

Avaliação do epitélio pulmonar em ratos submetidos ao malation

Evaluation of the pulmonary epithelium in rats treated with malathion

Evaluación del epitelio pulmonar en ratas tratadas con malati6n

Renata Calciolari Rossi

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil
renatacalciolari@terra.com.br

Gabriela Reigota Blanco

Professora Mestre, UNOESTE, Brasil.
gabirblanco@gmail.com

Francis Lopes Pacagnelli

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
francispacagnelli@unoeste.br

Glaura Scatamburlo Alves Fernandes

Professora Doutora, UEL, Brasil.
glaura@uel.br

Sérgio Marques Costa

Professor Doutor, UNOESTE, Brasil.
sergiocosta@unoeste.br

RESUMO

Objetivo foi analisar as alterações do epitélio pulmonar em ratos submetidos por via oral ao inseticida, Malation, através da análise histopatológica. Foram utilizados 30 ratos fêmeas da linhagem Wistar, com idade inicial de 21 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Protocolo CEUA- 7109. Os animais foram distribuídos casualmente em três grupos experimentais (n = 10). Dois grupos de animais foram tratados com Malation nas doses de 10 mg/kg ou 50 mg/kg de peso corpóreo. Essas doses correspondem a 0,5% e 2,5%, respectivamente da DL50 oral para ratos (DL50 oral = 2000 mg/kg). O outro grupo (grupo controle) recebeu apenas o veículo (óleo de soja) em igual volume. Resultados apresentados em média (desvio padrão), $p < 0,05$, Teste de ANOVA de 2 fatores. Os resultados foram obtidos através de análise histopatológica. Embora tenha existido um aumento das células caliciformes no grupo M50, não tivemos valores significativos, pois as médias foram próximas. Em relação à área do bronquíolo comparando o grupo controle com o M10 tivemos um aumento da área, considerado valor significativo. Em relação à área da luz quase não observamos diferença nas médias dos grupos, porém com redução no grupo M50, constatamos aumento da espessura da camada muscular no grupo M50 e aumento do score de inflamação. Conclusão: Embora as estruturas avaliadas não tenham atingido alterações significativas, há aumento da espessura da camada muscular, aumento das células caliciformes, redução da área dos bronquíolos e da área do lúmen relacionada à maior dosagem que utilizamos em nosso estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Inseticidas. Sistema Respiratório. Organofosforado

ABSTRACT

The objective was to analyze changes in the lung epithelium in rats subjected orally to the insecticide, Malathion, through histopathological analysis. Thirty female Wistar rats were used, with an initial age of 21 days, from the Central Animal Facility of the State University of Londrina – UEL, Protocol CEUA- 7109. The animals were randomly distributed into three experimental groups (n = 10). Two groups of animals were treated with Malathion at doses of 10 mg/kg or 50 mg/kg of body weight. These doses correspond to 0.5% and 2.5%, respectively, of the oral LD50 for rats (oral LD50 = 2000 mg/kg). The other group (control group) received only the vehicle (soybean oil) in an equal volume. Results presented as mean (standard deviation), $p < 0.05$, 2-way ANOVA test. The results were obtained through histopathological analysis. Although there was an increase in goblet cells in the M50 group, we did not have significant values, as the means were close. In relation to the bronchiole area, comparing the control group with the M10, we had an increase in the area, considered a significant value. In relation to the lumen area, we observed almost no difference in the group means, however with a reduction in the M50 group, we found an increase in the thickness of the muscle layer in the M50 group and an increase in the inflammation score. Conclusion: Although the structures evaluated did not achieve significant changes, there is an increase in the thickness of the muscular layer, an increase in goblet cells, a reduction in the area of the bronchioles and the area of the lumen related to the higher dosage used in our study.

KEYWORDS: Insecticides. Respiratory system. Organophosphate.

RESUMEN

El objetivo fue analizar cambios en el epitelio pulmonar en ratas sometidas por vía oral al insecticida Malatión, mediante análisis histopatológico. Se utilizaron treinta ratas Wistar hembra, con edad inicial de 21 días, procedentes del Animalario Central de la Universidad Estadual de Londrina – UEL, Protocolo CEUA-7109. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos experimentales (n = 10). Se trataron dos grupos de animales con malatión en dosis de 10 mg/kg o 50 mg/kg de peso corporal. Estas dosis corresponden al 0,5% y al 2,5%, respectivamente, de la LD50 oral para ratas (LD50 oral = 2000 mg/kg). El otro grupo (grupo de control) recibió sólo el vehículo (aceite de soja) en un volumen igual. Los resultados se presentan como media (desviación estándar), $p < 0,05$, prueba ANOVA de 2 vías. Los resultados se obtuvieron mediante análisis histopatológico. Aunque hubo un aumento de células caliciformes en el grupo M50, no tuvimos valores significativos, ya que las medias fueron cercanas. En relación al área de los bronquiolos, comparando el grupo control con el M10, tuvimos un aumento en el área, considerado un valor significativo. En relación con el área de la luz, casi no observamos diferencias en las medias del grupo, sin embargo, con una reducción en el grupo M50, encontramos un aumento en el grosor de la capa muscular en el grupo M50 y un aumento en la puntuación de inflamación. Conclusión: Si bien las estructuras evaluadas no lograron cambios significativos, se observa un aumento en el espesor de la capa muscular, un aumento de las células caliciformes, una reducción del área de los bronquiolos y del área de la luz relacionada con la dosis más alta utilizada en nuestro estudio.

