

EFEITO DO HERBICIDA 2,4-D (ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO) NA MORFOLOGIA E FUNÇÃO RENAL DE RATOS WISTAR

Fabiana Burdini Margonato*
Márcia Regina Batista**
Elizete Rosa dos Santos Silva***
Edmara Aparecida Baroni**

MARGONATO, F.B.; BATISTA, M.R.; SILVA, E.R.S.; BARONI, E.A. Efeito herbicida 2,4-D (Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético na morfologia e função renal de ratos wistar. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 7(2): 113-117, 2003.

RESUMO: O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) tem elevado potencial tóxico podendo causar efeitos indesejáveis a curto e longo prazo por seu emprego prolongado em diversas culturas de frutas e cereais. O objetivo deste estudo foi observar o efeito do 2,4-D na função e estrutura renal de ratos Wistar através da avaliação da taxa de filtração glomerular (TFG), proteinúria e análise histológica. Foram utilizados 34 ratos Wistar (220-260 g) mantidos em gaiolas individuais, que foram separados em 2 lotes. No primeiro lote: G-I(n=5), G-II(n=4) e G-III(n=5) os animais receberam, respectivamente, por via oral, água, 2,5 e 5,0 mg/kg/dia de 2,4-D diluído em água durante 15 dias. No segundo lote: G-I(n=8), G-II(n=8) receberam, respectivamente, via oral, 2,5 e 5,0 mg/kg/dia de 2,4-D diluído em água e G-III(n=4) que recebeu água por 42 dias. Após o período de tratamento, fez-se coleta de sangue por punção cardíaca, urina de 24 horas e dos rins. Para análise histológica os rins foram fixados em "Bouin", cortados em 5mm e corados pelo Tricrômico de Masson. Não foi observada alteração significativa ($p < 0,05$) na TFG (G-I=7,3±0,8; G-II=7,0±0,9; G-III=7,6±0,6 mg/min/kg). Houve presença significativa de proteína na urina ($p < 0,05$) nos animais que receberam o 2,4-D por 15 dias (G-I=3,7±0,7; G-II=21,3±2,9; G-III=22,9±7,9 mg/24 h). Entretanto, a análise histológica dos animais que receberam 2,4-D por 42 dias não mostrou presença de esclerose glomerular e fibrose tubulointersticial. Portanto, a proteinúria provocada pelo 2,4-D no período estudado não foi suficiente para provocar alterações na região tubulointersticial e nem na região glomerular dos rins destes animais.

PALAVRAS-CHAVE: função renal, herbicida 2,4-D; morfologia; ratos wistar.

EFFECT OF THE HERBICIDE 2,4-D(2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID) ON THE RENAL MORPHOLOGY AND FUNCTION OF WISTAR RATS

ARGONATO, F.B.; BATISTA, M.R.; SILVA, E.R.S.; BARONI, E.A. Effect of the herbicide 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) on the renal morphology and function of wistar rats. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 7(2): 113-117, 2003.

ABSTRACT: The herbicide 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) has a high toxic potential and can cause both short and long term undesirable effects because of its long-term use in several fruit and cereal cultures. The aim of this study was to observe the 2,4-D effect on the kidney function and morphology of Wistar rats through the assessment of glomerular filtration rate (GFR), urinary proteins and histological analysis. Thirty-four Wistar rats (220-260g body weight) were left in individual cages. These animals were separated in two lots. In the first lot: G-I(n=5), G-II(n=4) and G-III(n=5) the animals received orally, respectively, water, 2.5 and 5.0 mg/kg/day of 2,4-D diluted in water for 15 days. In the second lot: G-I(n=8), G-II(n=8) received orally, respectively, 2.5 and 5.0 mg/kg/day of 2,4-D diluted in water and G-III(n=4) received water for 42 days. After the period of treatment, it was collected blood by cardiac puncture, 24-hour urine, and the kidneys were removed. For histological analyses, the kidneys were fixed in "Bouin", 5-mm sectioned and stained with Masson Tricromic. Significant changes in GFR were not observed ($p < 0,05$) ((G-I=7.3±0.8; G-II=7.0±0.9; G-III=7.6±0.6 mg/min/kg). There was a significant presence of urinary proteins ($p < 0,05$) in animals that received 2,4-D for 15 days (G-I=3.7±0.7; G-II=21.3±2.9; G-III=22.9±7.9 mg/24 h). However, the histological analysis of the animals that received 2,4-D for 42 days did not show glomerular sclerosis or tubulo-interstitial fibrosis. Therefore, the urinary protein caused by 2,4-D in the studied period was not enough to cause changes in the tubulointerstitial portion or in the glomerular portion of the kidneys of these animals.

