



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUCAS FREITAS BERGAMASCHI PEREIRA DA SILVA

**DESVENDANDO OS EFEITOS DO GLIFOSATO: UMA COMPARAÇÃO
MORFOLÓGICA PROFUNDA NO TECIDO EPITELIAL DE RATOS EXPOSTOS
ORALMENTE E POR INALAÇÃO**

Presidente Prudente - SP
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUCAS FREITAS BERGAMASCHI PEREIRA DA SILVA

**DESVENDANDO OS EFEITOS DO GLIFOSATO: UMA COMPARAÇÃO
MORFOLÓGICA PROFUNDA NO TECIDO EPITELIAL DE RATOS EXPOSTOS
ORALMENTE E POR INALAÇÃO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientadora:
Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi

Presidente Prudente - SP
2024

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.136 1 Silva, Lucas Freitas Bergamaschi Pereira da
S586d Desvendando os efeitos do glifosato: uma comparação morfológica profunda no tecido epitelial de ratos expostos oralmente e por inalação \ Lucas Freitas Bergamaschi Pereira da Silva; orientadora Renata Calciolari Rossi. -- Presidente Prudente, 2024.
30 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2024.
Bibliografia.

1. Herbicidas. 2. Toxicidade. 3. Modelos animais. I. Rossi, Renata Calciolari, orient. II. Título.

LUCAS FREITAS BERGAMASCHI PEREIRA DA SILVA

**DESVENDANDO OS EFEITOS DO GLIFOSATO: UMA COMPARAÇÃO
MORFOLÓGICA PROFUNDA NO TECIDO EPITELIAL DE RATOS EXPOSTOS
ORALMENTE E POR INALAÇÃO**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre. - Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 28 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi(Orientadora)
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Ana Clara Campagnolo Gonçalves Toledo
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Ana Karina Marques Salge Mendonça
Universidade Federal de Goiás - UFGO
Goiás - GO

DEDICATÓRIA

Gostaria de iniciar essa dedicatória lembrando da minha família que são a base de quem eu sou hoje e que fazem parte da minha vida principalmente meus pais e avós.

Dedico também à Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) no qual eu tenho orgulho em dizer que onde foi minha vida acadêmica.

Dedico ao meio acadêmico que já fez estudos abordando o glifosato e que a partir deste trabalho possa fomentar novos trabalhos sobre o tema.

Dedico à minha orientadora Renata Calciolari Rossi que sempre está a frente dos trabalhos e à disposição dando apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sempre estar conduzindo na minha vida em todos os aspectos e permitindo que possa estar realizando a reta final do mestrado considerado como um momento importante para mim.

Agradeço também a minha mãe Rosa Helena por estar sempre presente na minha vida em todos os momentos sempre me incentivando, encorajando e dando suporte em todas as situações sendo uma mulher de muita fibra e determinada e de um grande coração.

Agradeço aos meus avós maternos Sidney e Ciro, apesar de já não estarem presentes fisicamente, por sempre terem me motivado nas minhas escolhas e servidos como inspiração.

Agradeço ao meu pai Carlos Eduardo, meus avós paternos Marina e Fernando, meus tios, minhas primas e toda minha família por fazerem parte da minha vida e me ajudarem na formação de quem eu sou hoje.

Agradeço a minha orientadora Renata Calciolari Rossi por ter me aceito como orientando sempre me dando suporte e apoio durante todo o ciclo do mestrado e com quem eu tive uma grande oportunidade de ter sido aluno durante a graduação de Medicina na UNOESTE.

Agradeço à Universidade do Oeste Paulista por ter sido minha casa no âmbito acadêmico tanto no período universitário quanto no período de pós-graduação onde eu pude obter conhecimento e ser quem eu sou hoje.

Agradeço aos alunos Ana Clara Grandi Calarge, Caio Germanovix, Isadora de Araújo e Marina Tavares Silvestrini Tiezzi pela participação do trabalho.

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser.
Mas tenho que querer o que for.
O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de ter êxito.
Condições de palácio tem em qualquer terra larga
Mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”
(Fernando Pessoa)*

RESUMO

Desvendando os efeitos do glifosato: uma comparação morfológica profunda no tecido epitelial de ratos expostos oralmente e por inalação