PALABRAS CLAVE: Insecticidas. Sistema respiratorio. Organofosforado.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos no Brasil tem aumentado cada vez mais, provocando alterações na saúde humana e nos ecossistemas. Os impactos na saúde podem chegar a atingir tanto os trabalhadores, como os consumidores dos alimentos contaminados com resíduos, sendo os aplicadores dos produtos os mais atingidos. Alguns problemas podem ser causados pela exposição aos agrotóxicos, como por exemplo, doenças respiratórias (bronquite asmática) e efeitos gastrointestinais. E para alguns compostos como organofosforados e organoclorados existem os distúrbios musculares, debilidade motora e fraqueza (ANTLE; PINGALI, 1994, p. 593; BOWLES; WEBSTER, 1995, p. 418).

Em 1920 foi dado início a utilização de agrotóxicos na agricultura, porém pouco se sabia sobre os efeitos colaterais. Em torno de 1960 os agrotóxicos foram utilizados mais intensamente na agricultura, anteriormente eles foram utilizados para programas de saúde pública, como combate a vetores e controle de parasitas (RIBEIRO; MELLA, 207, p. 125).

Sabe-se que 20% do mercado mundial de agrotóxicos é composto pelos países em desenvolvimento, dessa forma, o Brasil se destaca como o maior mercado individual, representando 35% do montante. O Brasil está classificado no mercado como o maior consumidor de agrotóxicos por hectare no mundo (PERES et al., 2001, p. 564; PIRES et al., 2005, p. 598).

O consumo de pesticida aumentou consideravelmente no Brasil, levando a ocupar o quarto país em nível mundial na categoria de consumo de agrotóxicos. De acordo com a visão histórica a população está mais exposta aos agrotóxicos, devido ao aumento de consumo de alimentos de origem agropecuária e também pelo contato direto em aplicadores rurais ou manipuladores. Vale ressaltar também as tentativas de suicídios, ou por contato indireto, como em populações que necessitam da utilização de agrotóxicos para o controle de vetores nas endemias (CANTURITTI, 2005; FARIA et al., 2007, p. 25).

Os pesticidas são classificados de acordo com a sua natureza química e função. Em relação a natureza química são divididos em orgânicos e inorgânicos⁹. Os inseticidas orgânicos, conforme o mecanismo de ação são divididos em inibidores de colinesterase (organofosforados e carbamatos), piretrinas, piretroides e organoclorados. Já os inseticidas inorgânicos não contém nenhum átomo de carbono em sua estrutura química e podem ser classificados em arsenicais, fluorados e miscelânea. Estes quase não são utilizados devido ao alto risco no meio ambiente, elevada toxicidade, baixo controle dos insetos e não possuem antídoto (FARIA et al., 2007, p. 25; FENIK et al., 2011, p. 815; Oga, 2003).

Devido à praticidade dos organofosforados, começaram a ser mais utilizados, pois degradam rapidamente no meio ambiente, causando impacto ambiental menos significativo. Os inseticidas inibidores das colinesterases classificados como organofosforados, são absorvidos pela pele, ingestão ou por inalação (VINHAL; SOARES, 2018, P. 61).

1.1 Éster dietil dimetoxifosfinotiol (Malation)

O malation (éster dietil dimetoxifosfinotiol) é um dos OFs mais utilizados no Brasil, possui grande utilidade nas áreas rurais e urbanas em uma variedade de situações (erradicações de insetos, formigas e até piolhos). Ele é amplamente utilizado devido a sua alta eficácia como inseticida e sua baixa toxicidade em mamíferos quando comparado a outros OFs. No entanto,

algumas impurezas presentes na sua formulação podem aumentar a toxicidade (MARONI, 2000, p. 1).