KEY WORDS: herbicide 2,4-D; kidney function; morphology; wistar rats.

Introdução

O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), introduzido no mercado em 1946, é um dos mais usados no mundo em várias culturas de frutas e cereais (MS 1996; INDUSTRY, 2000). Este herbicida tem elevado potencial tóxico, podendo levar à intoxicação crônica, especialmente se não houver proteção adequada dos manipuladores.

Experimentos com animais de laboratório utilizando

o 2,4-D evidenciaram toxicidade e alterações como mortalidade do feto, sinais de neurotoxicidade, aborto, diminuição do peso corporal, alteração na capacidade reprodutiva masculina e feminina, além de toxicidade hematológica e hepática (LIS, 1987).

Em humanos a dose tóxica é de 40-60 mg/kg de peso corporal e a letal de 300 mg/kg. Pessoas (INDUSTRY, 2000) intoxicadas podem apresentar hiperglicemia, hipertermia,

*Aluna do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá.

** Docente do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá.

*** Técnica do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá.

Endereço: Edmara Aparecida Baroni. Departamento de Ciências Morfofisiológicas. UEM. Av. Colombo, 5790. Maringá - PR. 87020-900

mutações e câncer. Também foram observadas alterações no sistema nervoso periférico, cardiovascular e muscular (ELLENHOR & BARCELOS, 1988; KLAASSE *et al.*, 1996; MILENIA, 2000; ZOJA, 1998; 1995).

Alguns estudos mostraram danos renais em animais tratados com o 2,4-D (BALAGUÉ *et al.*, 2002; FOFANA *et al.*, 2002; STÜRTZ *et al.*, 2000; PERCE & PARKER, 2000; GREGUS *et al.*, 1999; GÓMEZ *et al.*, 1999). Em ratos que receberam o herbicida durante a gestação, os fetos apresentaram má-formação renal e do trato urinário, aumentando por isso os índices de morte pós-natal destes animais. Outras pesquisas sugerem que o acúmulo deste xenobiótico pode levar à toxicidade em tecidos renais devido à falência causada no sistema de transporte aniônico renal (GÓMEZ *et al.*, 1999).

O 2,4-D é absorvido rapidamente pelo trato gastrointestinal, por inalação e, em menor extensão, pela pele intacta. Sofre pouca metabolização hepática e é excretado em grande parte na urina na forma inalterada. Como a principal via de excreção desse herbicida é a renal (OKUDA *et al.*, 1986), o objetivo deste trabalho foi investigar seu efeito na morfologia e função renal de ratos Wistar machos.

Material e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando de 170 a 230 g. Esses animais foram submetidos a dois tipos de administração do herbicida 2,4-D:

Administração aguda (15 dias):

G-I: Animais receberam água e ração *ad libitum* por 15 dias (n=5).

G-II: Animais receberam, via oral, 2,5 mg/kg/dia de 2,4-D, dissolvido em água, por 15 dias (n=4).

G-III: Animais receberam, via oral, 5,0 mg/kg/dia de 2,4-D dissolvido em água por 15 dias (n=5).

Administração crônica (42 dias):

G-I: Animais receberam água e ração *ad libitum* por 42 dias (n=4).

G-II: Animais receberam, via oral, 2,5 mg/kg/dia de 2,4-D, dissolvido em água, por 42 dias (n=8).

G-III: Animais receberam, via oral, 5,0 mg/kg/dia de 2,4-D, dissolvido em água, por 42 dias (n=8).

Esses animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, no biotério do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM, à temperatura de 22°C e ciclo de iluminação artificial, de 12/12 horas. No início e no final dos experimentos foram feitas coletas de urina de 24 horas, para análise da proteína e da creatinina. A coleta de sangue foi feita por punção cardíaca, no primeiro e no último dia do experimento, para a análise da creatinina plasmática. Para o cálculo da taxa de filtração glomerular foi usado o "clearance" de creatinina.

Dosagem de creatinina

Para dosar a creatinina plasmática, foi utilizado um método colorimétrico. Neste método a creatinina reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente em 510 nm.