O Brasil é considerado o país que mais consome agroquímicos em todo o mundo, sendo um fato preocupante para a saúde pública e ambiental. As formas de exposição aos agroquímicos são variadas, dentre elas as mais encontradas são a exposição oral e inalatória podendo gerar diversos malefícios a saúde, atingindo órgãos e sistemas. Dentre os vários agroquímicos utilizados no Brasil, o herbicida Glifosato que vem sendo popularmente muito discutido devido seus possíveis danos à saúde e sua grande expansão no mercado agrícola. O objetivo do presente estudo é avaliar a presença de fibrose e de mastócitos na epiderme do dorso de ratos submetidos às exposições inalatória e oral ao glifosato, utilizando-se de métodos histológicos e comparar os resultados entre os tipos e concentrações de exposição. O estudo foi aprovado pela CEUA sob protocolo 5684, proveniente de material armazenado onde foram utilizados 112 ratos Wistar machos divididos aleatoriamente em 8 grupos de concentrações diferentes ao herbicida (baixa, média e alta), sendo 4 grupos expostos por via inalatória e 4 grupos expostos por via oral. A exposição foi realizada por 180 dias, posteriormente os animais foram eutanasiados e coletado tecido epitelial a fim de analisar os processos patológicos por meio das colorações de azul de toluidina e picrossirius. Nos resultados, notou-se maior quantidade de fibrose nos grupos de alta concentração do glifosato em relação ao de média e baixa concentração com uma alteração muito mais acentuada no grupo inalatório em relação ao grupo exposto de forma oral. Observou-se alteração da quantidade de mastócitos íntegros e degranulados principalmente no grupo inalatório Este estudo demonstrou que as exposições inalatória e oral são capazes de provocar alterações dérmicas como fibrose e processo inflamatório e a utilização de equipamentos de proteção individual são indispensáveis quando da utilização deste tipo de herbicida.

Palavras-chave: Herbicidas. Toxicidade. Modelos animais.

ABSTRACT

Unraveling the effects of glyphosate: an in-depth morphological comparison in the epithelial tissue of orally and inhalation-exposed rats

Brazil is considered the country that consumes the most agrochemicals in the world, which is a worrying fact for public and environmental health. The forms of exposure to agrochemicals are varied, among them the most common are oral and inhalational exposure, which can cause various health hazards, affecting organs and systems. Among the various agrochemicals used in Brazil, the herbicide Glyphosate has been popularly discussed due to its possible damage to health and its great expansion in the agricultural market. The aim of the present study is to evaluate the presence of fibrosis and mast cells in the epidermis of the dorsum of rats subjected to inhalational and oral exposure to glyphosate, using histological methods, and to compare the results between the types and concentrations of exposure. The study was approved by CEUA under protocol 5684, from stored material where 112 male Wistar rats were randomly divided into 8 groups of different concentrations to the herbicide (low, medium and high), 4 groups exposed by inhalation and 4 groups exposed orally. The exposure was carried out for 180 days, then the animals were euthanized and epithelial tissue was collected in order to analyze the pathological processes by means of toluidine blue and picosirius stains. In the results, a greater amount of fibrosis was observed in the groups with high concentration of glyphosate compared to the group with medium and low concentration, with a much more pronounced change in the inhaled group compared to the group exposed orally. Changes in the amount of intact and degranulated mast cells were observed, especially in the inhaled group. This study demonstrated that inhalational and oral exposures are capable of causing dermal alterations such as fibrosis and inflammatory process and the use of personal protective equipment is essential when using this type of herbicide.

Keywords: Herbicides. Toxicity. Animals models

LISTA DE SIGLAS

AMPA	- Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNMT1	- DNA-metiltransferase
GACI	- Grupo alta concentração inalatória
GACO	- Grupo alta concentração oral
GBCI	- Grupo baixa exposição inalatória
GBCO	- Grupo baixa concentração oral
GCI	- Grupo controle inalatório
GCO	- Grupo controle oral
GMCI	- Grupo média exposição inalatória
GMCO	- Grupo média concentração oral
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
Unoeste	- Universidade do Oeste Paulista

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Caixas de inalação.....	19
Figura 2 -	Avaliação de fibrose em ratos expostos via oral ao herbicida glifosato.....	21
Figura 3 -	Avaliação de fibrose em ratos expostos via inalatória ao herbicida Glifosato.....	22
Figura 4 -	Avaliação dos mastócitos íntegros(A) e dos mastócitos degranulados(B) em ratos com exposição via oral ao herbicida glifosato.....	22
Figura 5 -	Avaliação dos mastócitos íntegros(A) e dos mastócitos degranulados(B) em ratos com exposição inalatória ao herbicida glifosato.....	23

SUMÁRIO

Desvendando os efeitos do glifosato: uma comparação morfológica profunda no tecido epitelial de ratos expostos oralmente e por inalação.....	13
Introdução.....	14
Materiais e Métodos.....	16
Aspectos de natureza ética.....	16
Caracterização da amostra.....	16
Protocolo de exposição inalatória e oral ao herbicida glifosato.....	17
Coleta de material.....	18
Protocolo de desidratação e inclusão do material.....	18
Análise histológica.....	19
Coloração picrossirius.....	19
Coloração azul de toluidina.....	19
Análise dos estatística.....	19
Resultados.....	21
Discussão.....	24
Conclusão.....	27
Referências.....	28

Desvendando os efeitos do glifosato: uma comparação morfológica profunda no tecido epitelial de ratos expostos oralmente e por inalação

Lucas Freitas Bergamaschi Pereira da Silva, Ana Clara Grandi Calarge, Caio Germanovix, Isadora de Araújo, Marina Tavares Silvestrini Tiezzi, Renata Calciolari Rossi

Mestrado em Ciências da Saúde

Autor correspondente:

Renata Calciolari Rossi

Rua José Bongiovani, 700 – Cidade Universitária

Presidente Prudente – SP, Brasil

CEP: 19050-920

E-mail: renatacalciolari@terra.com.br

O artigo será submetido na revista Medicina da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto(FMRP) Qualis A3

INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande exportador de agroquímicos e um dos maiores produtores agropecuários do mundo, o que é de grande importância para economia local. A grande extensão territorial proporciona que o país seja o maior consumidor de agrotóxicos do mundo¹. Para manter a grande produção, o setor utiliza sementes transgênicas e insumos químicos, como fertilizantes e agroquímicos, os quais quando pulverizados, por intermédio de tratores e aviões, sobre as lavouras, não atingem somente as “pragas” das plantas, mas também o solo, as águas, o ar, a chuva e os alimentos em geral².