Existe a inibição da enzima colinesterase, especialmente acetilcolinesterase, causando o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas, levando a uma série de efeitos parassimpaticomiméticos. A inibição da colinesterase por meio dos compostos fosforados provoca o acúmulo de acetilcolina e o organismo começa a apresentar muitas manifestações, tais como, os efeitos muscarínicos, nicotínicos e centrais. A ação da colinesterase é derivada de duas enzimas. Uma encontrada na membrana dos eritrócitos (colinesterase eritrocitária ou acetilcolinesterase), e outra sérica (colinesterase plasmática ou butiril-colinesterase). A redução da colinesterase plasmática pode durar por trinta dias e das hemácias por noventa dias após o último contato com os fosforados orgânicos (GUEVARA; PUEYO, 1995; OPAS, 1996; SOARES et al., 2003, p. 1117).

A ação tóxica dos compostos OFs está relacionada à inibição de numerosas enzimas. A inibição da AChE ocorre através do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima. Dessa forma, a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (Ach) estará comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central e periférico. Desta forma, haverá uma hiperestimulação dos receptores muscarínicos e nicotínicos (receptores colinérgicos) desencadeando uma variedade de sinais e sintomas que caracterizam a “síndrome colinérgica” (ABOU-DONIA, 2003, p. 484; ANKARBERG et al., 2004, p. 555; CHANDA; POPE, 1995, p. 771).

1.2 Efeitos da exposição aos agrotóxicos

A maior utilização dessas substâncias acontece na agricultura, mas também são utilizados em saúde pública, na eliminação e controle de vetores transmissores de enfermidades endêmicas como; doença de Chagas, Malária e Dengue (DOMINGUES et al., 2004, p. 45).

O governo brasileiro não está dando a atenção adequada ao problema de intoxicação ocupacional por agrotóxicos, e ao mesmo tempo incentivando o aumento da produção agrícola, pois a exportação de produtos agropecuários é responsável por uma grande parte da balança comercial brasileira. Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas (SINITOX), em 2014 foram registrados 4.758 casos de intoxicação por uso de agrotóxicos na agricultura e manejo doméstico, sendo a faixa etária mais acometida de um a quatro anos de idade, representando 20,45% do total. Logo após estão os indivíduos entre vinte a vinte e nove anos, equivalendo a 14,2%, sendo o maior registro de casos na zona rural (MOREIRA et al., 2002, p. 299; SINITOX, 2021).

O sucesso das plantações muitas vezes depende de ações de controle de plantas daninhas, como o uso de agrotóxicos. Desde 2008, o Brasil é líder mundial no consumo de defensivos agrícolas. Com isso o uso abusivo de agrotóxicos está diretamente relacionado a inúmeros problemas de saúde e atinge trabalhadores da cadeia produtiva do agronegócio, moradores de áreas próximas aos centros de produção e consumidores que ingerem derivados de cultivos auxiliados por herbicidas (ABRASCO, 2016; GOMES, 2002, p. 261).

Os pesticidas empregados nas atividades agrícolas produzem efeitos diversos à saúde humana e ambiental. A contaminação resultante do uso de pesticidas para o homem e para os animais pode ser aguda ou crônica. No primeiro caso há uma exposição direta a uma única dose do produto, culminando com morte rápida ou lenta. No segundo caso, ocorre uma exposição

constante a doses relativamente baixas, levando ao aparecimento de sinais ou sintomas relativos à intoxicação crônica (WHO, 1990).

Os pesticidas mais utilizados na agricultura são os compostos organofosforados (OFs), que derivam do ácido fosfórico e tiosfosfórico e geralmente são aplicados como inseticidas (COSTA, 2006, P. 1).

A exposição aos OFs geralmente ocorre em pessoas que estão em contato com tais produtos químicos em consequência de sua ocupação, no hábito de comer durante o trabalho, no preparo do produto, ou indivíduos que residem próximo aos locais de armazenamento desses produtos. Sabe-se que a população em geral se expõe através da propagação dos produtos químicos no ambiente pelo consumo de alimentos contaminados, além das intoxicações intencionais (homicídio e suicídios) (SILVA et al., 2006, p. 1101).

Sabemos que a absorção dos OFs pelo organismo humano acontece por via dérmica, respiratória e digestiva. A via oral assume importância nas intoxicações digestivas, principalmente em crianças em casos acidentais, e em adultos através do consumo de alimentos contaminados (CAVALIERE et al., 1996, p. 267; KUSHIK; CHANDRABHAN, 2003, p. 171; LARINI, 1996, p. 515; MARONI, 2000, p. 1).

As formulações comercializadas do malation podem conter até doze impurezas formadas durante a fabricação e armazenamento. A capacidade mutagênica e alto potencial carcinogênico estão sendo estudados e discutidos. Porém, ainda necessitamos de mais estudos sobre a associação de malation, câncer e efeitos respiratórios (BASTOS et al., 2020, p. 3273).

