suas vias metabólicas (LEE; CHUNG, 1999; TIZHE et al., 2014; TONINI et al., 1993).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pâncreas, sendo um órgão de extrema importância, mostrou-se suscetível quando exposto ao herbicida glifosato, ocorrendo necrose das células acinares e hiperglicemia, podendo evoluir para uma pancreatite, conforme demonstrado em outros estudos. Dessa forma, novos estudos são sugeridos, sendo feitas análises de perfil bioquímico sobre a regulação da glicemia, assim como análises de ultraestrutura, destacando detalhes da morfologia das células α e β em relação á ilhota preservada, expostas ao herbicida nas concentrações utilizadas neste experimento.

REFERÊNCIAS

ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; DE 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, p. 621-627, 2009.

ANVISA. **Monografias de Agrotóxicos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6e400500474594899c26dc3fbc4c6735/G01.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 10 Abr. 2014, 2010.

BEURET, C.J.; ZIRULNIK, F.; GIMÉNEZ, M.S. Effects of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. **Reproductive Toxicology**. v. 19, n. 4, p. 201-204, 2004.

CARROLL, R.G. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 262p.

CONCEA – CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretrizes da Prática de Eutanásia do Concea**. Disponível em: www.cobea.org.br/arquivo/download?ID_ARQUIVO=36. Acesso em 30 Mai. 2014, 2013.

ELIAS, D. **Globalização e Agricultura: A Região de Ribeirão Preto – SP**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003, 407p.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. **Patologia: Processos Gerais**. 5º ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 331p.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Glifosato: Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura**. São Paulo: Acadcom Gráfica e Editora Ltda, 2005, 66p.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas Colorido de Histologia**. 5^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 435p.

GLERIAN, A. **Manual de Histologia: Texto e Atlas para os Estudantes da Área da Saúde**. São Paulo: Atheneu, 2003, 223p.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 1151p.

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

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

KING, T.C. **Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 421p.

LANGIANO, V.C.; MARTINEZ, C.B. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**. v. 147, n. 2, p. 222-231, 2008.

LEE, A.Y.W.; CHUNG, S.S.M. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **The Faseb Journal**. v. 13, n. 1, p. 23-30, 1999.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação Lipídica: Mecanismos e Avaliação em Amostras Biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 37, n. 3, p. 293-303, Set. – Dez. 2001.

MONTGOMERY, M.P.; KAMEL, F.; SALDANA, T.M.; ALAVANJA, M.C.R.; SANDLER, D.P. Incident Diabetes and Pesticide Exposure Among Licensed Pesticide Applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. **American Journal of Epidemiology**. v. 167, n. 10, p. 1235-1246, 2008.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde. Ministério da Saúde; OMS – Organização Mundial da Saúde. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>. Acesso em 25 Abr. 2014, 1997.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathologic Basis of Disease**. 8^o ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010, 1450p.

RODRIGUES, H.G. **Efeito do Glifosato sobre a Estabilidade de Eritrócitos Humanos e de *Rattus norvegicus* em Solução Salina Fisiológica**, 53f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 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 and Animal Science**. v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002, 1562p.
SALDANA, T.M.; BASSO, O.; HOPPIN, J.A.; BAIRD, D.D.; KNOTT, C.; BLAIR, A.;
ALAVANJA, M.C.R.; SANDLER, D.P. Pesticide Exposure and Self-Reported Gestational
Diabetes Mellitus in the Agricultural Health Study. **Diabetes Care**. v. 30, n. 3, p. 529-534, 2007.

STARLING, A.P.; UMBACH, D.M.; KAMEL, F.; LONG, S.; SANDLER, D.P.; HOPPIN, J.A.
Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study.
Occupational e Environmental Medicine. v. 71, n. 9, p. 629-635, 2014.

TIZHE, E.V.; IBRAHIM, N.D.G.; FATIHU, M.Y.; ONYEBUCHI, I.I.; GEORGE, B.D.J.;
AMBALI, S.F.; SHALLANGWA, J.M. Influence of zinc supplementation on histopathological
changes in the stomach, liver, kidney, brain, pancreas and spleen during subchronic exposure of
Wistar rats to glyphosate. **Comparative Clinical Pathology**. v. 23, n. 5, p.1535-1543, 2014.

TONINI, K.C.; ISPERANZINI, M.B.; NEVES, M.M.; RODRIGUES, C.; GOLDENBERG, S.
Pancreatite aguda necro-hemorrágica induzida por taurocolato de sódio. Estudo das lesões anatomo-
patológicas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 8, n. 3, p. 96-103, 1993.

VASCONCELLOS, M.G.; VERANI, N.F.; SÁ, O.R. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos Crônicos
do Herbicida Roundup (Glifosato) Sobre a Diferenciação Gonadal do Bagre *Rhamdia hilarri*
(Valenciennes, 1840). **Revista HISPECI & LEMA ON LINE** - Centro Universitário
UNIFAFIBE. Disponível em:
<http://www.unifafibe.com.br/revistasonline/arquivos/revistafafibeonline/sumario/9/17052011170755.pdf>. Acesso em 24 Abr. 2014, 2009.