Os agroquímicos são normalmente utilizados na agricultura, na pecuária e nos domicílios e, desse modo, pode-se notar a frequente presença dessas substâncias no cotidiano da população, sendo uma classe de produtos potencialmente tóxicos e perigosos que podem causar danos à saúde como quadro de intoxicação podendo ser aguda, subaguda ou crônica e até óbito de pessoas e animais³. O mercado brasileiro de agroquímicos cresceu muito rápido nessa última década (190%), sendo assim, maior que o dobro apresentado pelo mercado mundial (93%), desse modo, o Brasil está em primeiro lugar desde o ano de 2008. O consumo é muito mais intenso de herbicidas (45%), depois estão os fungicidas (14%) e inseticidas (12%)⁴.

Segundo Centro de Estudos Estratégico da Fiocruz, o herbicida mais utilizado no mundo todo é o glifosato, o qual foi descoberto pela Monsanto em 1970. O produto atua inibindo uma enzima que faz parte da síntese de aminoácidos essenciais para o crescimento de plantas. Por ser um herbicida não seletivo ele é capaz de matar a maioria dos vegetais, assim seu uso na agricultura se expandiu de maneira desenfreada⁵. Devido o país ser um grande produtor mundial de alimentos além de outros produtos relacionados ao agronegócio é um grande consumidor de agroquímicos incluindo o glifosato e o seu uso produtos atingem não somente os trabalhadores mas o meio ambiente e as famílias tanto na zona rural quanto na zona urbana devido a contaminação do meio ambiente, alimentos, água e solo⁶.

O glifosato tem toxicidade aguda relativamente baixa, porém alguns de seus componentes como os surfactantes apresentam-se em doses mais elevadas do que o próprio ingrediente ativo que são significativamente mais tóxicos do que o próprio glifosato⁷. Apesar da toxicidade aguda ser baixa, pode causar defeitos crônicos no

nascimento de determinadas espécies animais quando administrado em maiores doses e por muito tempo⁸.

A justificativa desse trabalho é escassez de estudos na literatura sobre a utilização do glifosato no tecido epitelial não estando bem esclarecido sobre seus efeitos a longo prazo pois a maioria dos artigos avaliam os efeitos do glifosato nos sistemas sanguíneo, reprodutor e neurológico porém como existe a exposição dérmica associada a exposição é importante avaliar as implicações dessa exposição na saúde da população e na saúde do trabalhador devido a sua ampla utilização em lavouras no Brasil e seu uso encontrar-se proibido em várias cidades da Europa, devido ao seu risco carcinogênico. O entendimento sobre as possíveis alterações epiteliais, poderá servir como um alerta para os riscos do uso do herbicida e avaliar restrição ou não do seu uso, assim como uma forma de incentivo para a utilização de equipamentos de proteção individual em trabalhadores da zona rural.

O objetivo desse trabalho é avaliar histopatologicamente o tecido epitelial de ratos submetidos à exposição inalatória/dérmica e oral ao herbicida glifosato, quantificar mastócitos e fibrose no tecido epitelial de ratos expostos ao herbicida glifosato e comparar os resultados entre os diferentes tipos de concentrações do herbicida.

MATERIAIS E MÉTODOS

ASPECTOS DE NATUREZA ÉTICA

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para uso dos Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA). Este projeto faz parte de outro trabalho, aprovado pelo protocolo 5684.

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para determinar o tamanho amostral mínimo para comparação entre escores para 8 grupos, utilizou-se o pacote “pwr”, disponível no Programa R para cálculo de tamanhos amostrais para condução de Análise de variância. Após obter-se o número mínimo de elementos por amostra, adicionou-se 15% a mais de elementos por amostra para adaptá-las a uma possível distribuição não paramétrica utilizou-se os seguintes parâmetros:

- a.) Poder do teste = 80%
- b.) Nível de significância = 5%
- c.) Número de grupos a serem comparados = 8
- d.) Tamanho do efeito (D de Cohen) = 0,50

A partir destes dados conclui-se serem necessários, no mínimo 12 elementos por grupo. Adicionando-se 15% a mais de elementos, optou-se por utilizar 14 animais por grupo.

Portanto, para a realização do estudo, foram utilizados 112 ratos Wistar adultos machos (300-450 g), fornecidos pelo Biotério Central da UNOESTE, alocados em gaiolas plásticas coletivas (5 animais por gaiola e uma gaiola com 4 animais) medindo 600 X 415 milímetros, a temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro). Foram divididos 56 ratos expostos por via oral e 56 ratos expostos por via inalatória ao herbicida glifosato.

PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO INALATÓRIA E ORAL AO HERBICIDA GLIFOSATO

O protocolo de exposição contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®. As concentrações do herbicida foram administradas após diluídas em 10 ml de água destilada. Todos os grupos foram expostos por um tempo aproximado de 15 minutos diários, de segunda à sexta-feira, por um período de 180 dias, sendo divididos 14 animais para cada grupo.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos:

- Grupo controle inalatório - GCI (n=14): expostos à nebulização com solução contendo 10 ml de água destilada.
- Grupo de baixa concentração inalatório - GBCI: (n=14): Expostos a nebulização ao herbicida com $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/há).
- Grupo de média concentração inalatório - GMCI (n=14): Expostos a nebulização ao herbicida com $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha).
- Grupo de alta concentração inalatório - GACI (n=14): Expostos a nebulização ao herbicida com $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha).
- Grupo controle oral - GCO (n=14): dieta padrão nebulizada com solução contendo 10 ml de água destilada.
- Grupo de baixa concentração oral - GBCO: (n=14): dieta padrão nebulizada com o herbicida, sendo $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/há).
- Grupo de média concentração oral - GMCO (n=14): dieta padrão nebulizada com o herbicida, sendo $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha).
- Grupo de alta concentração oral - GACO (n=14): dieta padrão nebulizada com o herbicida, sendo $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha). A dieta padrão para animais foi nebulizada nas mesmas condições em que os animais foram expostos as nebulizações, dentro da caixa acoplada ao nebulizador, sempre no

dia anterior ao dia do consumo. Além disso, tanto para os animais do grupos inalatórios quanto dos grupos orais, a ração foi pesada a cada troca para analisar o consumo alimentar.

Figura 1- Caixas de inalação.



Fonte: Próprio autor.

Os animais receberam dieta padrão para animais de laboratório (Primor®) e água *ad libitum*.

COLETA DO MATERIAL

Os ratos foram eutanasiados utilizando-se tiopental sódico (100 a 150 mg/kg do peso corporal) por via intraperitoneal. Após esta etapa, foi realizada a tricotomia e retirada de um fragmento de 2,0 cm da região dorsal de cada animal. Posteriormente, o material foi emblocado em parafina.

PROTOCOLO DE DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO DO MATERIAL

A desidratação foi feita através de imersão numa bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais. A graduação nas concentrações é imprescindível para que ocorra a desidratação homogênea dos tecidos, evitando que ocorram danos na estrutura tecidual. Para a inclusão do material, o mesmo foi imerso em parafina líquida a 60°C, obtendo-se, em temperatura ambiente, um bloco que contém o fragmento de tecido em seu interior. Após esta etapa, foram levados para a microtomia, os cortes coletados em lâminas de vidro, e encaminhados para a coloração.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Cortes de 5 μ m das amostras de tecido epitelial foram corados com imunohistoquímica para subsequente avaliação morfológica e verificação de possíveis processos patológicos gerais na pele do dorso dos animais.

COLORAÇÃO PICROSSIRIUS

Os tecidos epiteliais foram fixados em 10% de formalina por 24 horas. Após a fixação, foram processados e corados com Picrossirius Red para estudar fibrose. A presença de fibrose foi avaliada utilizando-se de microscópio contendo lente polarizadora. As imagens foram capturadas em microscópio óptico (LEICA®) e posteriormente avaliadas em toda a extensão de corte, utilizando-se do programa Image Pro Plus®.

COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA

Para a avaliação de mastócitos, foi realizada a coloração de Azul de Toluidina. Toda a extensão do corte foi avaliada e a quantidade de mastócitos encontrados na lâmina própria do tecido epitelial foi expressa em valores absolutos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa Sigma Stat® versão 2.0. Os casos em que os dados apresentarem as distribuições normais e homocedásticas foram analisados utilizando-se de testes paramétricos como a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey quando necessário. Caso contrário, foram utilizados testes não paramétricos, como o de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de

Dunn quando necessário. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p for menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

O presente estudo avaliou a correlação da presença de fibrose e da quantificação de mastócitos de acordo com a forma e a quantidade de concentração da exposição ao glifosato e conseqüentemente, analisar a possibilidade de ação inflamatória e de possíveis alterações a nível de epiderme. Em relação à fibrose notou-se uma menor presença de fibrose nos grupos com baixa e média concentrações nas duas formas de exposição e em relação aos mastócitos notou-se uma maior quantidade no grupo exposto oralmente a baixa concentração.