De acordo com os dados impactantes sobre o uso de agrotóxicos, principalmente os organofosforados na saúde, tanto como exposição direta ou indireta, faz-se necessário cada vez mais estudos que avaliem os efeitos destes nos sistemas do corpo humano. Como os inseticidas são utilizados na parte agrícola e no controle de doenças zoonóticas, que são considerados agravos da saúde pública, precisamos avaliar os sintomas de intoxicação e exposição, para que os profissionais de saúde estejam aptos a identificar os sintomas e instalar tratamento adequado.

Justifica-se que atualmente os agrotóxicos são considerados de extrema importância no modelo de desenvolvimento da agricultura no país. Sabe-se que o Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo e o uso estimulado desses compostos proporcionou elevados índices de intoxicações induzidas por essas substâncias no campo ou em áreas urbanas (SANTOS, 2013).

Os trabalhadores agrícolas estão em grande parte do tempo expostos aos riscos de intoxicação, devido ao contato intenso com os inseticidas. Esses compostos são potencialmente tóxicos aos seres humanos, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, ter ação imunodepressora ou serem até cancerígenos, entre outros efeitos. Os organofosforados são uns dos pesticidas mais utilizados e causadores de intoxicações ocupacionais, pertencentes à classe dos inibidores das enzimas colinesterases. Os carbamatos e os organofosforados são absorvidos por via oral, respiratória e cutânea, aumentando as taxas de intoxicação em todo o mundo (FUKUTO, 1990, p. 254; LINHARES, 2014; MATOS et al., 1988).

Com o aumento populacional e os avanços tecnológicos o uso de inseticidas organofosforados tem sido cada vez mais utilizado para agricultura e também para o controle de doenças causadas por vetores. Dessa forma, é necessário analisar os possíveis danos ao sistema respiratório, através de análise histopatológica de pulmões de ratos expostos ao Malation. A fim de promover aumento do conhecimento sobre os sinais de intoxicação e

alterações permanentes no epitélio pulmonar. O presente estudo tem como objetivo analisar as alterações do epitélio pulmonar em ratos submetidos ao inseticida organofosforado, Malation.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos de natureza ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética para uso dos Animais da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e foi realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA). Protocolo CEUA- 7109.

Este projeto utilizou os pulmões provenientes dos ratos utilizados no estudo intitulado “Avaliação dos efeitos do malation sobre o desenvolvimento do sistema genital feminino de ratos desde o período juvenil até a puberdade”, aprovado em 17 de novembro de 2021.

2.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 30 ratos fêmeas da linhagem Wistar, com idade inicial de 21 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Os animais foram distribuídos casualmente em três grupos experimentais (n = 10). Dois grupos de animais serão tratados com Malation nas doses de 10 mg/kg ou 50 mg/kg de peso corpóreo via gavagem. Essas doses correspondem a 0,5% e 2,5%, respectivamente da DL50 oral para ratos (DL50 oral = 2000 mg/kg) (U S EPA, 200). O outro grupo (grupo controle) recebeu apenas o veículo (óleo de soja) em igual volume.

2.3 Coleta dos materiais

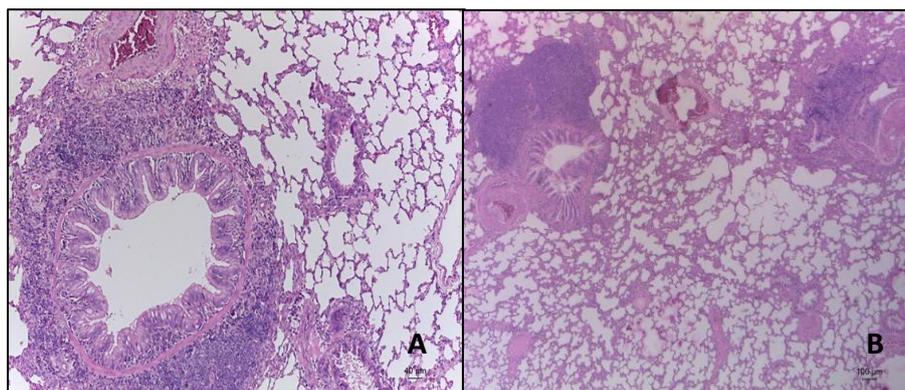
No biotério de Londrina, as fêmeas foram anestesiadas com associação de xilazina e quetamina e submetidos à eutanásia por punção cardíaca, em fase de estro, para a coleta dos pulmões, os quais foram destinados ao processamento histológico. Os pulmões foram fixados na solução fixadora de Alfac (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial). No laboratório da UNOESTE foi realizado o processamento dos pulmões em parafina e realizado cortes histológicos de 5 µm de espessura (três cortes não seriados por animal) corados com hematoxilina e eosina.

