Ana Paula Castello Pereira

**Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios
mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Anatomia dos Animais
Domésticos e Silvestres da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1743
FMVZ

Pereira, Ana Paula Castello

Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) / Ana Paula Castello Pereira. – São Paulo: A. P. C. Pereira, 2006.
84 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza.

1. Herbicida. 2. Plexo mioentérico. 3. Sistema nervoso. 4. 2,4-D.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da ingestão de ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre os neurônios entéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) – Análise morfométrica e quantitativa", protocolo nº652/2005, utilizando 26 ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Ingestion effects of herbicid 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on the duodenum enteric neurons of rats (*Rattus norvegicus*) – Morphometric and quantitative analysis", protocol number 652/2005, utilizing 26 rats, under the responsibility of Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza (ICB), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 26 de Abril de 2005

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: PEREIRA, Ana Paula Castello

Título: Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Em especial à minha sobrinha Sofia,
pelos momentos de alegria e amor.
Por todas as conversas que tivemos
até agora e por servir de inspiração
para o meu trabalho.

Ao meu pai Paulo, minha mãe Márlis,
meus irmãos Ivy e Johann e minha
cunhada Andréia, por tudo que têm
feito por mim.

Obrigada

Aos meus amigos ***Fabiana Santos Matsumoto, Renata Gabriel Fontinelle, Claudia Kanashiro, Joel Alves, Fernando Lobo Ladd, Silvio Pires Gomes, Evander Bueno***, e a todos que tornaram possível a minha permanência em São Paulo, pois fizeram-me rir quando queria chorar, apoiaram-me, dedicaram seu tempo precioso em horas de conversa e de estudo.

Em especial ao ***Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Souza***, pela orientação, à ***Profa. Dra. Sandra Regina Stabille***, pelos anos de orientação e paciência, ao ***Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato*** pelo exemplo como docente e à ***Profa. Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni***, por toda ajuda e atenção despendidas a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo** por permitir o desenvolvimento desta pesquisa científica.

À **CAPES** pelo incentivo dado para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Angélica Miglino** pelos ensinamentos e pela atenção despendida, não só a mim, mas a todos os Pós-graduandos.

Aos professores **Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, Paula de Carvalho Pappa, José Roberto Kfoury Junior, Francisco Javier Hernandez Blazquez, Irvênia Luiza de Santis Prada, Ii Sei Watanabe, Alan Peres Ferraz de Melo**, pela paciência, exemplo e ensinamentos transmitidos durante este período.

Ao meu primo, **Filipe Andreas Eidam**, por ter me acolhido em momentos difíceis e tornado possível a continuidade dos meus estudos.

À Amiga **Ana Paula Vidotti**, pelos encontros e desencontros, e por ter me ajudado em momentos preciosos.

Aos amigos **Fernanda Rodrigues Agreste, Rosemary Viola Bosch e Arlei José Birck**, por todo auxílio fornecido para a realização deste trabalho.

Aos amigos **Elizangela dos Anjos Silva, Andrea Bogoslavsky, David Montes Iturrizaga, Emerson Ticona Fioretto, Érika Renata Branco, Fernando Garbelotti, Gabriela Correia de Almeida e Silva, Guilherme Buzon Gregores, Hildebrando Gomes Benedicto, José Eduardo Barbosa Marques Junior, Josy Alvarenga Cal, Ricardo Romão Guerra, Rogério César Parizzi, Thais Fernanda da Silva Machado, Thalita Martins Ferraz, Thiago Pinheiro Arrais Aloia, Victor Hugo Vieira Rodrigues, Vivian Yochiko Samoto** pelo companheirismo e apoio dado durante esses anos.

Às amigas **Carla Viviane de Assis, Fabiana de Souza Gouveia, Grazielle Priscila Bom Amboni, Solana Meneguel Boschillia, Luciana Segura de Andrade, Leila Carolina Lúcio**, por todo carinho, dedicação, companheirismo que proporcionaram e que me deu forças para continuar lutando pelos meus objetivos.

Ao **Alan Cassiano Secorun**, por ser meu porto seguro neste último ano, por me compreender e sempre me incentivar a ser cada vez melhor.

À **Universidade Estadual de Maringá**, que através do **Departamento de Ciências Morfofisiológicas** permitiu a realização de parte deste trabalho.

À **Unidade de Ensino Superior Ingá (UNINGÁ)**, por sempre acreditar no meu trabalho e pelo apoio dado a esta pesquisa.

À **Cláudia Cristina Batista Evangelista**, por ter me ensinado grande parte do que eu precisava para a realização deste projeto.

Aos ***funcionários*** do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, em especial àqueles relacionados à área de concentração da Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, pelo apoio e serviços prestados.

RESUMO

PEREIRA, A. P. C. **Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)**. [Ingestion effects of herbicid 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on myenteric neurons of the duodenum of rats (*Rattus norvegicus*)]. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura sendo moderadamente tóxico para os seres humanos e demais animais. Apresenta neurotoxicidade, mas seu mecanismo de ação no sistema nervoso não está totalmente esclarecido. Há indícios de que este herbicida atue nos neurônios serotoninérgicos e dopaminérgicos de maneira seletiva, mas não há estudos suficientes para afirmarem sua exata ação sobre o sistema nervoso periférico. Entre os efeitos advindos da intoxicação com 2,4-D estão manifestações gastrointestinais. O presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da administração do 2,4-D diluído em água nos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos. Para tanto, 36 ratos (*Rattus norvegicus*) foram separados em três grupos (n = 12): controle (C); tratamento com 2,5 µg/Kg de 2,4-D (B) e tratamento com 5 µg/Kg de 2,4-D (A). Após 15 dias de experimento, os animais foram anestesiados, eutanasiados e seus duodenos foram retirados. Os neurônios mioentéricos foram evidenciados por meio de preparados de membrana corados pelo método de Giemsa e pela técnica de evidenciação neuronal pela ação da NADH-diaforase. Estes preparados de membrana foram analisados ao microscópio de luz para contagem dos neurônios e através de programa computadorizado de análise de imagens foi feita a mensuração do perfil do corpo celular (PCC) desses neurônios. A análise quantitativa demonstrou diminuição no número de neurônios do duodeno nos animais que receberam 2,4-D, em ambas as técnicas (p<0,05). Predominaram nos três grupos de animais

neurônios de tamanho entre 101 e 300 μm^2 . A incidência de neurônios grandes (entre 301 e 600 μm^2) foi significativamente maior ($p<0,05$) nos animais tratados com 2,4-D. Os resultados sugerem que o 2,4-D afeta o plexo mioentérico, sendo sua ação neurotóxica manifestada pela diminuição no número de neurônios e aumento no número de neurônios grandes.

Palavras-Chave: Herbicida. Plexo mioentérico. Sistema nervoso. 2,4-D.

ABSTRACT

PEREIRA, A. P. C. **Ingestion effects of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on myenteric neurons of the duodenum of rats (*Rattus norvegicus*)**. [Efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*)]. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) it is a herbicide thoroughly used in the agriculture and it is poisonous for the human beings and other animals. It presents neurotoxicity but its action mechanism in the nervous system is not totally known. There are evidences that herbicide actuate on selective mode in serotonergic and dopaminergic neurons, but there isn't significant studies to prove its discuss action on the peripheral nervous system. Among the effects succeeding of the intoxication with 2,4-D are gastrointestinal manifestations. The present work had as objective verifies the effects of the administration for 15 days of 5 µg and 2,5 µg/Kg of body weight of 2,4-D diluted in water in the duodenum myenteric neurons of the rats. In order to do so, 15 rats (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups (n = 12): controls (C); treatment with 2,5µg/Kg of 2,4-D (B); and treatment with 5µg/Kg of 2,4-D (A). 15 days later, the animals were anesthetized, killed without pain and your duodenum were removed. The myenteric neurons were stained employing the Giemsa and the NADH-diaforase methods by means of whole mounts preparations. These whole mounts preparations were analyzed in light microscope to count the neurons and through image analysis software to measured the cellular body profile (CBP) of these neurons. The quantitative analysis evidenced reduction in the number of duodenum neurons in animals which received 2,4-D, in both techniques (p<0,05). Predominated in three groups neurons with size between 101 and 300 µm². Incidence of big neurons (between 301 e 600 µm²) was significantly higher (p<0,05)

in the treated with 2,4-D. The results suggest that the 2,4-D affect the myenteric plexus, and its action is expressed by reduction in neurons number and increase in incidence of big neurons.