A figura 2 ilustra a mediana e o desvio padrão. O resultado do grupo oral obtido a partir dessa análise foi que a fibrose no grupo de média concentração é significativamente menor quando comparado com o grupo controle. Ao comparar o grupo alta concentração com o grupo de média concentração, observa-se que o de alta é expressamente maior

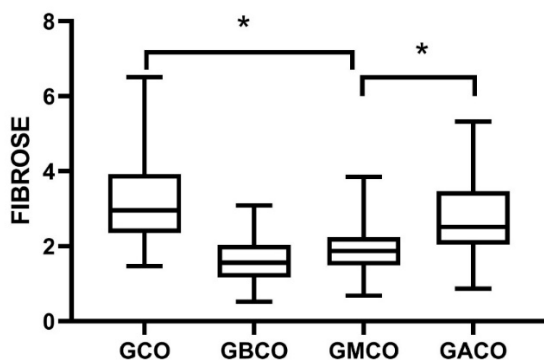


Figura 2. Avaliação de fibrose em ratos expostos via oral ao herbicida glifosato

Na figura 3 em relação à comparação da quantidade de fibrose do grupo oral, notou-se a presença de menor fibrose no grupo de média concentração quando comparado ao grupo controle sendo uma alteração semelhante no grupo exposto via inalatória. Quando o grupo de alta concentração é comparado com o grupo de média concentração, observou-se que o grupo de alta concentração apresenta maior quantidade de fibrose.

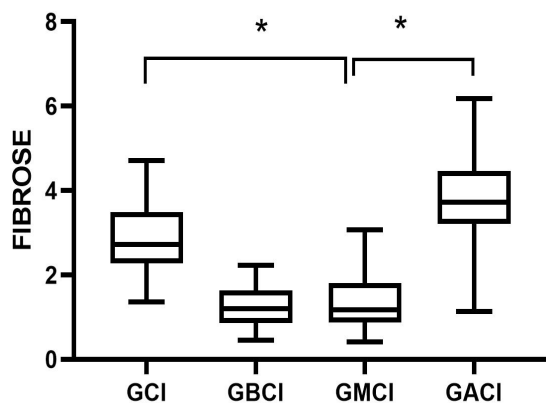


Figura 3. Avaliação de fibrose em ratos expostos via inalatória ao herbicida Glifosato

A figura 4 avalia a presença de mastócitos íntegros e degranulados no grupo com administração do glifosato via oral em comparação ao grupo controle. Na figura 4A ao avaliar a presença de mastócitos íntegros os grupos submetidos a exposição do glifosato independente da sua concentração apresentam quantidade menor de mastócitos em comparação ao grupo controle. Em relação aos mastócitos degranulados na figura 4B há uma maior quantidade de mastócitos presentes nos grupos expostos ao glifosato em comparação ao grupo controle com um leve aumento no grupo com baixa concentração de glifosato contudo não há diferença significativa entre os grupos.

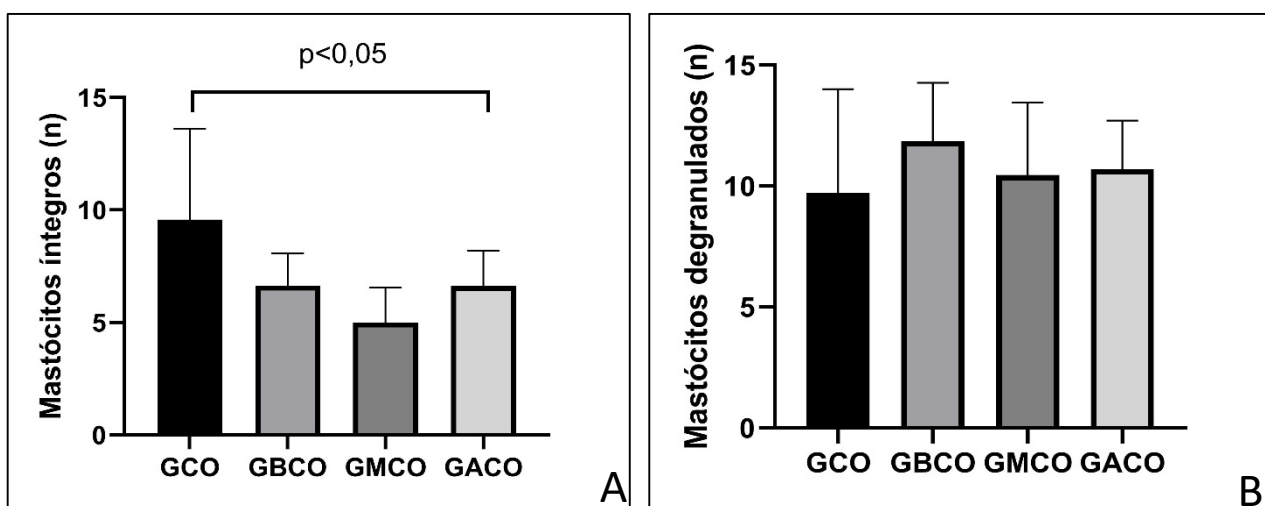


Figura 4. Avaliação dos mastócitos íntegros (A) e dos mastócitos degranulados (B) em ratos com exposição via oral ao herbicida glifosato.

Em relação ao grupo exposto ao glifosato de forma inalatória o resultado da quantidade de mastócitos íntegros na figura 5A demonstra uma maior quantidade de mastócitos presentes no grupo exposto a baixas concentrações de glifosato em comparação tanto com o grupo controle quanto aos grupos expostos a médias e altas concentrações. Ao comparar os grupos com baixa e alta concentração inalatória constata-se uma diferença significativa referente aos mastócitos íntegros e degranulados onde há um maior número no grupo de baixa concentração.

