

**Samara Cristina Dossena**  
[samara.c.dossena@hotmail.com](mailto:samara.c.dossena@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Fernando Carlos Sousa**  
[fernandosousa@utfpr.edu.br](mailto:fernandosousa@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Elton Celton de Oliveira**  
[eltonoliveira@utfpr.edu.br](mailto:eltonoliveira@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

**Nédia de Castilhos Ghisi**  
[nediaghisi@utfpr.edu.br](mailto:nediaghisi@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil

## Avaliação dos efeitos do herbicida 2,4-Diclorofenoxiacético sobre o sistema nervoso entérico de *Rhamdia Quelen*

### Evaluation of the effects of the herbicide 2 4-Dichlorophenoxyacetic on the enteric nervous system of *Rhamdia quelen*

#### RESUMO

O Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, promovendo a eliminação de plantas daninhas ou indesejadas. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) este herbicida faz parte da Classe I de toxicidade, sendo considerado extremamente tóxico. Até o presente momento nenhum estudo avaliou os efeitos deste herbicida sobre o sistema nervoso entérico (SNE) de peixes da espécie *Rhamdia quelen* (*R. quelen*). Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda e subcrônica através da via hídrica ao herbicida 2,4-D sobre o SNE da espécie nativa *R. quelen*, por tempos de 24 e 192 horas, nas concentrações de 0 e 60 µg/L, através de análises quantitativas e morfométricas dos neurônios mioentéricos. Foram utilizados 60 animais machos. Em relação à organização morfológica, os neurônios foram encontrados na túnica muscular externa como já observado para outras espécies, com o plexo mioentérico formado por gânglios compostos por poucos neurônios e que também ocorrem muitos neurônios isolados. Através da mensuração foi possível observar que os animais expostos há 192 horas apresentaram maior proporção de neurônios grandes. A análise quantitativa não revelou morte neuronal, mas sugeriu que o 2,4-D pode induzir ao aumento na síntese proteica neuronal. Os resultados sugerem que o 2,4-D afeta o plexo mioentérico levando a alterações manifestadas pela redução na proporção de neurônios pequenos, aumento na proporção de neurônios grandes e aumento na densidade de neurônios mioentéricos em alta atividade de síntese proteica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Neurônios mioentéricos. Toxicidade. Peixes.

#### ABSTRACT

The 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is a herbicide widely used in agriculture, promoting the elimination of unwanted plants or weeds. According to the National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA) this herbicide is part of class I toxicity and is considered extremely toxic. To date no study have evaluated the effects of this herbicide on the enteric nervous system (SNE) of *Rhamdia quelen* (*R. quelen*) fishes. The objective of this work was to evaluate the toxic effects of acute and subchronic exposure to the herbicide 2,4-D through the water pathway on the SNE of *R. quelen* within 24 and 192 hours of exposition at concentrations of 0 and 60 µg/L through quantitative and morphometric analyzes of the myenteric neurons. It was used 60 male fishes. In relation to the morphological organization the neurons were found in the external muscular tunica as already observed for other species, being this plexus formed by ganglions composed by few neurons and that also many isolated neurons occur. Through the measurement it was possible to observe that the animals exposed 192 hours showed an increase in the proportion of large cells. Quantitative analysis did not revealed neuronal death but suggest that 2,4-D may induce the increase in neuronal protein synthesis. The results suggest that 2,4-D affects the myenteric plexus leading to changes manifested by the reduction in the proportion of small neurons, increase in the proportion of large neurons and increase in the density of myenteric neurons in high activity of protein synthesis.

**KEYWORDS:** Myenteric neurons. Toxicity. Fish.

**Recebido:** 31 ago. 2018.

**Aprovado:** 04 out. 2018.

#### Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



## INTRODUÇÃO

Os herbicidas são agrotóxicos utilizados na agricultura e no paisagismo, visto que promovem a eliminação de plantas daninhas ou indesejadas (PEREIRA, 2006). Segundo estatísticas, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e o grupo dos herbicidas é o mais comercializado mundialmente (FROEHNER; NETO; MACHADO, 2012). A este grupo pertence o 2,4-D, o qual segundo a ANVISA (2015) faz parte da Classe I de toxicidade, sendo considerado extremamente tóxico, podendo causar sérios danos à saúde animal e ao ambiente.