Key Words: Herbicid. Myenteric plexus. Nervous system. 2,4-D.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem representando o programa Image Pro Plus 4.5.....	40
Figura 2 - Imagem representando a disposição dos preparados de membrana nas lâminas.....	41
Figura 3 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo controle - Giemsa (objetiva de 10X).....	46
Figura 4 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 2,5µg de 2,4-D - Giemsa (objetiva de 10X).....	46
Figura 5 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 5µg de 2,4-D – Giemsa (objetiva de 10X).....	47
Figura 6 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo controle – NADH-diaforase (objetiva de 10X).....	47
Figura 7 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 2,5µg de 2,4-D – NADH-diaforase (objetiva de 10X).....	48
Figura 8 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 5µg de 2,4-D – NADH-diaforase (objetiva de 10X).....	48
Figura 9 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo controle - Giemsa (objetiva de 40X).....	49
Figura 10 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 2,5µg de 2,4-D - Giemsa (objetiva de 40X).....	49
Figura 11 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 5µg de 2,4-D – Giemsa (objetiva de 40X).....	50

Figura 12 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo controle – NADH-diaforase (objetiva de 40X).....	50
Figura 13 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 2,5µg de 2,4-D – NADH-diaforase (objetiva de 40X).....	51
Figura 14 - Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo que recebeu 5µg de 2,4-D – NADH-diaforase (objetiva de 40X).....	51
Figura 15 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa no duodeno.....	58
Figura 16 - Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos no duodeno.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores do peso corporal inicial e final dos ratos.....	44
Tabela 2 -	Valores da circunferência dos duodenos nos diferentes grupos.....	45
Tabela 3 -	Densidade de neurônios mioentéricos, corados pela técnica de Giemsa, em 13,44 mm ² de preparado de membrana.....	52
Tabela 4 -	Densidade de neurônios mioentéricos, evidenciados pela técnica da NADH-diaforase, em 13,44 mm ² de preparado de membrana.....	53
Tabela 5 -	Densidade de neurônios mioentéricos, corados pela técnica de Giemsa, nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica, em 4,48 mm ² de preparado de membrana.....	53
Tabela 6 -	Densidade dos neurônios mioentéricos, evidenciados pela técnica da NADH-diaforase, nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica, em 4,48 mm ² de preparado de membrana.....	54
Tabela 7 -	Média dos perfis (µm ²) do corpo celular (PCC) dos neurônios corados pela técnica de Giemsa.....	55
Tabela 8 -	Média dos perfis (µm ²) do corpo celular (PCC) dos neurônios NADH-diaforase positivos.....	55
Tabela 9 -	Frequência (%) dos neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa.....	57
Tabela 10 -	Frequência (%) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	MORFOFISIOLOGIA DO DUODENO.....	22
2.2	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE).....	22
2.3	AÇÃO NEUROTÓXICA DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D).....	26
3	MATERIAL E MÉTODO.....	34
3.1	OBTENÇÃO DOS SEGMENTOS INTESTINAIS.....	36
3.2	TÉCNICA DE GIEMSA.....	36
3.3	TÉCNICA PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS NADH- DIAFORASE POSITIVOS.....	37
3.4	DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO PERFIL CELULAR DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS.....	39
3.5	QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS.....	41
3.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	52
4.2	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	54
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os pesticidas são largamente utilizados na atualidade. Entre eles, os herbicidas se destacam na agricultura e no paisagismo, por atuarem na eliminação de plantas daninhas ou indesejadas. A este grupo pertencem os clorofenóis, que possuem grande representação, sendo utilizados em pequenas e grandes propriedades.

Entre os clorofenóis, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se destaca pela facilidade de manipulação e aquisição. É tido como de baixa a média toxicidade, sendo necessário o uso de equipamento de segurança para a sua manipulação. Apesar disto, ainda são registrados vários casos de intoxicação pelo uso, manipulação e armazenamento inadequados desses compostos químicos.

Poucas informações são relatadas na literatura a respeito do mecanismo de ação do 2,4-D em animais. Dentre os sintomas descritos pelo envenenamento pelo 2,4-D incluem-se náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia, enfraquecimento muscular, dificuldades respiratórias, bradicardia e suor excessivo, entre outros.

A neurotoxicidade dessa substância tem sido estudada quase que exclusivamente ao nível de Sistema Nervoso Central (SNC), sendo raros os estudos referentes ao Sistema Nervoso Periférico (SNP). Sabe-se que o 2,4-D atua somente em altas doses no SNC, causando alterações nos neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, sugerindo que sua atuação neste sistema seja dependente e seletiva para os neurônios.

O trato gastrointestinal é atingido quando há intoxicação oral. Vômitos, náuseas e diarreia denunciam o efeito desse ácido sobre o órgão controlador da motilidade deste trato, que é o Sistema Nervoso Entérico. Porém, não há dados no meio científico que demonstrem essa informação, nem a gravidade do efeito do 2,4-D sobre este sistema.

Tendo em vista a literatura consultada, observamos uma lacuna nos estudos referentes ao mecanismo de ação do 2,4-D no Sistema Nervoso Autônomo, especialmente no que se refere ao SNE. Já que esta é, provavelmente, uma porção do Sistema Nervoso atingida pela intoxicação oral, o presente trabalho objetivou o estudo quantitativo e morfométrico dos efeitos dessa substância sobre o total de neurônios mioentéricos e NADH-diaforase positivos do duodeno de ratos. Para efeito comparativo, utilizamos duas diferentes técnicas de coloração dos neurônios: Giemsa e NADH-diaforase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo procuramos mostrar a morfofisiologia do duodeno, as características do Sistema Nervoso Entérico, com uma atenção especial ao plexo mioentérico, e caracterizar os efeitos do 2,4-D nas diferentes espécies, principalmente em ratos.

2.1 MORFOFISIOLOGIA DO DUODENO

O Sistema Digestório, formado nos vertebrados superiores, pelo trato digestório (cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, reto e ânus) e glândulas anexas (glândulas salivares, fígado e pâncreas) tem por função retirar dos alimentos ingeridos as moléculas necessárias para o desenvolvimento e manutenção do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Particularmente, o duodeno é histologicamente composto por 4 camadas ou túnicas distintas: a túnica mucosa, a tela submucosa, a túnica muscular e a túnica serosa (GEORGE et al., 1998; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

2.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

O Sistema Nervoso Autônomo (SNA) compõe a parte eferente do Sistema Nervoso Visceral (SNV). Alguns autores, porém, sugerem que o SNA possua também fibras aferentes viscerais (MACHADO, 2004).

O SNE é uma das subdivisões do Sistema Nervoso Autônomo (SNA), juntamente com o Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o Sistema Nervoso Parassimpático (SNPa). É formado, de maneira geral, por dois plexos denominados plexo mioentérico e plexo submucoso. A organização destes plexos é em geral mais complexa que a dos gânglios do SNS e do SNPa e eles ainda possuem muitos neurônios que não se ligam diretamente ao Sistema Nervoso Central (SNC) (MACHADO, 2004). Possui distribuição ampla, sendo observado tanto em invertebrados quanto em vertebrados.

O estudo do desenvolvimento embriológico do Sistema Nervoso Entérico dos vertebrados permitiu estabelecer que os precursores neurais e gliais entéricos são emigrantes da crista neural. Os níveis da crista de onde as células migram para o todo digestório são o vagal (somitos 1 a 7) e o sacral (caudal ao somito 28) (GERSHON et al., 1993).

Os neurônios entéricos, ao assumirem uma organização ganglionar, são revestidos externamente por tecido conjuntivo, o qual separa os gânglios do tecido muscular circundante. A exclusão do tecido conjuntivo dos gânglios, em mamíferos, ocorre durante o desenvolvimento embrionário e se completa após o nascimento (GABELLA, 1982).

Quanto à organização em mamíferos, as formações ganglionares são predominantes, onde o tamanho e a forma das redes de gânglios e fibras variam em um mesmo plexo nas diferentes partes do trato alimentar e nas diferentes espécies.

Neurônios isolados também são observados em roedores, sendo mais comuns no jejuno-íleo do que no duodeno, e em animais mais velhos (GABELLA, 1987).

O plexo mioentérico tem localização intramural, constituindo uma rede com gânglios grandes e pequenos e é contínuo por toda circunferência do trato gastrointestinal. Os gânglios mioentéricos variam em tamanho, forma e orientação de espécie para espécie, e de uma parte do trato gastrointestinal para a outra (FURNESS; COSTA, 1987). Os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos se encontra em gânglios distribuídos entre as camadas musculares circular e longitudinal (FURLAN et al., 1999).

Os gânglios são constituídos por diferentes tipos de neurônios, classificados de acordo com Dogiel. Nesta classificação, os neurônios são agrupados em três tipos: neurônios tipo I, constituídos por corpo celular achatado, com forma estrelada ou angular, células com 4-20 dendritos curtos ou mais e apenas um longo axônio. Pelo tamanho do axônio, que chega até a musculatura, Dogiel concluiu que estes eram neurônios motores; neurônios tipo II, constituídos por corpos celulares lisos e ovais, de forma angular, com 3-10 dendritos e um longo axônio, sendo classificado com neurônio sensitivo; neurônios tipo III, constituídos por corpo celular oval ou retangular, células com 2-10 dendritos muito curtos, com um longo axônio (FURNESS; COSTA, 1987). No trato gastrointestinal de cães, há a descrição de que se encontra apenas neurônios do tipo I no esôfago, porção proximal do estômago e porção terminal do reto; o tipo I predomina na porção distal do estômago, no duodeno e no resto do reto e o tipo II predomina no jejuno e no íleo. No colón e no ceco os tipos I e II são aproximadamente iguais numericamente (GABELLA, 1973).

Os processos envolvidos no mecanismo da digestão em nível de trato gastrointestinal são controlados pelo Sistema Nervoso Entérico e, entre esses, encontra-se a atividade motora controlada pelo plexo mioentérico, (STERNINI, 1988) no qual, além da acetilcolina e noradrenalina, foram identificados neurotransmissores como a serotonina, substância P, VIP, óxido nítrico somatostatina, neuropeptídeo Y entre outros (BELAI et al., 1988).

Inúmeras pesquisas sobre condições de diabetes, envelhecimento, câncer, entre outras, têm comprovado alterações morfológicas e quantitativas nos neurônios mioentéricos responsabilizando-as, em parte, pelas disfunções gastrointestinais presentes (BAKER, 1988; FREGONESI et al., 2001; HERNANDES et al., 2000; MAREGA, 2002; MELLO et al., 1997; ROMANO et al., 1996; SANTER; SOUZA; FURLAN, 1999; ZANONI et al., 1997).

No diabetes, por exemplo, Vinsons et al. (1989) mencionam que a degeneração e perda neuronal está associada ao aumento da produção do sorbitol na via dos poliois e a lesão de nervos periféricos por alteração da microvascularização. Jessell (1991) comenta que uma das maneiras do neurônio reagir à injúria é incrementar os mecanismos de síntese no pericário na tentativa de compensar ou tentar reparar as lesões levando, inicialmente, a uma hipertrofia do corpo celular do neurônio que, dependendo da intensidade e do nível da lesão, evolui para cromatólise e morte celular.