2.4 Análise dos dados

A avaliação do epitélio pulmonar, após a confecção das lâminas, foi realizado a captura de imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD). Foi realizada análise histopatológica e morfométrica do tecido pulmonar, com aumento microscópio de 400X e 1000x (Figura 1), foram analisadas 42 lâminas com 3 imagens de cada uma, totalizando 126 imagens.

Após captura das imagens foi utilizado o software image-Pro Plus® (versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), para quantificação das células calciformes, área do bronquíolo e área da luz do tecido pulmonar dos ratos. Feito análise cegada para evitar falsos resultados.

Figura 1 – Visualização do bronquíolo e alvéolos, corados com hematoxilina eosina, com aumento 400x (A). Brônquiolo e alvéolos corados com hematoxilina e eosina, com aumento 1000x (B).



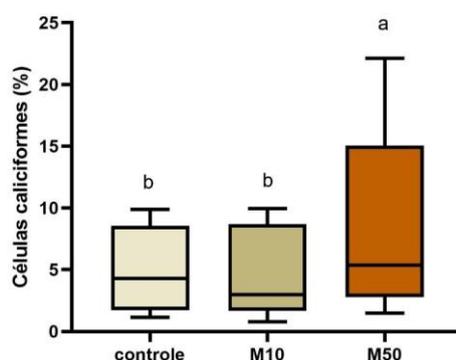
Fonte: Autores, 2020.

3 RESULTADOS

O presente estudo analisou o epitélio pulmonar de 30 ratas fêmeas da raça Wistar, através da administração por gavagem de Malation na dose de 10 mg/kg, 50 mg/kg e um grupo controle que recebeu óleo de soja. Os resultados foram obtidos através das seguintes análises; células caliciformes; área do bronquíolo, área da luz, espessura da camada muscular e score de inflamação. Não houve morte de nenhum animal durante o período experimental.

Na figura 2 são comparadas as relações entre o grupo controle e os que receberam malation nas diferentes dosagens com a porcentagem das células caliciformes. Constatamos aumento das células caliciformes no grupo que recebeu maior dosagem de malation (M50).

Figura 2 – Comparação entre as médias dos animais que receberam malation e o aumento das células caliciformes.

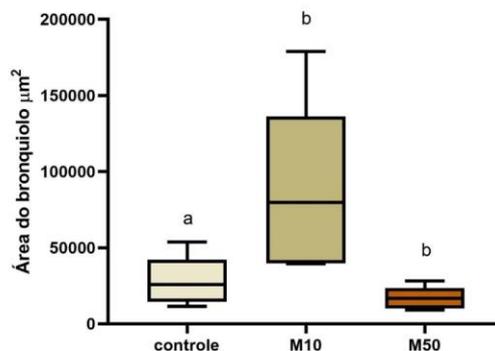


Resultados apresentados em média (Desvio Padrão), valor obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores, com nível de significância de $p < 0,05$. Legenda: letras minúsculas diferentes representam a diferença estatística na comparação entre os grupos de acordo com as dosagens de malation. Fonte: Autores, 2020.

Podemos observar (Figura 3) a comparação entre o grupo controle e as diferentes dosagens de malation com a área do bronquíolo. Observamos um grande aumento da área do bronquíolo no grupo M10, tanto em comparação com o controle quanto ao grupo M50. Comparando o grupo controle com o M10 tivemos aumento da área do bronquíolo com valor

significativo, porém em comparação do grupo controle com o M50, não obtivemos valores com significância estatística.

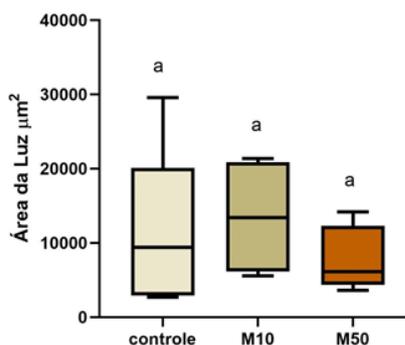
Figura 3 – Comparação entre o grupo controle com as diferentes dosagens de malation em relação à área do bronquíolo



Resultados apresentados em média (Desvio Padrão), valor obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores, com nível de significância de $p < 0,05$. Legenda: Letras minúsculas diferentes representam os valores obtidos com significância estatística. Fonte: Autores, 2020.

Analizamos as alterações do tamanho da área da luz do bronquíolo em relação às dosagens de malation (Figura 4). Observamos redução na área da luz dos bronquíolos no grupo que recebeu maior dosagem (M50) de malation.