As características do 2,4-D permitem que ele possua uma meia-vida na água de cerca de duas a quatro semanas, sendo degradado a 2,4-diclorofenol (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; ISLAM et al., 2018). Porém, antes da sua degradação o 2,4-D pode acabar contaminando o sistema aquático e afetar peixes e conseqüentemente outros animais que se alimentam de peixes, causando assim uma contaminação indireta e comprometendo a qualidade dos produtos derivados dessas culturas.

O mecanismo de ação do 2,4-D sobre o sistema nervoso ainda não foi totalmente compreendido (BONGIOVANNI et al., 2007), porém, o uso extensivo deste herbicida nas últimas décadas tem motivado pesquisas sobre suas propriedades e efeitos sobre os organismos vivos e o meio ambiente (AMARANTE JUNIOR et al. 2002). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição aguda e subcrônica ao 2,4-D através da via hídrica durante 24 e 192 horas nas concentrações de 0 e 60 µg/L de água sobre o sistema nervoso entérico da espécie nativa *R. quelen*.

## MÉTODOS

Foram utilizados 60 exemplares machos de *R. quelen* organizados aleatoriamente em quatro grupos experimentais conforme a Tabela 01. Para a exposição hídrica os peixes foram distribuídos em 12 caixas de polietileno de 50 L cada, com cinco indivíduos por caixa. Posteriormente ocorreu a adição do herbicida 2,4-D (padrão analítico – Sigma Aldrich®), o qual foi diluído diretamente na água do experimento.

Tabela 1 – Dados dos grupos experimentais.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NÚMERO DE ANIMAIS	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (horas)	CONCENTRAÇÃO DE 2,4-D (µg/L)
C24	15	24	00
H24	15	24	60
C192	15	192	00
H192	15	192	60

Fonte: Autoria própria (2018).

Ao final do período experimental os animais foram anestesiados com cloridrato de benzocaína 100 mg/L para em seguida ser realizada a laparotomia e coleta da porção cranial do intestino delgado. As amostras coletadas foram imersas em fixador de Giemsa, permanecendo por 48 horas. Após esse período, com auxílio de um estereomicroscópio e pinças de pontas finas foi realizada a microdissecação. Para a evidenciação neuronal os preparados totais foram corados de acordo com a técnica de Giemsa modificada por Barbosa (1978) e então desidratados, seguindo uma ordem crescente de álcoois, iniciando em 75% até

100%, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética permanente.

Para o estudo morfométrico, as lâminas foram observadas em microscópio de luz acoplado a câmera digital e utilizando-se lente objetiva com aumento de 40x foram capturadas imagens. As imagens foram importadas no software Image J, onde foram mensuradas as áreas do corpo celular de 50 neurônios mioentéricos para cada animal. Para o estudo quantitativo, os neurônios foram contados em 50 campos microscópicos por animal em microscópio de luz com aumento total de 400x.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se uma tendência ao emagrecimento em animais alimentados com 2,4-D. Ao final do período experimental os animais dos grupos C192 e H192 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na quantidade de massa corporal e na relação entre a massa corporal e tamanho corporal. Foi possível observar durante a exposição que os animais do grupo H192 tenderam a não se alimentar de forma satisfatória, o que resultou na diminuição da sua massa corporal quando comparado ao grupo controle exposto ao mesmo tempo (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros corporais dos animais ao final do período experimental. \*=  $p < 0,05$  segundo teste t de Student.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	Massa corporal (g)	Comprimento corporal (cm)	Massa corporal por centímetro corporal (g/cm)
C24	60,38±19,82	18,84±188	3,15±0,72
H24	55,24±12,71	18,50±1,38	2,96±0,46
C192	57,25±9,68*	17,85±1,03	3,19±0,34*
H192	42,00±9,93*	16,26±1,16	2,56±0,41*

Fonte: Autoria própria (2018).