2.3 AÇÃO NEUROTÓXICA DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO (2,4-D)

Nas últimas décadas, os herbicidas apresentaram um rápido crescimento no mercado agrícola dos pesticidas devido à prática de monoculturas nas quais o risco de invasão por ervas daninhas é elevado (MIGUEL et al., 1999).

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida sistêmico, pré e pós-emergente, que controla essencialmente ervas de folha larga anuais e algumas perenes, em culturas de cereais, cana-de-açúcar e pastagens, entre outras. Devido a sua volatilidade, recomenda-se cuidado na aplicação evitando-se períodos de ventos, mesmo fracos, pois a deriva dos vapores pode atingir quilômetros de distância (ALMEIDA; RODRIGUES, 1988).

O 2,4-D é do grupo químico fenoxilacético e existe em formulações contendo sais de amina mais solúveis em água, ou derivados de éster solúveis em solventes orgânicos. Macroscopicamente, caracteriza-se pela apresentação na forma de um pó branco de odor levemente fenólico (SCHVARTSMAN, 1991).

A exposição a este herbicida pode ocorrer de várias maneiras. Em se tratando do ser humano, pode ocorrer durante a manufatura, a formulação, o transporte, a mistura e a aplicação do mesmo, ou ainda, pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Assim, os praguicidas podem atingir o organismo através das vias oral, dérmica, respiratória ou pelas mucosas (ABDOLLAHI, 2004; OLIVEIRA, 1990).

Doses agudas mostram resultados diferentes das crônicas e parece ocorrer uma recuperação ou estabilização do quadro de alterações após passado um certo período da exposição (MATTSSON et al., 1997).

Os sintomas de inalação do 2,4-D no homem incluem sensação de queimação na nasofaringe e peito e tontura (ABDOLLAHI, 2004; BRADBERRY et al., 2000).

Os sintomas pela ingestão deste herbicida pelo homem incluem sensação de queimação na língua, na faringe e no esôfago, vômitos, dor abdominal, dor no peito, gastrite aguda, diarreia e ocasionalmente hemorragia gastrointestinal (BERWICK, 1970; BRADBERRY et al., 2000; ABDOLLAHI, 2004). Em alguns casos há menção de hipotensão com consequência do baixo volume intravascular, também vasodilatação e toxicidade miocárdica direta. Efeitos neurotóxicos incluem coma, hipertonia, hiperreflexia, ataxia, nistagmo, miose, alucinações, convulsões, fasciculação e paralisia. Hipoventilação não ocorre frequentemente, mas está associada à depressão do Sistema Nervoso Central (SNC). Sintomas miopáticos incluem perda dos reflexos tendinosos, miotonia e aumento da atividade da creatina quinase em alguns casos. Outros sintomas clínicos incluem a acidose metabólica, falência renal, aumento de atividade da aminotransferase, pirexia e hiperventilação (BRADBERRY et al., 2000).

Os sintomas e sinais gerais de envenenamento em animais de laboratório variam com as espécies animais, sendo dose e tempo dependentes. Em estudos com ratos da linhagem Wistar, há menção de diminuição na atividade locomotora,

indução de ataxia, sedação, deficiência muscular e dificuldade de respiração (OLIVEIRA; PALERMO-NETO, 1993; PAULINO et al., 1996) e foi observado também o aumento da atividade de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase, lactato desidrogenase (LDH) alkalina fosfatase (AP), amilase, nível de creatina e diminuição das proteínas totais e nível de glicose no sangue, e ainda há o aumento nos valores de hematócritos (PAULINO et al., 1996) em doses que variam de 200 a 600 mg/kg de 2,4-D).

Em estudos subcrônicos realizados em ratos da linhagem Wistar, Charles et al. (1996) mencionam que o 2,4-D a 300 mg/kg/dia pode provocar diminuição do peso corpóreo, dos níveis de T3 e T4, do peso dos ovários e testículos e aumento no peso do fígado e rins, classificando este herbicida como de baixa toxicidade. Já Paulino et al. (1996) não encontram diferenças significativas no peso corpóreo e utilizando uma concentração de 200 ppm por 30 dias, observaram que houve um aumento na atividade da AST, aumento na concentração de albumina e dos valores hematócritos. Charles et al. (1996), estudando os efeitos subcrônicos em cães, por doses de até 7,5 mg/kg/dia, descreveram que o 2,4-D é de baixa toxicidade para aquela espécie.

Os mecanismos propostos de toxicidade mais aceitos (BRADBERRY et al., 2000) são os que dizem respeito aos efeitos associados à membrana plasmática, à interferência nas rotas metabólicas celulares que envolvem a acetil coenzima A (acetil CoA) e ao desacoplamento da fosforilação oxidativa (possivelmente como uma consequência nas rotas metabólicas celulares que envolvem a acetil CoA ou sugerindo o rompimento das membranas intracelulares pelo herbicida).

Os efeitos associados à membrana plasmática são dose dependentes e explicam em parte a toxicidade causada pelo 2,4-D. Apenas baixas quantidades de herbicida são encontradas nos cérebros de animais experimentalmente tratados com 100 mg/kg de herbicida ou menos, indicando que em baixas concentrações possui efeito mínimo nas membranas plasmáticas, sem grande comprometimento da barreira hematoencefálica (ELO; YLITALO, 1977; ELO; YLITALO, 1979). Em exposições a altas doses (250-500 mg/kg) de herbicida, danos seletivos reversíveis ocorrem na barreira hematoencefálica (BHE) de ratos. Isto compromete a BHE e permite um acúmulo de herbicida no SNC (HERVONEN, 1982).

Herbicidas clorofenóis também mostram ruptura nos mecanismos de transporte da membrana celular. Um importante exemplo é o sistema de transporte de ânions orgânicos no plexo coróide que facilita a remoção de ânions potencialmente tóxicos (incluindo metabólitos de neurotransmissores endógenos e ácidos orgânicos exógenos) do cérebro para o sangue. Estudos experimentais demonstraram uma inibição competitiva e saturação desses sistemas pelos herbicidas clorofenóis (KIM; PRITCHARD, 1993; KIM et al., 1987; 1988). Isso resulta na acumulação no cérebro de não somente herbicida, mas também de metabólitos de neurotransmissores endógenos. Como prova deste mecanismo, ácido homovanílico e 5-hidroxi-3-indolacético, metabólitos dos neurotransmissores dopamina e serotonina, se acumulam no SNC de ratos após administração de altas doses de 2,4-D (KIM et al, 1987; ELO; MACDONALD, 1989).

Ácidos clorofenóis possuem estrutura correlacionada com ácidos acéticos e podem formar análogos da acetil CoA *in vitro* (SASTRY et al., 1995). A formação de alguns análogos tem o potencial de comprometer várias vias metabólicas celulares que envolvem a acetil CoA. Por exemplo, análogos podem entrar na via sintética da acetilcolina (ACh) com subsequente formação de ésteres colínicos (2,4-D-ACh) que podem atuar como falsos mensageiros colinérgicos nas sinapses muscarínicas e nicotínicas. Este mecanismo pode causar, em parte, miotonia, uma característica comum da intoxicação de animais de laboratório por este herbicida.

Estudos em animais indicam que estes herbicidas podem causar ruptura da junção neuromuscular. Isto pode ocorrer como uma consequência da interferência na produção de acetilcolina pelos efeitos diretos nas membranas plasmáticas, produzindo canais iônicos pela falta ou pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa, onde o ATP causa distúrbios na regulação muscular de Ca^{2+} .

A neurotoxicidade é o efeito predominante na inalação aguda e na ingestão oral. As pesquisas que verificam a neurotoxicidade do 2,4-D têm sido voltadas para análises do SNC e, principalmente, para os efeitos advindos do comprometimento daquele sistema (EPA, 1987; MATTSSON et al., 1997; SCHVARTSMAN, 1991).

Experiências desenvolvidas em laboratório utilizando diferentes dosagens de 2,4-D administradas por via oral, exposição dérmica e, até mesmo, injeção direta no SNC relatam desde ausência de alterações no tecido nervoso, quando em doses baixas e, em doses mais altas, alterações de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, sugerindo que a toxicidade do 2,4-D é dose dependente e seletiva

para os neurônios (BORTOLOZZI et al., 1998 e 2001; CHARLES et al., 1996; COPE et al., 1970; DUFFARD et al., 1995; ELO; MacDONALD, 1989; GARABRANT; PHILBERT, 2002; MATTSSON et al., 1997; OLIVEIRA; PALERMO-NETO, 1993; SCHVARTSMAN, 1991; STEISS et al., 1987).

Oliveira e Palermo-Neto (1995a), estudando a concentração do 2,4-D no organismo pela cromatografia por gás observaram uma concentração significativa do herbicida nos tecidos cerebrais e no soro, indicando a ação do composto naquele sistema provavelmente pelo déficit de integridade da BHE. Esses mesmo autores em 1989 identificaram que há uma diminuição nos níveis estriatais de serotonina, aumento dos níveis de 5-hidroxiindoleacético e aumento de serotonina no tronco encefálico. Esses resultados mostram que o herbicida produz alterações neuroquímicas centrais que são coerentes com as modificações comportamentais observadas em animais intoxicados pelo 2,4-D. Porém, é possível que os efeitos comportamentais do 2,4-D sejam não por consequência da sua ação no SNC, mas preferivelmente pela ação n SNP (OLIVEIRA; PALERMO-NETO, 1993).