A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0 promovendo a decomposição do picrato de creatinina,

permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira.

Dosagem da proteinúria

Foi utilizado um método colorimétrico. Neste método o vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo azul, com o máximo de absorção em 600 nm.

A absorbância é diretamente proporcional à concentração da proteína na amostra.

Análise Histológica

Os fragmentos do tecido renal foram fixados em Bouin alcoólico, incluídos em parafina, cortados em espessura de 4 mm e corados pelo Tricrômico de Masson modificado por Goldner.

Análise Estatística

Foi utilizado o teste de Tukey para comparações múltiplas

Resultados

1º Lote:

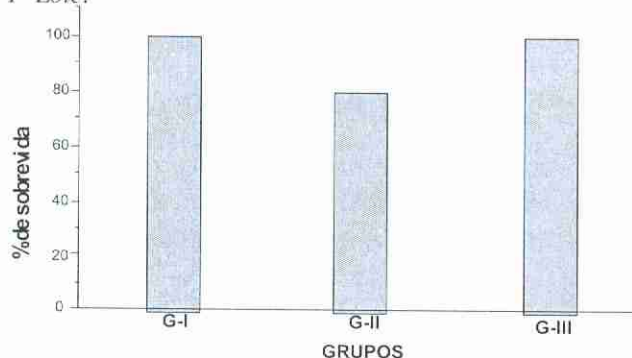


FIGURA 1 - Percentual de sobrevivência dos animais dos grupos: G-I (n=5), G-II (n=4) e G-III (n=5). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

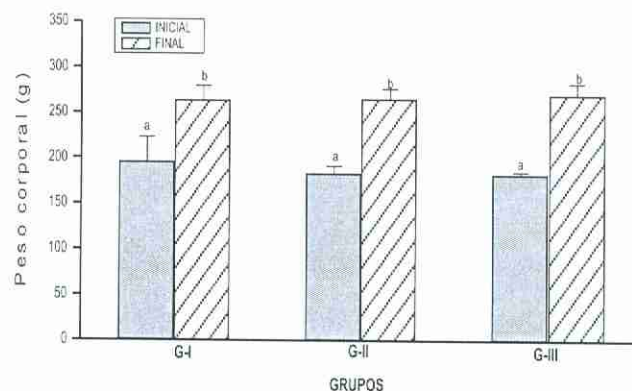


FIGURA 2 - Peso corporal (em gramas) dos animais dos grupos: G-I (n=5), G-II (n=4) e G-III (n=5). Dados expressos como média \pm desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estatisticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

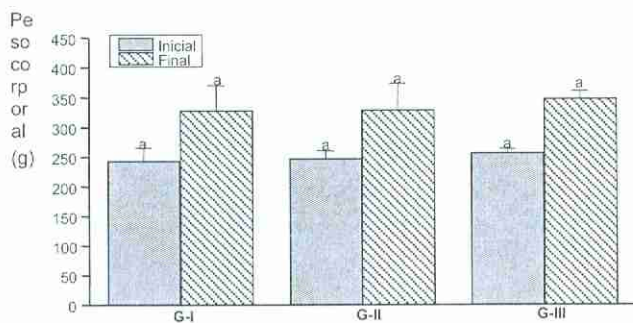


FIGURA 3 - Ingesta alimentar (em gramas) dos animais dos grupos: G-I (n=5), G-II (n=4) e G-III (n=5). Dados expressos como média ± desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estaticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

2º Lote:

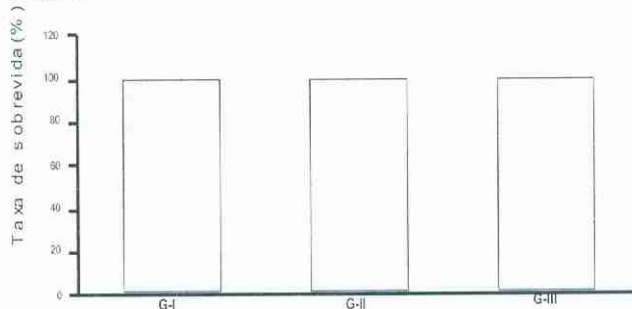


FIGURA 6 - Percentual de sobrevivência dos animais dos grupos: G-I (n=8), G-II (n=8) e G-III (n=4). Dados expressos como média ± desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estaticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