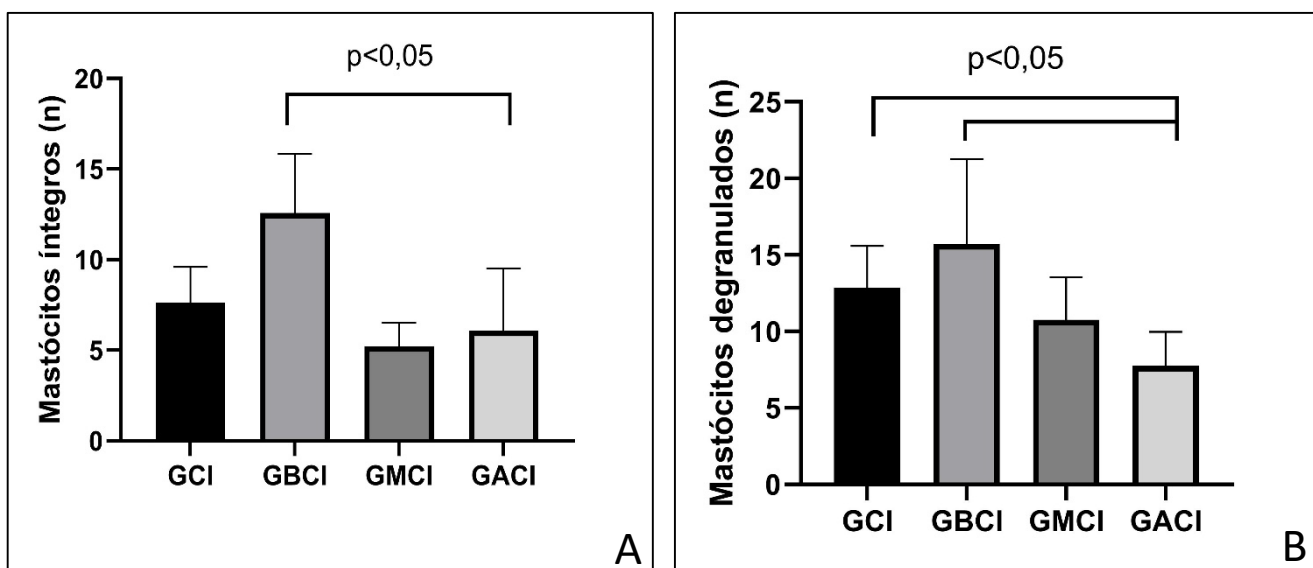


Figura 5. Avaliação dos mastócitos íntegros(A) e dos mastócitos degranulados(B) em ratos com exposição inalatória ao herbicida glifosato

Em relação a comparação dos mastócitos degranulados na figura 5B o resultado mostra maior quantidade de mastócitos no grupo exposto a baixas concentrações de glifosato em comparação ao grupo controle apresentando uma diferença significativa. Quando compara-se os grupos expostos a média e alta concentrações de glifosato com o grupo controle nota-se menores quantidades de mastócitos.

DISCUSSÃO

Segundo Souza et al.⁹, em seres humanos, os órgãos mais acometidos pela toxicidade do herbicida glifosato são os órgãos que compõe o sistema respiratório, os olhos e a pele. O herbicida é considerado um irritante dérmico e ocular, e, quando ingerido em doses elevadas, pode causar danos hepáticos e renais. É excretado pela urina quando absorvido por via oral e dérmica e raramente sofre excreção biliar.

No grupo inalatório, observa-se que os animais além da exposição via inalatória sofreram exposição de forma tópica em seu dorso, através da pulverização no dorso. Devido a essa dupla exposição houve lesões em sua pele, levando o grupo de alta concentração à apresentar mais fibrose corroborando com o as informações da toxicidade na pele e classificado como irritante dérmico.

De acordo com Souza et al.⁹ relata que os efeitos tóxicos do herbicida em mamíferos são baixos sendo sua toxicidade maior via intraperitoneal em comparação as vias oral e dérmica desencadeando alterações metabólicas como acidose e leucocitose acompanhado de alteração de sinais e sintomas como dispneia e alteração do nível de consciência. Contudo apesar da sua baixa toxicidade o seu uso em excesso pode causar danos ao meio ambiente e conseqüentemente a fontes de alimentos.

No grupo oral foi observado que, apesar da fibrose do grupo de alta concentração estar um pouco aumentado em relação ao grupo controle, não obteve uma alteração significativa, não tendo uma ação direta do mesmo no dorso podendo ser um indicativo da baixa toxicidade do herbicida quando é exposto oralmente.

Segundo Woźniak et al.¹⁰, a exposição ao glifosato promove uma diminuição do nível de metilação de DNA celular e na expressão dos genes supressores tumorais *P16* e *P21* e um aumento da expressão do gene de supressão tumoral *TP53* quando avaliou-se as células mononucleares do sangue periférico sendo uma possibilidade de efeito da apoptose celular.

Ao avaliar o padrão da fibrose conforme a concentração do herbicida em ambos tipos de exposição observou-se que houve menor presença de fibrose nas baixas e médias concentrações sendo um ponto a ser avaliado se mesmo em baixas

concentrações já seria possível ter um efeito de apoptose celular podendo explicar os níveis baixos de fibrose quando se compara com o grupo controle.