Em relação ao 2,4-D, o mecanismo da neurotoxicidade ainda não está esclarecido (BORTOLOZZI et al., 2001). Entre os mecanismos propostos para a ação do 2,4-D no SNC, Elo e MacDonald (1989) sugerem a inibição do transporte de ácidos orgânicos para fora do cérebro com aumento nos níveis de metabólitos ácidos resultantes da biogênese das aminas. Bradberry et al. (2000) relatam a ocorrência de alterações na membrana celular do neurônio com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Bortolozzi et al. (1998) ressaltam que ocorre aumento nos níveis de serotonina provavelmente

em função do aumento de sua biossíntese, ou por inibição da recaptação desse neurotransmissor ou da enzima monoamina oxidase (MAO). Di Paolo et al. (2001) sugerem que o 2,4-D pode levar a alterações covalentes que afetam a estrutura da proteína e a atividade biológica. Modificações na integridade funcional e estrutural de proteínas nas membranas plasmáticas e das organelas podem disparar alterações no metabolismo energético afetando atividades biológicas celular como a síntese de ATP, sinalização, regulação de reações de biossíntese e catabólica, transportes de metabólitos e de íons (PALMEIRA et al., 1997, BRADBERRY et al., 2000).

Oliveira (1990) cita que os sinais de depressão em animais gravemente intoxicados por 2,4-D estejam relacionados à quebra parcial da barreira hematoencefálica, possivelmente como resultado de danos aos vasos capilares da mesma pela acumulação deste herbicida no encéfalo. O 2,4-D possui uma possível, porém discutida, ação tóxica sobre os nervos periféricos (SCHVARTSMAN, 1991). Há menções na literatura de possíveis neuropatias periféricas com paralisias completas, ou parciais de membros de animais intoxicados com 2,4-D (OLIVEIRA, 1990), mas essas ocorrências são mais atribuídas aos efeitos miotóxicos do herbicida do que às prováveis ações neurotóxicas do mesmo.

Não há relatos na literatura a respeito dos efeitos deste herbicida sobre o Sistema Nervoso Entérico (SNE). Apesar de o trato digestório ser um dos primeiros a serem impactados pela ingestão do herbicida, tendo como consequência sintomas como vômitos, náuseas e diarreia, o sistema controlador desses mecanismos (SNE) não foi explorado até a recente data. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar os

efeitos da ingestão do ácido 2,4-diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) corados através de duas técnicas diferentes: a técnica de Giemsa e a técnica de evidenciação neuronal pelo NADH-diaforase, em análises quantitativas e morfométricas. Aceita-se que a técnica de Giemsa cora todos os neurônios presentes enquanto a do NADH-diaforase cora parte dos neurônios, os que estão mais ativos.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 36 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, oriundos do Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas com, no máximo, 4 indivíduos por gaiola, com ciclo de iluminação artificial controlado para 12h claro/12h escuro, a uma temperatura ambiente controlada de 22°C, por um período de 15 dias.

Os animais foram pesados ao início e ao término do experimento e constituíram três grupos com 12 animais em cada grupo como descrito a seguir:

Grupo A: formado por animais que receberam 5,0 µg/kg de peso corpóreo/dia de 2,4-D (Sigma[®], USA) diluído em 1 ml de água durante 15 dias via gavagem;

Grupo B: formado por animais que receberam 2,5 µg/kg de peso corporal/dia de 2,4-D (Sigma[®], USA) diluído em 1 ml de água durante 15 dias via gavagem;

Grupo C: formado por animais que receberam 1ml de água sem o 2,4-D via gavagem.

Todos os animais receberam ração comercial Nuvital e água *ad libitum*.

3.1 OBTENÇÃO DOS SEGMENTOS INTESTINAIS

Ao final dos 15 dias de experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. Posteriormente, foram anestesiados com injeção intravenosa (veia caudal) de tiopental (40mg/kg de peso corpóreo, Cristália[®], BRA) e submetidos à eutanásia por incisão no diafragma e remoção do coração.

O trato gastrointestinal foi retirado após secção ventral longitudinal de cada animal e o duodeno foi isolado, desde o bulbo duodenal até a flexura duodeno-jejunal.

Os segmentos duodenais tiveram sua circunferência mensurada com régua milimetrada para posterior comparação, sendo estes abertos na borda mesentérica e distendidos para mensuração. Os neurônios foram contados e medidos utilizando duas técnicas diferentes: Giemsa e NADH-diaforase.

3.2 TÉCNICA DE GIEMSA

O duodeno obtido de cada animal foi lavado em solução fisiológica, distendido e fixado em solução de formaldeído (Sinth[®], BRA) em solução a 35% (30ml), 15 mililitros de ácido acético glacial (Sinth[®], BRA) e 9 gramas de cloreto de sódio (Sinth[®], BRA) em 1 litro de água destilada, de acordo com Barbosa (1978).

Após um período de fixação de 24 horas, os segmentos duodenais obtidos foram microdissecados ao microscópio Olympus SZ40 com transiluminação para retirada da túnica mucosa e da tela submucosa, com preservação das túnicas

muscular e serosa. Os preparados de membrana assim obtidos foram corados pelo método de Giemsa (BARBOSA, 1978), como descrito a seguir.

Para a solução corante de pH 6,98, foram utilizado 4 mililitros de solução A (9,078g de Monofostato de ácido de potássio, Sinth[®], BRA em 1 litro de água destilada), 6 mililitros de solução B (9,465g de Fosfato de ácido de sódio, Sinth[®], BRA, em 1 litro de água destilada), 90 mililitros de água destilada e 20 gotas de Solução Estoque de Giemsa (1g de Azur-eosina de metileno seg Giemsa, Sinth[®], BRA, 54ml de Glicerol Sinth[®], BRA e 84ml de Metanol Sinth[®], BRA).

Após 24 a 48 horas, os preparados de membranas foram desidratados em seqüência crescente de álcoois, diafanizados por três imersões consecutivas em xilol (Sinth[®], BRA) e colocados entre lâmina e lamínula com resina Permount (Sinth[®], BRA). Para impedir a formação de bolhas, as lâminas foram mantidas sob peso até a secagem da resina.

3.3 TÉCNICA PARA A EVIDENCIAÇÃO DE NEURÔNIOS NADH-DIAFORASE POSITIVOS

Para evidenciação de neurônios NADH-diaforase positivos foi realizada técnica histoquímica de acordo com Gabella (1969), como descrito a seguir.

A solução de Krebs (ph 7,3) consistiu de 1,3g de NaHCO₃ (Sinth[®], BRA), 0,24g de MgCl₂ . 6H₂O (Sinth[®], BRA), 0,44g de KCl (Sinth[®], BRA), 0,165g de

NaH_2PO_2 (Sinth[®], BRA), 7,05g de NaCl (Sinth[®], BRA) e 0,27g de CaCl_2 (Sinth[®], BRA) em 1 litro de água destilada.

Para meio de incubação (pH 7,3), foram utilizados 25ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque 0,5mg/ml, Sigma[®], USA), 25ml de tampão fosfato de sódio 0,1M(8,17g de NaCl - Sinth[®], BRA; 0,36g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - Sinth[®], BRA e 1,95g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - Sinth[®], BRA em 1 litro de água destilada), 50ml de água destilada e 0,05g de NADH (Sigma[®], USA).

Cada duodeno coletado foi lavado em solução de Krebs e teve uma das extremidades ligada com fio de sutura para que o segmento fosse preenchido com quantidade suficiente de solução de Krebs, a fim de se obter uma leve distensão. Após a ligadura da outra extremidade, os segmentos duodenais foram submetidos à técnica para evidencição neuronal, da seguinte maneira:

- Duas lavagens de 10 minutos cada em solução de Krebs (pH 7,3);
- Permeabilização em Krebs contendo Triton X-100 (Sinth[®], BRA) a 0,3% por 5 minutos;
- Duas lavagens de 10 minutos em solução de Krebs (pH 7,3);
- Imersão em meio de incubação por cerca de 45 minutos;
- Fixação em solução de formol a 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3.

Após 24 a 48 horas, os preparados de membranas foram desidratados em seqüência crescente de álcoois, diafanizados por três imersões consecutivas em xilol (Sinth[®], BRA) e colocados entre lâmina e lamínula com resina Permount (Sinth[®],

BRA). Para impedir a formação de bolhas, as lâminas foram mantidas sob peso até a secagem da resina.

3.4 DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO PERFIL CELULAR DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

As imagens dos neurônios mioentéricos foram capturadas por câmara de alta resolução, transmitidas para microcomputador, e gravadas em *compact disc* (CD), a partir das lâminas coradas pelas duas técnicas.

Através do programa de análise de imagens Image-Pro-Plus 4.5, foi mensurada a área (μm^2) de 600 corpos celulares em cada grupo estudado para cada técnica de evidenciação neuronal (Figura 1).

Figura 1 – Imagem representando o programa Image-Pro-Plus 4.5, onde se encontram delimitados neurônios corados pela técnica de Giemsa

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NEURÔNIOS MIOENTÉRICOS

Os corpos celulares dos neurônios mioentéricos, localizados entre as camadas de músculo liso: circular interna e longitudinal externa; foram contados em microscópio de luz Olympus BX40, com objetiva de 40x.

A contagem foi feita por amostragem na região mesentérica, intermediária e antimesentérica, e todos os neurônios de cada campo foram contados, considerando-se os meios neurônios de um campo e desprezando-se os de outro.

Em cada segmento de cada animal foram contados vinte campos por região, perfazendo um total de 60 campos.

As regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica foram determinadas de acordo com Zaroni et al. (2005), onde o preparado de membrana, já montado entre lâmina e lamínula com resina Permount, é dividido em 6 partes iguais, sendo as regiões mais laterais (aquelas relacionadas à borda mesentérica) as mesentéricas; as centrais são correspondentes à região antimesentérica e as interpostas entre estas duas correspondem à região intermediária (Figura 2). Esta técnica foi utilizada para padronização da contagem, onde se obtém uma distribuição mais uniforme da área de coleta de dados, do que naquelas técnicas onde o preparado de membrana é separado por quadrantes (SOUZA; FURLAN, 2001).

Figura 2 – Imagem representando uma lâmina (parte branca) com o preparado de membrana do duodeno (parte colorida), onde o vermelho representa a região mesentérica, o azul representa a região intermediária e o amarelo representa a região antimesentérica

A área do campo do microscópio foi mensurada com uma régua micrometrada Zeiss, obtendo-se uma área de 13,44 mm² para o total de 60 campos. Os resultados foram expressos como neurônios presentes em 13,44mm² de duodeno analisado. Foram também estabelecidos os neurônios presentes em cada uma das três regiões, em uma área total de 4,48 mm² (20 campos).

3.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os dados coletados foram submetidos aos testes estatísticos. Foi aplicada Análise de Variância e teste de Tukey para dados morfométricos, e teste de Kruskal-Whalis para os dados quantitativos. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os dados referentes ao peso dos animais, apresentados na tabela 1 demonstram que não houve alteração no peso corpóreo após o tratamento com o 2,4-D.

Tabela 1 – Média do peso corporal inicial e final (g) dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C).

Parâmetros	Grupos		
	A	B	C
Peso inicial	260,67±18,37 ^a	266,67±19,86 ^a	262,34±17,6 ^a
Peso final	287,25±13,97 ^a	290,43±13,54 ^a	290,5±14,24 ^a

Com relação à circunferência do duodeno, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos estudados (Tabela 2). Este dado indica uma semelhança entre os segmentos obtidos, facilitando a comparação entre os resultados de cada grupo.

Tabela 2 – Média da circunferência (mm) do duodeno obtida dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Grupos	Circunferência (mm)
A	15,17 ^a ±1,6
B	16,34 ^a ±1,5
C	15,84 ^a ±1,3

Em todos os grupos, quando analisados ao microscópio de luz, os neurônios mioentéricos, tanto os obtidos pela técnica de Giemsa, quanto os NADH-diaforase positivos foram evidenciados com seu aspecto típico em gânglios interligados em arranjo semelhante à uma rede (Figuras 3 a 8).

Observados com maior aumento, os corpos celulares dos neurônios contidos nesses gânglios apresentaram tamanhos variados, não demonstrando sinais de lesão (Figuras 9 a 14).

Figura 3 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo C evidenciando gânglios com neurônios em seu aspecto típico. Giemsa. (objetiva de 10x, barra = 100 µm)

Figura 4 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo B evidenciando gânglios com neurônios em seu aspecto típico, sem alterações. Giemsa. (objetiva de 10x, barra = 100 µm)

Figura 5 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo A evidenciando gânglios com neurônios em seu aspecto típico, sem lesões. Giemsa.(objetiva de 10x, barra = 100 μ m)

Figura 6 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo C evidenciando gânglios com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos com seu aspecto típico (objetiva de 10x, barra = 100 μ m)

Figura 7 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo A evidenciando gânglios com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos semelhantes ao do grupo C, sem lesões (figura 6) (objetiva de 10x, barra = 100 µm)

Figura 8 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo B evidenciando gânglios com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos semelhantes ao do grupo C, ou seja, sem lesões (figura 6) (objetiva de 10x, barra = 100 µm)

Figura 9 - Fotomicrografia de preparado de membrana de duodeno de rato controle, com maior aumento, evidenciando neurônios mioentéricos de tamanhos variados. Giemsa, (Barra = 10 μm).

Figura 10 - Fotomicrografia de preparado de membrana de duodeno de rato tratado por 15 dias com 2,5 μg/Kg de peso de 2,4-D diluído em água, com maior aumento, evidenciando neurônios mioentéricos de tamanhos variados. Giemsa, (Barra = 10 μm).

Figura 11 - Fotomicrografia de preparado de membrana de duodeno de rato tratado por 15 dias com 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso de 2,4-D diluído em água, com maior aumento, evidenciando neurônios mioentéricos de tamanhos variados. Giemsa, (Barra = 10 μm).

Figura 12 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo C, com maior aumento, evidenciando dois gânglios com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos com perfis de corpo celular variados e aspecto típico (objetiva de 40x, barra = 20 μm)

Figura 13 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo B, com maior aumento, evidenciando dois gânglios com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos com perfis de corpo celular variados. (objetiva de 40x, barra = 20 μ m)

Figura 14 – Fotomicrografia de preparado de membrana do duodeno de rato do grupo A, com maior aumento, evidenciando um gânglio com neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos com perfis de corpo celular variados (objetiva de 40x, barra = 20 μ m)

4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados da quantificação dos corpos celulares dos neurônios corados pela técnica de Giemsa e pela técnica de evidenciação pela NADH-diaforase presentes em 13,44 mm² (60 campos) encontram-se na tabela 3 e 4 respectivamente. Os dados obtidos nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica, os dados referentes à quantificação dos corpos celulares presentes em 4,48 mm² (20 campos) encontram-se na tabela 5 e 6. Estes dados demonstram uma diminuição significativa desses neurônios nos grupos tratados com o 2,4-D em ambas as técnicas. Pela técnica de Giemsa observamos uma redução de 18,58% e 13,22% nos grupos tratados com 5,0 e 2,5 µg/Kg de 2,4-D, respectivamente, e pela técnica da NADH-diaforase essa redução de 21,98% e 10,47% nos grupos tratados com 5,0 e 2,5 µg/Kg de 2,4-D.

Tabela 3 – Densidade de neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa (média $\pm$ desvio padrão), presentes em 13,44mm² de preparado de membrana dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Grupo	Média¹ de neurônios/Grupo (n = 6)	Porcentagem com relação ao grupo controle
A	1989 $\pm$ 156,3 ^a	82,42
B	2094,3 $\pm$ 162,9 ^a	86,78
C	2413,2 $\pm$ 206,6 ^b	

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 4 – Densidade de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos (média $\pm$ desvio padrão) presentes em 13,44mm² de preparado de membrana dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Grupo	Média¹ de neurônios/Grupo (n = 6)	Porcentagem com relação ao grupo controle
A	1046 $\pm$ 105,25 ^a	78,02
B	1196,67 $\pm$ 160,1 ^a	89,25
C	1340,67 $\pm$ 170,12 ^b	

1 Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5 – Densidade de neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa, nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica (média $\pm$ desvio padrão) presentes em 4,48 mm² de preparado de membrana dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Regiões	Média¹ de neurônios/Grupo (n = 6)		
	A	B	C
Mesentérica	644,3 $\pm$ 92,41 ^a	675,6 $\pm$ 55,5 ^a	794 $\pm$ 75,21 ^b
Intermediária	632,9 $\pm$ 87,39 ^a	702,5 $\pm$ 72,7 ^a	818,1 $\pm$ 82,32 ^b
Antimesentérica	711,8 $\pm$ 72,1 ^a	716,2 $\pm$ 64,15 ^{ab}	801,1 $\pm$ 79,87 ^b

1 Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 6 – Densidade de neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos nas regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica (média $\pm$ desvio padrão) presentes em 4,48 mm² de preparado de membrana dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Regiões	Média ¹ de neurônios/Grupo (n = 6)		
	A	B	C
Mesentérica	375,5 $\pm$ 48,14 ^a	388 $\pm$ 27,4 ^a	460 $\pm$ 45,86 ^b
Intermediária	377,34 $\pm$ 45,19 ^a	389 $\pm$ 55,13 ^a	459 $\pm$ 63,64 ^b
Antimesentérica	393,17 $\pm$ 21,12 ^a	419,67 $\pm$ 46,12 ^{ab}	421,67 $\pm$ 32,59 ^b

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

4.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O PPC dos neurônios corados pela técnica de Giemsa variou entre 77,1 e 524,61 µm² no grupo A, entre 72,3 e 517,26 µm² no grupo B e entre 68 e 521 µm² no grupo C e o PPC dos neurônios NADH-diaforase positivos variou entre 72,46 e 630,56 µm² no grupo A, entre 83,69 e 579,20 µm² no grupo B e entre 37,36 e 502,85 µm² no grupo C (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 – Média dos perfis (μm^2) do corpo celular (PCC) dos neurônios corados pela técnica de Giemsa no duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Grupo	Média ¹ do PCC/Grupo
A	251,92 $\pm$ 78,17 ^a
B	243,39 $\pm$ 66,17 ^a
C	207,14 $\pm$ 70,15 ^b

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 8 – Média dos perfis (μm^2) do corpo celular (PCC) dos neurônios NADH-diaforase positivos do duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C)

Grupo	Média ¹ do PCC/Grupo
A	241,04 $\pm$ 96,39 ^a
B	245,21 $\pm$ 99,63 ^a
C	198,90 $\pm$ 83,61 ^b

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para os grupos A, B e C, as distribuições de freqüências de neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa e dos neurônios NADH-diaforase positivos presentes no duodeno, segundo os valores do PPC em intervalos de 100 μm^2 , estão apresentadas nas tabelas 9 e 10 e nas figuras 15 e 16.

No grupo C predominaram neurônios com valores de PPC entre 101 e 300 μm^2 para a técnica de Giemsa, representando 81,9% da frequência e valores de PPC entre 101 a 300 μm^2 para a técnica de evidenciação pela ação da NADH-diaforase, representando 81,33% da frequência.