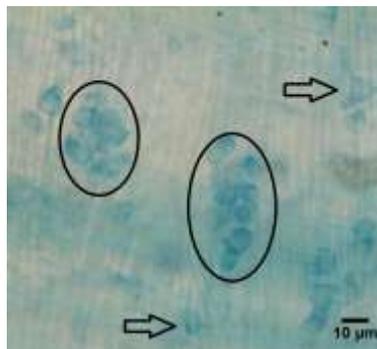
Resultados semelhantes de diminuição da massa corporal foram observados por Fonseca (2007), o qual expôs *R. quelen* a uma formulação comercial de 2,4-D em concentrações de 0,0, 0,5 ou 2,0 mg/L durante 96 horas ou 90 dias, observando redução na média da massa corporal de 37% e 45%, respectivamente, para 0,5 ou 2,0 mg/L.

Os neurônios mioentéricos de *R. quelen* foram encontrados na túnica muscular externa, como já observado para o intestino delgado de animais como: ratos (MIRANDA-NETO et al., 2001; HANSEN, 2006; CORRÊA, 2010; PEREIRA, 2006) e também para outras espécies de peixes como *Cyprinus carpio* (GERMANO et al., 2008) *Piaractus mesopotamicus* (STABILLE et al. 2000).

Foi perceptível que o plexo mioentérico de *R. quelen* é formado por gânglios compostos por poucos neurônios e que ocorrem muitos neurônios isolados, sem uma organização específica (Figura 1). Germano (2008) e Stabille (2002) observam algo parecido em seus trabalhos com as espécies de peixes citadas anteriormente.

Os resultados da mensuração foram distribuídos em frequência de classes, com intervalos arbitrários de 20  $\mu\text{m}^2$  os quais foram representados como histogramas na Figura 2. Desta forma foi possível avaliar as proporções de tamanhos de neurônios em cada categoria, de acordo com os grupos experimentais.

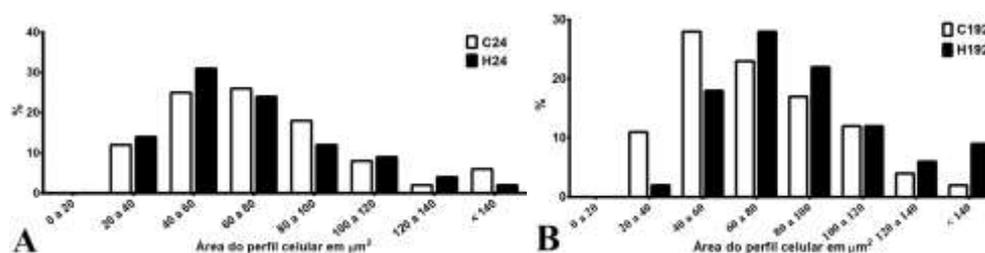
Figura 1 – Organização morfológica do plexo mioentérico de *R. quelen*. Percebe-se a formação de gânglios (circulados) e neurônios isolados (setas).



Fonte: Autoria própria (2018).

Observa-se através da Figura 2-A que os animais expostos há 24 horas ao herbicida não apresentaram diferença significativa na distribuição dos neurônios em relação ao tamanho do perfil do corpo celular quando comparados aos animais controle. Para os animais expostos por 192 horas ocorre deslocamento para direita na distribuição das frequências de neurônios em função do tamanho, indicando maior proporção de neurônios grandes e menor proporção de neurônios pequenos (Figura 02-B). Resultados semelhantes foram observados em trabalhos que avaliaram os efeitos da exposição ao 2,4-D sobre neurônios mioentéricos de ratos (PEREIRA, 2006; NANNI, 2010; CORRÊA, 2010; PEREIRA et al., 2013).