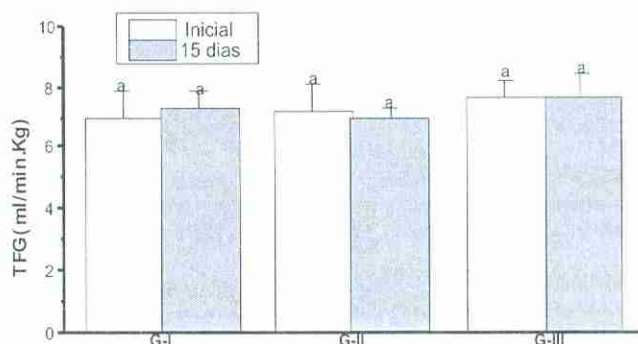


FIGURA 4 - Taxa de filtração glomerular (ml/min/Kg de peso corporal) dos animais dos grupos: G-I (n=5), G-II (n=4) e G-III (n=5). Dados expressos como média ± desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estaticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

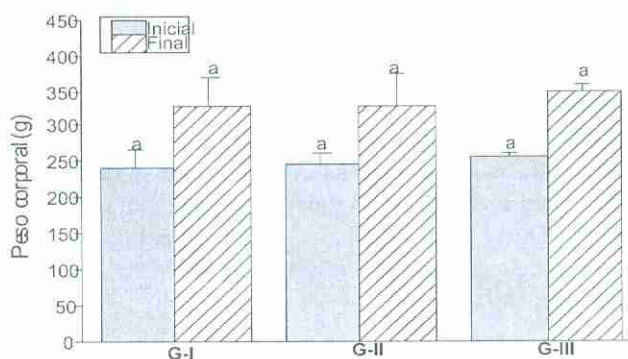


FIGURA 7 - Peso corporal (em gramas) dos animais dos grupos: G-I (n=8), G-II (n=8) e G-III (n=4). Dados expressos como média ± desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estaticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

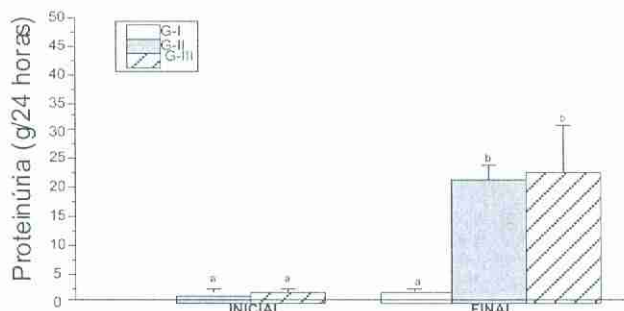


FIGURA 5 - Proteinúria (g/24 horas) dos animais dos grupos: G-I (n=5), G-II (n=4) e G-III (n=5). Dados expressos como média ± desvio padrão. Colunas com mesma letra não diferem estaticamente entre si, e as com letra diferente diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Discussão

Observamos que não houve mortalidade significativa nos animais que receberam administração aguda (15 dias) e crônica (42 dias) do 2,4-D em nenhuma das doses estudadas (2,5 e 5,0 mg/kg/dia). Portanto a dose e o tempo de tratamento utilizado não tiveram efeito letal significativo, também não observamos alteração no peso corporal e na ingestão alimentar nestes animais.

A análise da função renal pela taxa de filtração glomerular (TFG) mostrou que não houve alteração significativa nesse parâmetro em nenhum dos grupos que recebeu o 2,4-D. Portanto, a filtração glomerular não foi alterada nem com a administração aguda e nem com a crônica.

Observamos excreção urinária de proteínas nos animais que receberam o 2,4-D nos dois períodos (agudo e crônico). Proteinúria pode sugerir lesão nas células epiteliais do glomérulo, com perda de processos podais e da seletividade do filtro glomerular (REMUZZI *et al*, 1997). Essas alterações podem evoluir para esclerose glomerular e lesões tubulointersticiais (EDDY, 1989; REMUZZI *et al*, 1997;

FINE et al, 1993; EDDY & GIACHELLI, 1995; BURTON & HARRIS, 1996). A sequência dos eventos e os processos que levam a essas alterações morfológicas não são totalmente conhecidos. Bertani e cols (BERTANI et al, 1982; BERTANI et al, 1986; BERTANI et al, 1996) sugeriram que alterações intersticiais poderiam contribuir para o desenvolvimento da esclerose glomerular.