No grupo B, houve um predomínio de neurônios com valores de PCC entre 101 e 400 μm^2 para aqueles corados pela técnica de Giemsa, representando 91,6% da frequência e com valores de PCC entre 101 e 400 μm^2 para aqueles evidenciados pela NADH-diaforase, representando 89,33% da frequência encontrada para aquele grupo.

No grupo A, houve também um predomínio de neurônios com valores de PCC entre 101 e 400 μm^2 , em ambas as técnicas, representando 89,4% da frequência dos neurônios corados pela técnica de Giemsa e 92 % da frequência encontrada para este grupo pela técnica de evidenciação pela NADH-diaforase.

Tabela 9 – Frequência (%) dos neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa no duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C), segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de 100 µm²

PCC (µm ²)	Frequência (%) dos neurônios/grupo		
	A	B	C
0 a 100	5,1	3,7	6,2
101 a 200	40,1	43	50,6
201 a 300	31,4	30,2	31,3
301 a 400	17,9	18,4	10,1
401 a 500	3,7	3,2	1,46
> 501	1,8	1,5	0,34
TOTAL	100	100	100

Figura 15 – Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos corados pela técnica de Giemsa no duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C), segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de 100 μm^2 .

Tabela 10 – Frequência (%) dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos do duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C), segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de 100 µm²

PCC (µm ²)	Frequência (%) dos neurônios/grupo		
	A	B	C
0 a 100	2	0,84	4,83
101 a 200	39	42	55,83
201 a 300	33,83	29,83	25,5
301 a 400	19,17	17,5	11,67
401 a 500	4,17	8,33	1,83
501 a 600	1,5	1,5	0,34
> 601	0,33	0	0
TOTAL	100	100	100

Figura 16 – Gráfico demonstrando a frequência dos neurônios mioentéricos NADH-diaforase positivos no duodeno dos grupos de animais intoxicados com 5,0µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (A), animais intoxicados com 2,5µg/Kg de peso corpóreo de 2,4-D (B) e animais do grupo controle (C), segundo o perfil do corpo celular, em intervalos de 100 µm².

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Em relação ao peso dos animais, não foi registrada diferença significativa ($P>0,05$) no peso corpóreo dos animais no início e término do experimento entre os grupos A, B e C. Os resultados obtidos em nosso estudo permitiram afirmar que o 2,4-D, nas proporções utilizadas, não alterou o peso corpóreo de ratos Wistar machos.

Dados diferentes, para diferentes concentrações foram obtidos por outros autores. Em estudos subcrônicos realizados em ratos da linhagem Wistar, Charles et al. (1996) mencionam que o 2,4-D a 300 mg/kg/dia pode provocar diminuição do peso corpóreo. Em estudos crônicos se tem uma baixa toxicidade do 2,4-D em cães (CHARLES et al., 1996; HANSEN et al., 1970), relatos de baixa toxicidade para ratos sem efeitos deletérios para doses de até 1250 ppm (HANSEN et al., 1970), e há relatos que acusam uma diminuição do peso corpóreo a uma dose de 150 mg/kg/dia em roedores (CHARLES et al., 1996).

As manifestações motoras e comportamentais (BRADBERRY et al., 2000; STEISS et al., 1987) e relatos de neuropatias periféricas após exposição ao 2,4-D (BERWICK, 1970; BORTOLOZZI et al., 1999), têm sido descritas. Contudo, embora a ação do 2,4-D seja muito estudada em nível de musculatura esquelética, há algumas evidências de sua atuação no SNC e raras menções à sua atuação no SNP.

A análise dos preparados de membrana do duodeno, de ambas as técnicas, ao microscópio de luz evidenciou o plexo mioentérico com a constituição ganglionar característica já descrita em outros animais, inclusive em ratos da linhagem Wistar (ALI; McLELLAND, 1979; GABELLA, 1979; LEAMING; CAUNA, 1961; MOLINARI et al., 1994; SOUZA; FURLAN, 1999; ZANIN et al., 2001; ZANONI et al., 2005). O plexo mioentérico teve localização intramural, constituindo uma rede com gânglios grandes e pequenos e contínua por toda circunferência do duodeno. Os gânglios mioentéricos variaram em tamanho, forma e orientação, de acordo com a literatura verificada (FURNESS; COSTA, 1987).

A quantidade de neurônios mioentéricos variou entre os animais que receberam ou não 2,4-D diluído em água via gavagem. A densidade de neurônios presentes em 13,44 mm² de duodeno dos ratos do grupo C pela técnica de Giemsa foi 2413,2 e pela NADH-diaforase foi 1340,67. Nos ratos que receberam 2,5 µg e 5 µg de 2,4-D, encontramos 1196,67 e 1046 neurônios/13,44 mm² de duodeno para a técnica de Giemsa e 2094,3 e 1989 neurônios/13,44 mm², respectivamente. Nossos resultados comprovam que ocorreu uma diminuição significativa ($P < 0,05$) no número de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos tratados com 2,5 e 5 µg 2,4-D quando comparado com os animais do grupo controle, por ambas as técnicas. Pela técnica de Giemsa observamos uma redução de 18,58% e 13,22% nos grupos tratados com 5,0 e 2,5 µg/Kg de 2,4-D, respectivamente, e pela técnica da NADH-diaforase essa redução de 21,98% e 10,47% nos grupos tratados com 5,0 e 2,5 µg/Kg de 2,4-D. Esses resultados sugerem um efeito neurotóxico do 2,4-D sobre os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos quando administrado via oral em doses de 2,5 e 5 µg/Kg de peso corporal por um período de 15 dias. Outro fator

importante a ser citado é que a técnica de evidenciação neuronal pela NADH-diaforase cora apenas uma subpopulação de neurônios, ao contrário da técnica de Giemsa, que permite corar a maior parte (senão o total) da população neuronal. A esse fato se deve a diferença entre a densidade neuronal encontrada nas duas técnicas.

A diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico é descrita para outras condições experimentais tais como diabetes, envelhecimento, desnutrição e câncer (FREGONESI et al., 2001; HERNANDES et al., 2000; MAREGA, 2002; MELLO et al., 1997; ROMANO et al., 1996; SANTER; BAKER, 1988; SOUZA; FURLAN, 1999; ZANONI et al., 1997), sugerindo que esses neurônios também são suscetíveis a alterações quando submetidos a condições adversas a saúde.

O mecanismo envolvido no comprometimento do plexo mioentérico nas referidas condições, apesar de não estar totalmente desvendado, tem sido atribuído ao estresse oxidativo (KYVENHOVEN; MEINDER, 1999) e a redução da eficiência dos sistemas antioxidantes (BAYNES, 1991). O estresse pode ser amplificado e propagado por um ciclo auto-catalítico de estresse metabólico levando a morte celular com aumento de espécies reativas ao oxigênio e diminuição dos mecanismos antioxidantes (BAYNES, 1991).

O PPC dos neurônios corados pela técnica de Giemsa variou entre 77,1 e 524,61 μm^2 no grupo A, entre 72,3 e 517,26 μm^2 no grupo B e entre 68 e 521 μm^2 no grupo C e o PPC dos neurônios NADH-diaforase positivos variou entre 72,46 e 630,56 μm^2 no grupo A, entre 83,69 e 579,20 μm^2 no grupo B e entre 37,36 e 502,85

μm^2 no grupo C. A média da área do PCC dos neurônios mioentéricos foi diferente para os grupos que receberam ou não o 2,4-D ($P < 0,05$). Os animais do grupo controle apresentaram neurônios mioentéricos com área média do PCC igual a $207,14 \text{ m}^2$ para a técnica de Giemsa e igual a $198,90 \text{ m}^2$ na técnica de evidenciação através da NADH-diaforase. As médias da área do PP dos neurônios mioentéricos de ratos que receberam $2,5 \mu\text{g}$ e $5 \mu\text{g}$ de 2,4-D nas técnicas de Giemsa e da NADH-diaforase foram $243,39 \text{ m}^2$ e $251,92 \text{ m}^2$; $245,21 \text{ m}^2$ e $241,04 \text{ m}^2$, respectivamente.

Esses resultados sugerem que, embora por mecanismos ainda desconhecidos, o 2,4-D interfere no plexo mioentérico alterando não apenas o número de neurônios, mas também propiciando o aumento na incidência de neurônios com área de PPC maior.

Aumento no tamanho dos neurônios também foi detectado por Souza e Furlan (2001) no duodeno e por Zanoni et al. (2003) no íleo de ratos diabéticos. O fato das alterações morfológicas e quantitativas nos neurônios mioentéricos de ratos diabéticos estarem relacionadas, em parte, ao estresse oxidativo nos sugere que essas modificações são uma forma de resposta do plexo mioentérico a injúrias decorrentes do quadro de diabetes. Sendo assim, poderíamos estar inferindo que o aumento do tamanho dos neurônios quando comparado à incidência nos ratos controle, seria também uma resposta do plexo mioentérico ao 2,4-D.

Jessell (1991) comenta que uma das formas dos neurônios responderem à injúria é aumentar seus polissomas, RNA e a síntese protéica para tentar compensar

a lesão inicial, condição esta que pode levar o pericário a duplicar seu tamanho. Portanto, no caso do duodeno dos ratos que receberam 2,4-D, os neurônios poderiam, inicialmente, aumentar de tamanho e, depois, evoluir para cromatólise e degeneração como assinalado por Jessell (1991) enquanto outros poderiam ainda diminuir de tamanho caracterizando hipotrofia celular que, segundo Bogliolo (1981), pode também ser esperada como mecanismo básico de resposta a situações de agressão celular, como por exemplo, na redução de nutrientes ou de estímulos necessários ao funcionamento dos neurônios, ou seja, os neurônios responderiam diminuindo o metabolismo como uma forma de adaptação e proteção contra situações adversas.