Figura 2 – Histogramas de distribuição frequência em função do tamanho de neurônios mioentéricos do jejuno de *R. quelen* expostos por 24 horas (A) a concentrações de 0 (C24) e 60 μg/L (H24) ou 192 horas (B) a concentrações de 0 (C192) e 60 μg/L (H192) de 2,4-D. Em B  $p < 0,05$  segundo qui quadrado.

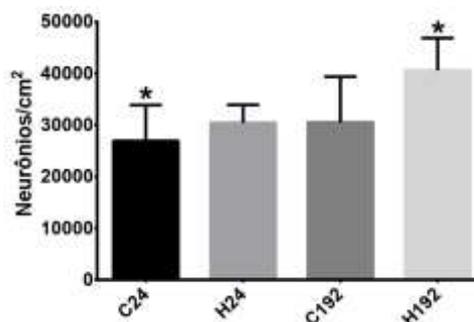


Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados da quantificação neuronal foram extrapolados de forma a representar a densidade neuronal, isto é, o número de neurônios por cm<sup>2</sup> (Figura 3).

Não foram observadas diferenças significativas na área do segmento cranial do intestino delgado, não sendo necessário corrigir os dados de quantificação para alterações na área intestinal. Observou-se que a exposição ao 2,4-D não leva a morte neuronal. Quando analisados pelo teste da ANOVA, estes dados demonstram que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas entre os grupos C24 e H192, ou seja, entre o grupo controle avaliado em 24 horas e o grupo exposto a 60 μg/L em 192 horas. Entre os outros grupos há tendência ao aumento no número de neurônios nos grupos expostos ao herbicida, porém sem alcançar significância estatística. Corrêa (2010) registrou um aumento, apesar de não significativo ( $p > 0,05$ ), na expressão da subpopulação de neurônios reativos para NADPH-diaforase no jejuno de ratos, em experimento conduzido durante 15 dias com 5 mg/kg/dia de 2,4-D.

Figura 3 – Densidade de neurônios mioentéricos do jejuno de *Rhamdia quelen*, expostos a concentrações de 0 e 60 µg/L de 2,4-D por 24 horas nos grupos C24 e H24 respectivamente e 192 horas para os grupos C192 e H192. Sendo n=5 e \* = p<0,05 segundo ANOVA com pós-teste de Tukey.



Fonte: Autoria própria (2018).

Segundo Jessel (1991) uma das formas dos neurônios responderem a agressão exposta é aumentar seus polirribossomos, RNA e a síntese proteica para tentar compensar a lesão inicial, podendo levar o pericárdio a aumentar seu tamanho. Portanto, no caso dos animais que foram expostos ao 2,4-D, os neurônios poderiam inicialmente aumentar de tamanho e, depois evoluir para morte celular como apontado por Jessel (1991) enquanto outros neurônios poderiam diminuir sua área celular caracterizando hipotrofia, que pode também ser esperado como um mecanismo de resposta a situações de agressão celular.

A técnica de coloração de Giemsa evidencia os neurônios através da interação entre o azul de metileno presente no corante com os polirribossomos nos neurônios. Esta técnica evidencia os neurônios de acordo com sua atividade de síntese proteica, sendo que naqueles que estiverem em maior atividade de síntese proteica a coloração será mais intensa, propiciando sua visualização e contagem e naqueles que estiverem em baixa atividade de síntese proteica a coloração será pálida ou não serão corados, não sendo visualizados e contados. Esta característica do método permite fazer uma relação entre a condição experimental testada e seus efeitos sobre a síntese proteica neuronal.

Considerando o que foi dito sobre os prováveis efeitos deste herbicida sobre a síntese proteica é possível afirmar que a exposição ao herbicida tende a promover o aumento na síntese proteica dos neurônios mioentéricos e que esse aumento pode estar ligado a mecanismos endógenos de proteção dos neurônios contra efeitos estressantes da exposição ao herbicida.