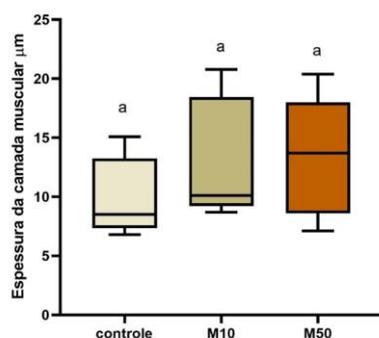
Figura 4 – Comparação entre as diferentes dosagens de malation em relação a área da luz do bronquíolo.



Resultados apresentados em média (Desvio Padrão), valor obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores, com nível de significância de $p < 0,05$. Legenda: Letras minúsculas diferentes representam os valores obtidos com significância estatística. Fonte: Autores, 2020.

A figura 5 demonstra a comparação entre as dosagens de malation e as alterações na espessura da camada muscular. Constatamos que existe aumento da espessura da camada muscular nos dois grupos que receberam o malation (M10 e M50), pode-se ainda observar que a média do grupo M50 obteve maior aumento da espessura da camada muscular em relação aos outros grupos, porém não significativo. O artigo deverá ser inédito, cabendo ao autor declarar que o trabalho não foi publicado e não está sendo submetido à nenhuma outra revista. Uma vez aceito para publicação, o artigo não poderá ser republicado em nenhum outro lugar sem o consentimento dos editores.

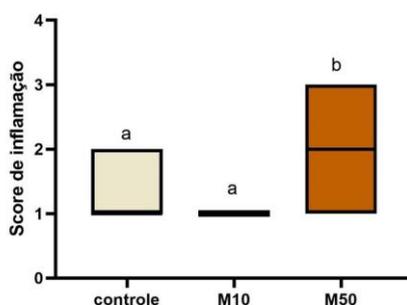
Figura 5 – Comparação do aumento da espessura da camada muscular com as dosagens de malation.



Resultados apresentados em média (Desvio Padrão), valor obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores, com nível de significância de $p < 0,05$. Legenda: Letras minúsculas diferentes representam os valores obtidos com significância estatística. Fonte: Autores, 2020.

A figura 6 mostra o score de inflamação em relação ao grupo controle com os grupos que receberam malation. Observamos aumento no score de inflamação no grupo M50, o qual recebeu maior dosagem de malation, com valores de relevância estatística.

Figura 6 – Comparação dos grupos em relação ao score de inflamação.



Resultados apresentados em média (Desvio Padrão), valor obtido pelo Teste de ANOVA de dois fatores, com nível de significância de $p < 0,05$. Legenda: Letras minúsculas diferentes representam os valores obtidos com significância estatística. Fonte: Autores, 2020.

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram, que as concentrações utilizadas causaram alterações na histologia pulmonar dos ratos submetidos ao malation em diferentes dosagens. O que também foi verificado por Inouye et al. (2014, p. 103), mostrando aumento de infiltrado inflamatório, espessamento alveolar e bronquiolar com congestão pulmonar. O uso de pesticidas químicos em países em desenvolvimento como Brasil e seus impactos na saúde humana e na segurança alimentar é uma preocupação global, devido a este fato nosso trabalho realizou análise sobre os efeitos que o inseticida Malation, pode provocar no epitélio pulmonar.

Imamura et al. (1983, p. 73) fizeram um estudo sobre a administração oral de uma das impurezas do Malation (O, O, S-trimetilfosforotioato-OOS), onde constataram alterações morfológicas no epitélio bronquiolar dos pulmões dos ratos. Os pulmões de ratos tratados com OOS tinham menos células Clara (não ciliadas), porém, maiores do que os pulmões de ratos de

controle que receberam óleo de milho ou malation purificado. Além disso, a atividade da lactato desidrogenase (LDH) no líquido de lavagem broncopulmonar foi significativamente maior em OOS do que em ratos controle. Esses dados demonstram que OOS e/ou seus metabólitos causam lesão pulmonar, provavelmente devido fatores inflamatórios. De acordo com esse estudo o aumento dos níveis de LDH no líquido de lavagem broncopulmonar foi demonstrado ser um marcador útil para detectar lesão pulmonar resultante de pneumotóxicos.

O presente estudo analisou o pulmão de 30 ratos fêmeas da linhagem Wistar, submetidas ao malation. Os animais foram divididos casualmente em três grupos experimentais. Dois grupos de animais foram tratados com Malation nas doses de 10 mg/kg (M10) ou 50 mg/kg (M50) de peso corpóreo via gavagem. O outro grupo (grupo controle) recebeu apenas o veículo (óleo de soja) em igual volume.