Schvartsman (1991) ressalta que o 2,4-D é um inibidor, embora moderado, da fosforilação oxidativa. Contudo, inúmeras outras ações têm sido propostas para justificar a neurotoxicidade, pelo menos em altas doses, do 2,4-D.

Modificações na membrana plasmática e de organelas interferindo no metabolismo energético do neurônio como a síntese de ATP, regulação das reações de biossíntese e catabólicas, transporte de metabólitos e íons levando, inicialmente a um aumento do volume do pericário são relatadas por Palmeira et al. (1997) como responsáveis pelos efeitos tóxicos do 2,4-D. Elo e MacDonald (1989) sugerem que a neurotoxicidade é devida a inibição do transporte de ácidos orgânicos para fora do cérebro com aumento nos níveis de metabólitos ácidos resultantes da biogênese das aminas. Bradberry et al. (2000) relatam a ocorrência de alterações na membrana celular do neurônio com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Aumento nos níveis de serotonina,

provavelmente em função do aumento da biossíntese, ou por inibição da recaptação desse neurotransmissor ou, ainda, inibição da enzima mono amina oxidase (MAO) foi descrito por Bortolozzi et al. (1998) sendo que Fuller (1992) acrescenta que, ao inibir a MAO, ocorre acúmulo das aminas livres no citoplasma do neurônio facilitando a autooxidação.

Di Paolo (2001) sugere que o 2,4-D pode levar a alterações covalentes que afetam a estrutura de proteínas e a atividade biológica. Contudo, apesar das inúmeras pesquisas já realizadas sobre os efeitos do 2,4-D, principalmente em nível do SNC, o mecanismo da neurotoxicidade ainda não está esclarecido (BORTOLOZZI et al., 2001) sendo que uma possível ação tóxica sobre os nervos periféricos ainda é muito discutida (SCHVARTSMAN, 1991).

Por outro lado, deve-se ressaltar que os efeitos tóxicos do 2,4-D descritos para o SNC foram observados quando altas doses são administradas via oral ou endovenosamente ou quando pequenas doses são injetadas diretamente no SNC (BORTOLOZZI et al., 2001 e 2002; DUFFARD et al., 1995; OLIVEIRA; PALERMO-NETO, 1993; STEISS et al., 1987;). Os autores comentam que o 2,4-D é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (TYYNELA, 1990), fato este que, sob nosso ponto de vista, poderia justificar a ausência de lesões no tecido nervoso do SNC por pequenas quantidades de 2,4-D, embora barrado pela BHE, em altas concentrações efeitos deléteiros são descritos quando, então, é sugerida ruptura e danos da BHE (OLIVEIRA; PALERMO-NETO, 1993).

Os sintomas pela ingestão deste herbicida pelo homem incluem sensação de queimação na língua, na faringe e no esôfago, vômitos, dor abdominal, dor no peito, gastrite aguda, diarreia e ocasionalmente hemorragia gastrointestinal (ABDOLLAHI, 2004; BERWICK, 1970; BRADBERRY et al., 2000). Esses fatos nos levam a acreditar que a primeira porção do Sistema Nervoso a ser atingida pelo 2,4-D seja o Sistema Nervoso Entérico, já que os processos envolvidos no trato gastrointestinal são controlados por ele (STERNINI, 1988).

Neste sentido, acreditamos que o plexo mioentérico possa ser uma alternativa para pesquisas sobre os mecanismos da neurotoxicidade do 2,4-D. Embora o plexo mioentérico possua gânglios envoltos por tecido conjuntivo o qual poderia atuar de forma similar a BHE impedindo que o 2,4-D afetasse neurônios do plexo mioentérico, Sternini (1988) comenta que este envoltório exerce mais uma função protetora contra alterações mecânicas decorrentes da contração da musculatura lisa gastrointestinal que poderiam traumatizar o plexo mioentérico.

De fato, pelos nossos resultados, o envoltório conjuntivo dos gânglios no plexo mioentérico parece não atuar impedindo a interação do 2,4-D com seus neurônios ou, se impede a ação, essa função estaria também comprometida, haja vista a degeneração neuronal observada em nosso experimento com a administração de baixas doses de 2,4-D.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES:

Nas condições em que nosso experimento foi conduzido podemos concluir que o 2,4-D quando administrado por via oral diluído em água via gavagem nas doses de 5 µg e 2,5 µg/Kg de peso corpóreo por um período de 15 dias influencia os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos levando a uma alteração dos neuronal manifestada pelo aumento do perfil do corpo celular e pela diminuição na densidade dos neurônios mioentéricos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAIE, A. Pesticides and oxidative: a review. **Med Sci Monit.**, v. 10, n. 6, p 141-147, 2004.

ALI, H. A.; MCLELLAND, J. Neuron number in the intestinal myenteric plexus of the domestic fowl (*Gallus gallus*). **Zbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol.**, v. 8, p. 277-283, 1979.

ALMEIDA, F. S.; RODRIGUES, B. N. **Guia de herbicidas**. 2. ed. Londrina: Autores, 1988. p.175-185.

ALTOM, J. D.; STRITZKE, J. F. Degradation of dicamba, picloram and four phenoxy herbicides in soil. **Weed Sci.**, v. 21, p.556, 1973.

BARBOSA, A. J. A. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, v. 11, n.2-3, p. 95-97, 1978.

BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.

BELAI, A. LINCOLN, J., BURNSTOCK, G. progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. **Gastroenterol.**, v. 95, p. 1234-1241, 1988.

BERWICK, P. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid poisoning in man. **JAMA**, v. 214, n. 6, p. 1114-1117, 1970.

BOGLIOLO, L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981, 1236p.

BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, A. M. E.; DUFFARD, R. O.; ANTONELLI, M. C.

Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure on dopamine D2-like receptors in rat brain. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 26, p. 599-605, 2004.

BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R.; DUFFARD, A.M.E. Asymmetrical development of the monoamine systems in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid treated rats.

Neurotoxicol., v. 178, p. 1-9, 2002.

BORTOLOZZI, A. DUFFARD, A. M. E.; DAAS, F.; DUFFARD, R.; SILVEIRA, R.

Intracerebral administration of 2,4-ciclorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. **Neurotoxicol.**, v. 22 n. 2, p. 221-232, 2001.

BORTOLOZZI, A. DUFFARD, R.; DUFFARD, A. M. E. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and postnatal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

Neurotoxicol. Teratol., v. 21, n. 4, p. 451-465, 1999.

BORTOLOZZI, A. DUFFARD, R.; RUBIO, M.; STURTZ, N.; DUFFARD, A. M. E.

Regionally specific changes in central brain monoamine levels by 2,4-

dichlorophenoxyacetic acid in acute treated rats. **Neurotoxicol.**, v. 19, n. 6, p. 839-852, 1998.

BRADBERRY, S.M.; WATT, B. E.; PRODFOOT, A. T.; VALE, J. A. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. **J Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 38, p. 111-122, 2000.

CHARLES, J. M.; BOND, D. M.; JEFFRIES, T. K.; YANO, B. L. Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. **Fundamental Applied Toxicol.**, v. 33, p. 166-172, 1996a.

CHARLES, J. M. et al. Comparative subchronic and chronic dietary toxicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine, and ester in the dog. **Fundamental and Applied Toxicol.**, v. 29, p. 78-85, 1996.

CHARLES, J. M.; CUNNY, h. C.; WILSON, R. D.; BUS, J. S. Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine and ester in rats. **Fund Appl Toxicol**, v. 33, p. 161-165, 1996b.

COPE, O. B.; WOOD, E.; WALLEN, G. H. Some chronic effects of 2,4-D on the bluegill (*Lepomis machrochirus*). **Trans. Am. Fisheries Soc.**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 1970.

DI PAOLO, O.; DUFFARD, A. M. E.; DUFFARD, R. In vivo and in vitro binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. **Chem. Biol. Interac.**, v. 137, p. 229-241, 2001.

DUFFARD, A.M.E.; BRUSCO, A.; DUFFARD, R.. Changes in serotonin-immunoreactivity in the dorsal and median raphe nuclei of rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid through lactation. **Mol. Chem. Neuropathol.**, v. 26, p. 187-193, 1995.

DUFFARD, R. GARCIA, G.; ROSSO, S.; BORTOLOZZI, A.; MADARIAGA, M. Central nervous system myelin deficit in rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid throughout lactation. **Neurotoxicol. Teratol**, v. 18, n. 6, p. 691-696, 1996.

ELO, H.A.; MACDONALD, E. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on biogenic amines and their acidic metabolites in brain and cerebrospinal fluid of rats. **Arch. Toxicol.**, v. 63, p. 127-130, 1989.

ELO, H. A.; YLITALO, P. Distribution of 2-methyl-4chlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in male rats: evidence for the involvement of the central nervous system in their toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 51, p. 439-446, 1979.

ELO, H. A.; YLITALO, P. Substantial increase in the levels of chlorophenoxyacetic acids in the CNS of rats as a result of severe intoxication. **Acta Pharmacol. Toxicol.** V. 41, p. 280-284, 1977.

EPA United States Environmental Protection Agency. *The risk assessment guidelines of 1986*. Office of health and environmental assessment. Washington: EPA, 1987. [3] p. EPA/600/8-87/045.

FREGONESI, C.E.P.T.; MIRANDA-NETO; MOLINARI, S. L.; ZANONI, J. N.
Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 59, p. 50-53, 2001.

FULLER, R. W. Comparison of MPTP and amphetamines as dopaminergic neurotoxins. In: LANGSTONS, J.W.; YOUNG, A. (Ed.), **Neurotoxins and neurodegenerative disease**. New York: New York Academic Sciences, 1992 p.87-95,.

FURLAN, M. M. D. P. Ontogenia e filogenia do sistema nervoso entérico. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 4, n. 2, p. 149-157, 2000.