Em outro estudo Woźniak et al.¹¹ avaliou a influência do Glifosato e do seu principal metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA) na indução de alterações da expressão de genes envolvidos na arquitetura da cromatina celular cujo resultado notou-se um aumento da expressão da DNMT1 interferindo na estrutura da cromatina através da influência na metilação de DNA e modificação da histona.

A análise dos resultados demonstrou que houve influência do herbicida glifosato na parte da ativação da célula do sistema imune, mastócito em específico no qual foi avaliado no trabalho sendo uma célula presente no processo inflamatório evoluindo para uma cascata de ações celulares no tecido exposto no intuito de interromper a agressão por parte de um agente externo. Assim como notou-se a presença de fibrose secundária a exposição ao herbicida principalmente quando exposto via inalatória.

Ao analisar essas duas alterações presentes no trabalho podemos questionar se haveria uma influência do herbicida em relação a uma possível interferência no processo de mitose celular dos queratinócitos. Como os queratinócitos são células com renovação diária, principalmente na primeira camada epitelial, uma sugestão da presença maior ou menor de fibrose no tecido epitelial poderia estar relacionada com interferência do herbicida a nível celular e mitocondrial e consequentemente na renovação celular da epiderme.

De acordo com Winstone et al.¹² notou-se uma relação direta entre a presença de glifosato no tecido neuronal e lesão celular com a presença de níveis séricos e urinários do Fator de Necrose Tumoral (TNF α) que é considerada uma citocina pró-inflamatória. O efeito do glifosato nos neurônios é caracterizado pelo aumento da citotoxicidade, redução da viabilidade celular e disfunção mitocondrial¹²

Segundo Marino et al.¹³ descreve-se os efeitos do glifosato em fígado, rim, pulmão, sistema nervoso central e sistema reprodutor que são caracterizados pelo estresse oxidativo, aumento de citocinas pró-inflamatórias como as Interleucinas e Fator de Necrose Tumoral, morte celular e indução a apoptose. Em relação as células sanguíneas notou-se um aumento de monócitos, células dendríticas e células T relacionando com processo inflamatório.

Ao analisar a presença de mastócitos de acordo com a dose de exposição ao glifosato notou-se uma maior presença de mastócitos íntegros e degranulados no

grupo exposto de forma inalatória a baixas concentrações podendo ser explicado pela a exposição conjunta de forma inalatória e dérmica onde poderia estar havendo um sinergismo de ação inflamatória na epiderme.

Contudo quando submetidos a médias e altas concentrações inalatórias não se observou esse mesmo aumento de mastócitos íntegros e degranulados e a partir disso seria necessário avaliar a presença e atuação de outros fatores pró-inflamatórios como as linfócitos T, Fator de Necrose Tumoral e Interleucinas. E provavelmente não haja uma relação direta entre quanto maior a concentração do herbicida e a presença de inflamação.

A análise da exposição oral ao glifosato mostrou que houve um aumento dos mastócitos degranulados nas três concentrações mas sem alteração significativa entre eles quando se relaciona com alteração na epiderme. A partir disso, sugere-se que a exposição oral não estimule uma reação inflamatória tão significativa quanto a exposição inalatória na epiderme contudo não é possível descartar que a exposição oral tenha um efeito inflamatório em outros órgãos.

Devido a presença de efeitos inflamatório do glifosato em vários órgãos do corpo humano e a relação do mastócito na cadeia de desencadear processo inflamatório o trabalho avaliou se haveria aumento de mastócitos no tecido epitelial. Ao analisar os resultados notou-se que há um processo inflamatório no tecido epitelial devido ao aumento da quantidade de mastócitos degranulados contudo não há uma relação direta de que a inflamação seja maior conforme o aumento da dose do glifosato.

CONCLUSÃO

Através dos resultados é possível concluir que as exposições inalatória e oral promovem alterações dérmicas na pele dos ratos expostos com a presença de processo inflamatório e fibrose além de desencadearem uma resposta imunológica local. Estes resultados corroboram com a necessidade da utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) nos trabalhadores que são expostos aos herbicidas.

Este estudo demonstrou que houve presença de fibrose quando expostos via oral e inalatória a altas concentrações do herbicida enquanto nos grupos expostos a baixas e médias concentrações a presença de fibrose foi menor.

Em relação a presença de mastócitos este trabalho demonstrou que houve um maior número de mastócitos íntegros e degranulados no grupo exposto via inalatória a baixas concentrações do herbicida e um aumento de mastócitos degranulados nos grupos expostos via oral.

Dessa forma, é possível que futuros trabalhos e pesquisas correlacionando o efeito do herbicida e alterações na pele realizem uma avaliação da presença de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral e interleucinas e da presença de outras células do sistema imunológica e as cascatas de reação no processo inflamatório e, posteriormente, é possível realizar uma avaliação dos efeitos do glifosato e de outros herbicidas nos seres humanos.