Foi realizada análise histopatológica do tecido pulmonar, coradas com Hematoxilina e Eosina, com aumento microscópio de 400X e 1000X. Para avaliar a organização do epitélio pulmonar após o uso de malation, realizamos análises a respeito das células caliciformes, a área dos bronquíolos, espessura da camada muscular, área de luz dos bronquíolos e do score de inflamação.

A maior parte do epitélio respiratório é denominado pseudoestratificado colunar ciliado e composto pelas células caliciformes, que são responsáveis pela produção e excreção de muco (LUIS, 1997, p. 433).

Observamos aumento da porcentagem de células caliciformes no grupo que recebeu maior dosagem de Malation em relação ao grupo controle e o grupo M10. De acordo com o teste estatístico, em relação ao valor de $p < 0,05$ não constatamos alteração com significância estatística (Figura 2). Em relação à área do bronquíolo observamos aumento significativo do grupo que recebeu menor quantidade de malation (M10), mesmo se compararmos com o grupo controle e o grupo que recebeu maior dosagem. O que nos chama a atenção também é a redução da área do bronquíolo no grupo M50, o que pode indicar remodelamento bronquiolar (Figura 3).

Os OFs atuam inibindo a função de dois tipos de proteínas (enzimas da classe das acetilcolinesterase - AChEs): a) acetilcolinesterase específica, verdadeira ou acetilcolinesterase, (AChE) encontrada principalmente nas sinapses do SNC, periférico parassimpático e junção neuromuscular; b) butirilcolinesterase, pseudocolinesterase ou acetilcolinesterase inespecífica (BChE), encontrada no plasma, no intestino e, em menor concentração, em outros tecidos, está também presente nos eritrócitos (CARVALHO; RIBEIRO, 2013, p. 11; COSTA et al., 2004, p. 87; KUSHIK; CHANDRABHAN, 2003, p. 171).

Através do metabolismo hepático os OFs sofrem metabolização, produzindo os inibidores das enzimas colinesterases. Alterações bioquímicas e fisiológicas nos eritrócitos e linfócitos podem ser causadas pelo Malation, além de induzir uma série de aberrações cromossômicas em animais (AMER et al., 2002, p. 1; BANERJEE et al., 1999, p. 33; SANTOS, 2009).

Póvoa et al. (1997, p. 1997) expressam que estudos demonstram inclusive, a capacidade do Malation em alterar o ciclo celular e produzir distorções em nível de replicação do DNA celular, aberrações cromossômicas e associam sua ação a diversas patologias como o câncer, arteriosclerose, Parkinson, Alzheimer, malformações congênitas, infertilidade e esterilidade.

Inoyue et al. (2014, p. 103), realizaram um estudo experimental, com o objetivo de analisar as alterações morfológicas ocorridas no fígado e no pulmão de ratos Wistar adultos,

submetidos a doses do inseticida Malation, por 7, 14 e 21 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos, dos quais três foram tratados com Malation e um grupo controle recebeu soro fisiológico. Na investigação, foram utilizados 39 ratos albinos, adultos, machos e fêmeas da linhagem Wistar, com peso entre 240 g a 500 g. Estes foram divididos em quatro grupos denominados: 1, 2 e 3, compostos por oito animais cada um, tratados com Malation (volume de 10 mL e concentração de 250 mg/kg do peso corporal) e grupo controle, formado por 15 animais, administrado com soro fisiológico 0,9% e volume variável conforme o peso. Na histopatologia do pulmão dos mesmos ratos controle, encontraram-se aspectos normais nas áreas da região alveolar e bronquiolar. Resultados semelhantes também foram observados no nosso trabalho.

Já os grupos tratados com a droga em diferentes tempos, apresentaram consideráveis alterações. No grupo 1 (receberam malation por 7 dias), visualizaram áreas fibrosadas, infiltrado inflamatório acentuado e um espessamento alveolar, mas com preservação da luz alveolar. De acordo com nosso estudo observamos que as doses de malation de 10 mg/kg e 50 mg/kg, apresentaram pouca alteração da área da luz, apesar da amostra que recebeu maior dosagem houve redução da área da luz (Figura 4). No grupo 2, constatou-se uma evidente congestão pulmonar, seguida de um espessamento de septos alveolares com a presença de capilares nestes septos. No grupo 3, foi também verificado um infiltrado inflamatório mononuclear constituído de macrófagos e linfócitos, uma descamação epitelial nos bronquíolos com presença de hemácias na luz e espessamento de tecido conjuntivo (submucosa) bronquiolar.