FURLAN, M. M. D. P.; MIRANDA-NETO, M. H.; SANT'ANA, D. M. G.; MOLINARI, S. L.
Number and size of myenteric neurons of the duodenum of adult rats with acute diabetes. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 57, n. 3B, p. 740-745, 1999.

FURNESS, J. B., COSTA, M. **The enteric nervous system**. 1.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1987 p.6-53,.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. **Experientia**, v. 25, p. 18-19, 1969.

GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. International review. **Cytol.**, v. 59, p. 129-191, 1971.

GABELLA, G. On the ultrastructure of the enteric nerve ganglia. **Scand. J. Gastroenretol. Suppl.**, v. 71, p. 15-25, 1982.

GABELLA, G. The number of neurons in the small intestine of mice, guinea-pigs and sheep. **Neuroscience**. v. 22, n. 2, p. 737-752, 1987.

GABELLA, G. **The rat nervous system**. 3 ed. London: Elsevier, 2004.

GARABRANT, D. H.; PHILBERT, M. A. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4D). Epidemiology and toxicology. **Critical Rev.Toxicol.**, v. 32, n. 4, p. 233-257, 2002.

GARCIA, G.; TAGLIAFERRO, P.; BORTOLOZZI, A.; MADARIAGA, M. J.; BRUSO, A.; DUFFARD, A. M. E.; UFFARD, R.; SAAVEDRA, J. P. Morphological study of 5-HT neurons and astroglial cells on brain of adult rats perinatal or chronically exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. **Neurotoxicol.**, v. 22, p. 733-741, 2001.

GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2.ed. São Paulo: Ed. Roca, 1998. p. 286.

GERSHON, M. D.; CHALAZONITIS, A.; ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. **J. Neurobiol.**, v. 24, n. 2, p. 199-214, 1993.

HANSEN, W. H.; QUAIFE, M. L.; THABERMANN, R. T.; FITZHUGH, O. G. Chronic toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats and dogs. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, v. 20, p. 122-129, 1971.

HERNANDES, L.; BAZOTTE, R. B.; GAMA, P.; MIRANDA-NETO, M. H. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 58, n. 4, p. 1035-1039, 2000.

HERVONEN, H.; ELO, H. A.; YLITALO, P. Blood-brainbarrier damage by 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid herbicide in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 65, p. 23-31, 1982.

JESSELL, T. M. Reactions of neurons to injury. In: KANDELL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. (Ed.). **Principles of neural science**. 3. ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1991. p. 258-268.

KELLY, S. J.; GUIDOTTI, T. L. Phenoxyacetic acid herbicides and chlorophenols and the etiology of lymphoma and soft-tissue neoplasms. **Publ. Health Rev.**, v. 17, p. 1-37, 1989.

KIM, C. S.; KEIZER, R. F.; AMBROSE, W. W.; BREESE, G. R. Effects of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and quinolinic acid on 5-hydroxy-3-indoleacetic acid transport by the rabbit choroids plexus: pharmacology and electron microscopy cytochemistry. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 90, p. 436-444, 1987.

KIM, C.S.; KEIZER, R. F.; PRITCHARD, J. B. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid intoxication increases its accumulation within the brain. **Brain Res.** v. 440, p. 216-226, 1988.

KIM, C. S.; PRITCHARD, J. B. Transport of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid across the blood cerebrospinal fluid barrier of the rabbit. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 267, p. 751-757.

KUYVENHOVEN, J. P.; MEINDERS, A.E. Oxidative stress and diabetes mellitus – pathogenesis of long-term complications. **Europ. J. Int. Med.**, v. 10, n. 1, p. 9-19, 1999.

LEAMING, D.; CAUNA, N. A qualitative and quantitative study of the myenteric plexus of the small intestine of the cat. **J. Anat.**, v. 95, p. 160-169, 1961.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. p. 129-150.

MAREGA, P. **Características estruturais do plexo mioentérico do intestino delgado de ratos portadores do tumor de Walker-256: uma análise**

morfoquantitativa. 2002. 60 p. Dissertação (Mestrado em Anatomia Funcional: estrutura e ultra-estrutura) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2002.

MATTSSON, J. L.; CHARLES, M. J.; YANO, B. L.; CUNNY, H. C.; WILSON, R. D.; BUS, J. S. Single-dose and chronic dietary neurotoxicity screening studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats. **Fund. Applied Toxicol.**, v. 40, p. 11-119, 1997.

MELLO, E. V. S. L.; STABILLE, S. R.; MIRANDA-NETO, M. H. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 1, p. 106-113, 1997.

MIGUEL, M. G.; SOUSA, S. I. G.; CARDOSOS, J. C. R. Efeitos tóxicos dos pesticidas. **Rev. Port. de Farmácia**. v. 49, n. 3, p. 105-119, 1999.

MOLINARI, S.L.; PEREIRA, M. S.; SOUZA, R. R.; MIRANDA-NETO, M. H. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp*). **Rev. Unimar**, v. 16, n. 2, p. 419-426, 1994.

NATALI, M.R.M.; MIRANDA-NETO, M.H. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of duodenum of rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 54, n. 2, p. 273-279, 1996.

OLIVEIRA, G. H. **2,4-D: Uma abordagem toxicodinâmica**, 1990. 117 f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, G. H.; PALERMO-NETO, J. Avaliação da toxicidade prolongada do ácido 2,4-diclorofenoxiacético. **Revista brasileira de Toxicologia**. V. 8, n. 1, p. 251, 1995.

OLIVEIRA, G. H., PALERMO-NETO, J. Efeitos neuroquímicos da dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em ratos. **Revista da Sociedade Brasileira de Toxicologia**. 2 (supl. Esp.): v. 38, 1989.

OLIVEIRA, G.H.; PALERMO-NETO, J. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on open-field behaviour and neurochemical parameters of rats. **Pharmacol, Toxicol.**, v. 73, p. 79-85, 1993.

OLIVEIRA, G. H., PALERMO-NETO, J. Toxicology of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its determination in serum and brain tissue using gas chromatography-electron-capture detection. **Journal of Analytical Toxicology**. v. 19, p. 251-255, 1995a.

PALMEIRA, C.M.; MORENO, A. J. M.; BAIROS, V.; MADEIRA, V. M. C. Structural alterations in isolated hepatocytes induced by the herbicides paraquat, dinoseb, and 2,4-D. **Med. Sci. Res.**, v. 25, p. 339-342, 1997.

PAULINO, C. A.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Acute, subchronic and chronic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) intoxication in rats. **Vet. Hum. Toxicol**, v. 38, n. 5, p. 348-352, 1996.

PAULINO, C. A.; OLIVEIRA, G. H.; PALERMO-NETO, J. . Acute 2,4-dichlorofenoxyacetic acid intoxication in cattle. **Vet human toxicol**. v. 36, n. 5, p. 433-436, 1994.

ROMANO, E. B.; MIRANDA-NETO, M. H.; CARDOSO, R. C. S. Preliminary insvestigations about the effects of streptozotocin-induced chronic diabets on the nerve cell number and size of myenteric ganglia in rat colon. **Rev. Chil. Anat.**, v. 14, p. 139-145, 1996.

SANT'ANA, D. M. G.; MIRANDA-NETO, M. H.; SOUZA, R. R.; MOLINARI, S. L. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 55, n. 4, p. 687-695, 1997.

SANTER, R. M.; BAKER, D. M. Enteric neuron numbers and size in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 25, p. 59-67, 1988.

SASTRY, B. V. R.; CLARK, C. P.; JANSON, V. E. Formation of 2,4dichlorophenoxyacetylcholine (2,4-D-Ach) in human placenta and fetal growth retardation. **Neurotoxicology**, v. 16, p. 763, 1995.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4.ed. São Paulo: Ed. Sarvier, 1991. p.266-267.

STEISS, J.E.; BRAUND, K.G.; CLARK, E.G. Neuromuscular effects of acute 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposure in dogs. **Neurol. Sci.**, v. 78, n. 3, p. 295-301, 1987.

SOUZA, J. A.; FURLAN, M. M. D. P. Avaliação morfométrica de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos (*Rattus norvegicus*) adultos normais e com diabetes experimental. **Arq. Ciênc. Saúde da Unipar**, v. 5, n. 2, p. 141-147, 2001.

STERNINI, C. Structural and chemical organization of the myenteric plexus. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 50, p. 81-93, 1988.

TYYNELA, K.; ELO, H. A.; YLITALO, P. Distribution of three common chlorophenoxyacetic acid herbicides into the rat brain. **Arch. Toxicol.** v. 64, p. 61-65, 1990.

ZANIN, S.T.M.; MOLINARI, S. L.; SANT'ANA, D. M. E.; MIRANDA-NETO, M. H. Densidade dos neuronios mioentéricos nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*). **Arq. Ciênc. Saúde da Unipar**, v. 5, n. 1, p. 3-7, 2001.

ZANONI, J.N.; FREITAS, P.; PEREIRA, R. V.; SANTOS-PEREIRA, M. A.; MIRANDA-NETO, M. H. Effects of supplementation with ascorbic acid for a period of

120 days on the myosin-V and NADPHd positive myenteric neurons of the ileum of rats. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 34, p. 149-153, 2005.

ZANONI, J.N.; BUTTOW, N. C.; BAZTTE, R. B.; MIRANDA-NETO, M. H. Evaluation of the population of nadph-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid.

Autonomic neurosc., v. 104, n. 1, p. 32-38, 2003.

ZANONI, J.N.; MIRANDA-NETO, M. H.; BAZOTTE, R. B.; SOUZA, R. R.

Morphological and quantitative analysis of the neurons of myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetics rats. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 55, n. 4, p. 696-702, 1997.