REFERÊNCIAS

1. Amarante Junior OP, Santos TCR, Brito NM, Ribeiro ML. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quím Nova*. 2002Jul;25(4):589–93. doi:10.1590/S0100-40422002000400014.
2. Araújo GC. Implantação da Vigilância em Saúde de Trabalhadores Expostos a Agrotóxicos nas Equipes Saúde da Família do Município de Chã Grande-PE. [Especialização]. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; 2012.
3. Lara SS, Pignati WA, Pignatti MG, Leão LHC, Machado JMH. A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. *Hygeia* 2019;15(32):1-19. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/46822>
4. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Documento orientador para a implementação da vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
5. Organização Pan-Americana da Saúde. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde; 1997.
6. Pignati W, Oliveira NP, Silva AMC. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. *Ciênc saúde coletiva*. 2014 Dec;19(12):4669–78. doi:10.1590/1413-812320141912.12762014

7. Pignati WA, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciênc saúde coletiva*. 2017 Oct; 22(10):3281–93. doi: 10.1590/1413-812320172210.17742017.
8. Rigotto RM, Vasconcelos DP, Rocha MM. Pesticide use in Brazil and problems for public health. *Cad Saúde Pública*. 2014 Jul; 30(7):1360–2. doi: 10.1590/0102-311XPE020714.
9. Sousa TM, Fernandes BS, Orssatto CS. Toxicidade causada nos humanos expostos ao herbicida glifosato. *Rev Cient Fac Educ e Meio Ambient* 2022; 13:1-5(ed esp naidc). Disponível em: revista.faema.edu.br/index.php/Revista-FAEMA/article/view/1068.
10. Woźniak E, Reszka E, Jabłońska E, Michałowicz J, Huras B, Bukowska B. Glyphosate affects methylation in the promoter regions of selected tumor suppressors as well as expression of major cell cycle and apoptosis drivers in PBMCs (in vitro study). *Toxicology in Vitro* 63. 2020 Mar; 63:104736. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104736.
11. Woźniak E, Reszka E, Jabłońska E, Michałowicz J, Huras B, Bukowska B. Glyphosate and AMPA Induce Alterations in Expression of Genes Involved in Chromatin Architecture in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (In Vitro). *Int J Mol Sci*. 2021 Mar; 22(6):2966. doi: 10.3390/ijms22062966.
12. Winstone JK, Pathak KV, Winslow W, Piras IS, White J, Sharma R, Huentelman MJ, Pirrotte P, Velazquez R. Glyphosate infiltrates the brain and increases pro-inflammatory cytokine TNF α : implications for neurodegenerative disorders. *J Neuroinflammation*. 2022; 19(1):193. doi: 10.1186/s12974-022-02544-5.
13. Marino M, Mele E, Viggiano A, Nori SL, Meccariello R, Santoro A. Pleiotropic Outcomes of Glyphosate Exposure: From Organ Damage to Effects on Inflammation, Cancer, Reproduction and Development. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov; 22(22):12606. doi: 10.3390/ijms222212606.

14. Lopes-Ferreira M, Farinha LRL, Costa YSO, Pinto FJ, Disner GR, Rosa JGDS, Lima C. Pesticide-Induced Inflammation at a Glance. *Toxics*. 2023 Oct 31;11(11):896. doi: 10.3390/toxics11110896.
15. Yalsuyi AM, Vajargah MF, Hajimoradloo A, Galangash MM, Prokić MD, Faggio C. Evaluation of Behavioral Changes and Tissue Damages in Common Carp (*Cyprinus carpio*) after Exposure to the Herbicide Glyphosate. *Vet Sci*. 2021 Oct; 8(10):218. doi: 10.3390/vetsci8100218.
16. Milesi MM, Lorenz V, Durando M, Rossetti MF, Varayoud J. Glyphosate Herbicide: Reproductive Outcomes and Multigenerational Effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jul;12:672532. doi: 10.3389/fendo.2021.672532.
17. Kwiatkowska M, Michałowicz J, Jarosiewicz P, Pingot D, Sicińska P, Huras B, Zakrzewski J, Jarosiewicz M, Bukowska B. Evaluation of apoptotic potential of glyphosate metabolites and impurities in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem Toxicol*. 2020 Jan; 135:110888. doi: 10.1016/j.fct.2019.110888.
18. Strilbyska OM, Tsiumpala SA, Kozachyshyn II, Strutynska T, Burdyliuk N, Lushchak VI, Lushchak O. The effects of low-toxic herbicide Roundup and glyphosate on mitochondria. *EXCLI J*. 2022 Jan; 21:183-196. doi: 10.17179/excli2021-4478.
19. Lopes-Ferreira M, Maleski ALA, Balan-Lima L, Bernardo JTG, Hipolito LM, Seni-Silva AC, Batista-Filho J, Falcao MAP, Lima C. Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Mar; 19(6):3198. doi: 10.3390/ijerph19063198.
20. Rosati L, Chianese T, De Gregorio V, Verderame M, Raggio A, Motta CM, Scudiero R. Glyphosate Interference in Follicular Organization in the Wall Lizard *Podarcis siculus*. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr; 24(8):7363. doi: 10.3390/ijms24087363.