Vários estudos têm demonstrado correlação entre o grau de proteinúria e a progressão da lesão renal em vários tipos de glomerulopatias clínicas e experimentais e, sugerem que o aumento da reabsorção de proteínas pelas células dos túbulos renais pode contribuir para o desenvolvimento das lesões tubulointersticiais em nefropatias clínicas e experimentais (FINE et al, 1993; BERTANI et al, 1996; BURTON & HARRIS, 1996).

Proteínas filtradas podem ter efeitos tóxicos sobre as células tubulares (REMUZZI et al, 1997; EDDY & GIACHELLI, 1995; EDDY, 1989). Estudos realizados com células de túbulos renais em cultura mostraram que algumas proteínas, como a IgG e albumina, podem induzir aumento na produção de fatores relacionados com a inflamação intersticial e fibrose (BERTANI et al, 1986; EDDY, 1989; FINE et al, 1993; EDDY & GIACHELLI, 1995; BURTON & HARRIS, 1996).

Neste estudo, observamos proteinúria nos animais que receberam o 2,4-D já no período agudo. No entanto, a análise histológica dos animais que receberam a administração crônica não mostrou presença de esclerose glomerular e fibrose tubulointersticial. Portanto, a proteinúria provocada pelo 2,4-D, no período estudado, não foi suficiente para provocar alterações nem na região tubulointersticial nem na região glomerular.

Conclusões

Não houve diferença significativa na ingestão alimentar e no peso corporal nem na administração aguda e nem na crônica do 2,4-D.

Não foi observada alteração na taxa de filtração glomerular em nenhum dos grupos na administração aguda do 2,4-D.

Foi observado o aparecimento de proteína na urina dos animais que receberam 2,4-D (grupos G-II e G-III) após administração aguda. No entanto, a proteinúria provocada pelo 2,4-D não foi suficiente para provocar alterações na região tubulointersticial e glomerular.

Referências Bibliográficas

- INDUSTRY TASK FORCE II ON 2,4-D RESEARCH DATA: *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid*. Disponível em: <www.24d.org/>. Acessado em: 24/10/2000.
- US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Health Advisory*. Office of Drinking Water, Washington DC, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (BRASIL): *Relação de substâncias para uso Fitossanitário e Domissanitário: portarias do Ministério da Saúde*. São Paulo: ILSI, 1996.
- ABEAS, ZAMBOLIN, L.; CHAVES G.M. *Defensivos Agrícolas, Utilização, Toxicologia, Legislação Específica: fungicidas da terceira geração*. Brasília, 1983.
- ELLENHORN, M.J.; BARCELOUX, D.G. *Medical Toxicology: diagnosis and treatment for human poisoning*. New York: Elsevier, 1988.
- KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, O. (ed.) *Casarett and Doull's Toxicology; the basic science of poisons*. 5.ed. New York; McGraw – Hill, 1996.
- MILENIA AGRO CIÊNCIAS S/A: *sal de dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxyacético*. Londrina, 2000.
- ZOJA, C. et al Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kB activation. *Kidney Int.* 53: 1608-1615, 1998.
- ZOJA, C. et al Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am. J. Kidney Dis.* 26: 934-941, 1995.
- BALAGUÉ, C.E. et al Efect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic Escherichia coli virulence factors. *Toxicology*; 177(2-3): 143-55, 2002 Aug 15.
- FOFANA, D. et al Postnatal survival of rat offspring prenatally exposed to pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Congenit Anomalities Kyoto*; 42(1): 32-5, 2002 Mar.
- STÜRTZ, N.; EVANGELISTA de DUFFARD, A.M.; DUFFARD, R. Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) residues in neonates breast-fed by 2,4-D exposed dams. *Neurotoxicology*; 21(1-2): 147-54, 2000 Feb-Apr.
- PEARCE, M.S.; PARKER, L. Paternal employment in agriculture and childhood kidney cancer. *Pediatr Hematol Oncol*; 17(3): 223-30, 2000 Apr-May.
- GREGUS, Z.; HALÁSZI, E.; KLAASSEN, C.D. Effect of chlorophenoxyacetic acid herbicides on glycine conjugation of benzoic acid. *Xenobiotica*; 29(6): 547-59, 1999 Jun.
- GÓMEZ, L. et al 2,4-D treatment in tench (Tinca tinca): pathological processes on the excretory kidney. *Bull Environ Contam Toxicol*; 62(5):600-7, 1999
- OKUDA, S. et al Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.* 29: 502-510, 1986.
- REMUZZI, G.; RUGGENENTI, P.; BENIGNI, A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int.* 51: 2-15, 1997.
- EDDY, A.A.; GIACHELLI, C.M. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int.* 47: 1546-1557, 1995.
- EDDY, A.A. Interstitial nephritis induced by protein-overload proteinuria. *Am. J. Pathol.* 135: 719-733, 1989.(18)
- FINE, L.G.; ONG, A.C.; NORMAN, J.T. Mechanisms of tubulointerstitial injury in progressive renal disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 23:359-365, 1993.(19)
- BURTON, C.; HARRIS, M.B. The role proteinuria in the progression of chronic renal failure. *Am. J. Kid. Dis.* 27: 765-775, 1996.
- BERTANI, T. et al Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int.* 30: 488-496, 1986.
- BERTANI, T. et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Sequence of pathologic events. *Lab. Invest.* 46: 16-23, 1982.
- BERTANI, T. et al. G.: Adriamycin-induced glomerulosclerosis in the rat. *Am. J. Kid. Dis.* 7:12-19, 1986.