Entretanto, os mecanismos de ação do 2,4-D sobre o sistema nervoso ainda não são totalmente compreendidos (BONGIOVANNI et al., 2007). Associado a isso temos o aumento no uso extensivo deste herbicida nas últimas décadas (AMARANTE JUNIOR et al. 2002) e a baixa disponibilidade de informações sobre seus efeitos sobre peixes, em especial sobre espécies nativas do Brasil. Desta forma fica evidente que mais pesquisas são necessárias para melhor compreender os efeitos do 2,4-D sobre peixes.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições em que o experimento foi conduzido pode-se concluir que o 2,4-D quando aplicado por via hídrica na dose de 60 µg/L por um período de 192

horas tem efeitos sobre o plexo mioentérico de *R. quelen*, levando a alterações manifestadas pela redução na proporção de neurônios pequenos, aumento na proporção de neurônios grandes e aumento na densidade de neurônios mioentéricos em alta atividade de síntese proteica.

## REFERÊNCIAS

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Revisão das propriedades, usos e legislação ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 13, n. 1, p. 60–70, jan./jun. 2002.

ANVISA. **Índice monográfico 2,4-d**. 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/D27%2B%2B24-D.pdf/8548d5b3-f306-49df-ac49-4498bc5768d8>> Acesso em: 27 Mar 2018.

BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**. v.11, n. 2, p. 95-97, 1978.

BONGIOVANNI, B. et al. Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. **Neurotoxicology Research**, Little Rock, v. 11, p. 93-99, 2007.

CORRÊA, O. P. **Efeitos da ingestão de ácido 2,4 diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos do jejuno de ratos** – Análises quantitativas e morfométrica. Dissertação mestrado em ciência animal. Universidade paranaense. p. 69, 2010.

FONSECA, M. B. **Crescimento e parâmetros toxicológicos em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos a uma formulação comercial do herbicida 2,4-D**. Dissertação de mestrado na Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

FROEHNER, S., NETO, D. M., MACHADO, K. S. Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p.1809-1813, 2012.

GERMANO, M. R. et al. Análise morfométrica de neurônios mioentéricos NADH-Diaforase positivos do bulbo intestinal de *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) (Osteichthyes, Cyprinidae). **Revista Saúde e Pesquisa**. v. 1, n. 1, p. 07-13, 2008.

HANSEN, M. B. The enteric Nervous System II: Gastrointestinal. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, New York, v. 92, p. 105-113, 2006.

ISLAM, F. et al. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. **Environment International**, v. 111, p. 332–351, fev. 2018.

JESSEL, T. M. **Reactions of neurons to injury**. In: KANDEL, E. R; SCHWARTZ, J. H; JESSELL, T. M. Principles of neural science. Norwalk: Appleton & Langue, 1991.

MIRANDA-NETO, M. H. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 59, n. 1, p. 54-59, 2001.



MOLINARI, S. L. et al. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago do pato (*Anas sp.*) **Unimar**, v. 16, p. 419-426, 1994.

MONTANHA, F. P. et al. Características fisiológicas e reprodutivas do *Rhamdia Quelen*. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 17, p. 8, 2011.

NANNI, W. **Avaliação morfoquantitativa de neurônios mientéricos do cólon proximal de ratos tratados com o herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Paranaense - UNIPAR, Umuarama, 2010.

PAMPLONA, J. H. **Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia quelen*: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PEREIRA, A. P. C. **Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2006.

PEREIRA, J. N. B. et al. Alterations in the duodenum myenteric neurons of Wistar rats after ingesting of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. **Journal of Morphological Science**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 28-32. 2013.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm, Sweden, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.

SOUSA, F. C. **Fumonisin e seus efeitos sobre o sistema nervoso entérico de Ratos wistar**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, 2013.

STABILLE, S. R. et al. Considerações morfológicas e quantitativas sobre os neurônios do plexo mientérico do segmento intestinal médio da carpa *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 4, 2000.

### AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).