Recebido para publicação em: 07/08/2003.

Received for publication on 07 August 2003.

Aceito para publicação em: 08/11/2003.

Accepted for publication on 08 November 2003.



FIGURA 8 - Cortes histológicos do córtex renal de ratos Wistar controle (G-I) corados com Tricrômico de Masson. Ampliação: 856x.

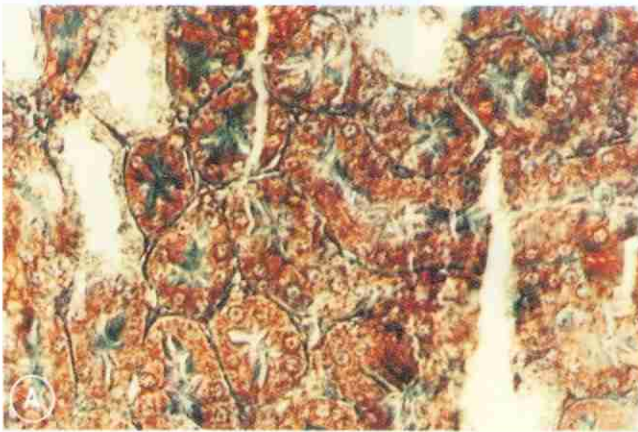


FIGURA 9 - Cortes histológicos do córtex renal corados com Tricrômico de Masson de ratos Wistar que receberam o herbicida 2,4-D (2,5 mg/kg/dia) por 42 dias. Observar ausência de lesões tubulointersticiais (atrofia e dilatação tubular com ou sem cilindros intratubulares, infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose intersticial) na foto A e ausência de esclerose glomerular na foto B. Ampliação: 856x.

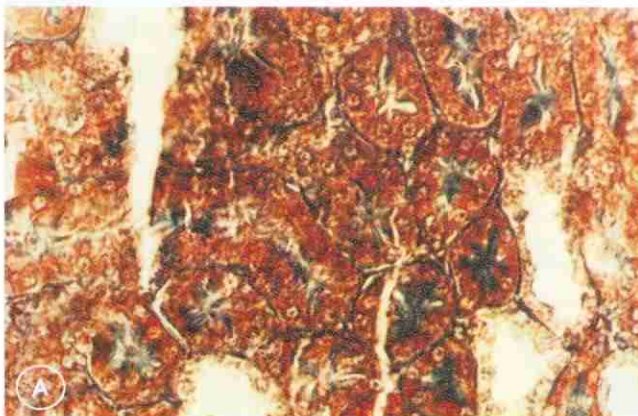


FIGURA 10 - Cortes histológicos do córtex renal corados com Tricrômico de Masson de ratos Wistar que receberam o herbicida 2,4-D (5,0 mg/kg/dia) por 42 dias. Observar ausência de lesões tubulointersticiais (atrofia e dilatação tubular com ou sem cilindros intratubulares, infiltrado inflamatório mononuclear e fibrose intersticial) na foto A e ausência de esclerose glomerular na foto B. Ampliação 856x.