Em relação à espessura da camada muscular do bronquíolo, não constatamos alteração com significância estatística (Figura 5). De acordo, com o estudo de Inoyue et al.³⁵, com o maior tempo de exposição (21 dias) e uma dosagem maior do que utilizamos no nosso trabalho, verificaram aumento da camada muscular do bronquíolo.

De acordo com a avaliação do score de inflamação, notamos aumento importante no grupo M50, comparado com o controle e o grupo M10. Os dados estatísticos possuem maior relevância, pois a média do grupo que recebeu maior dosagem (m50), conseqüentemente apresentou maior score de inflamação (Figura 6).

No mesmo estudo de Inoyue et al. (2014, p. 103), além de analisaram a histopatologia pulmonar de ratos expostos ao malation, analisaram também a presença de alterações hepáticas. Foi observado a presença de núcleos picnóticos, congestão vascular, vacuolização citoplasmática e infiltrado inflamatório. Dessa forma, podemos constatar que a exposição ao malation apresenta alterações sistêmicas.

Rezg et al. (2007, p. 143) ao analisarem os efeitos do Malation, calcularam o valor do hematócrito, o teor de hemoglobina e a concentração de glicose no sangue de animais submetidos à exposição subcrônica do produto via intragástrica diariamente, durante 32 dias. De fato, a única modificação notada foi na quantidade de hemoglobina, que aumentou significativamente, cujo resultado é justificado como uma adaptação para melhor oxigenação, já que o Malation provoca dano pulmonar. Dado esse que revigora a nossa constatação sobre as alterações pulmonares.

Wyatt et al. (1985, p. 42), publicou um trabalho sobre a instilação intrabronquial de paraquat em ratos e realizou estudo da morfologia e retenção do inseticida. Várias quantidades de paraquat (10(-5) a 10(-12) g) em 0,1 ml de solução salina foram instiladas diretamente no brônquio esquerdo de ratos machos adultos. Estudos gravimétricos, macroscópicos e microscópicos no lobo esquerdo do pulmão mostraram que 10(-5) g de paraquat levaram a edema pulmonar e lesões macroscópicas dois e 14 dias após a aplicação. A patologia do pulmão

foi semelhante à observada após envenenamento sistêmico. Quando 10(-6) g de paraquat foram instilados, alguns animais desenvolveram edema pulmonar e lesões macroscópicas. Porém, no exame microscópico mostrou alterações sutis no parênquima pulmonar.

Shaikat et al. (2022, p. 23), avaliou o perigo para a saúde originado por produtos químicos, como o malation e o nitrobenzeno em humanos, através do modelo de coelho. Entre os pesticidas, os organofosforados estão relacionados ao crescimento e anormalidades reprodutivas em animais. O malation é um pesticida organofosforado que atribui seu efeito tóxico à inibição da acetilcolinesterase. Contudo, este pesticida agora está sendo considerado um provável carcinógeno da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), que tem efeitos deletérios relatados em humanos e animais (BADR, 2020, p. 26036; GETENGA et al., 2002).

O malation é muito usado atualmente, pois é considerado de baixa toxicidade em comparação com outros organofosforados. No entanto, o uso generalizado pode levar à exposição excessiva de múltiplas fontes. Os mecanismos de toxicidade do malation incluem a inibição da enzima acetilcolinesterase, alteração do equilíbrio oxidantes/antioxidantes, dano ao DNA e facilitação do dano celular apoptótico. A exposição ao malation tem sido relacionada a diferentes toxicidades que afetam quase todos os órgãos de nossos corpos, sendo a toxicidade do SNC a mais bem documentada. Os efeitos tóxicos do malation no fígado, rins, testículos, ovários, pulmões, pâncreas e sangue também foram relatados. Além disso, também foi considerado um composto químico genotóxico e carcinogênico. Existem evidências de efeitos adversos associados à exposição pré-natal e pós-natal em animais e humanos.

Em nossa pesquisa bibliográfica encontramos poucos estudos recentes sobre as alterações que o malation pode provocar nos pulmões, o que dificultou o confronto dos resultados. Portanto faz-se necessários mais estudos sobre o assunto.

Um fator que também chama a atenção está relacionado ao impacto residual dos pesticidas, pois as pessoas são expostas a pesticidas químicos através do contato com a pele, ingestão ou inalação. O tipo de pesticida, a duração e a via de exposição e o estado de saúde individual são fatores de risco que influenciam na saúde em uma determinada comunidade (DAMALAS, KOUTROUBAS, 2016, p. 1; SHAFY, MANSOUR, 2016. p. 107).

Epidemiologistas dos EUA observaram um aumento incomum no linfoma não-Hodgkin em áreas de alto uso de pesticidas. Os numerosos efeitos à saúde associados aos pesticidas incluem efeitos dermatológicos, gastrointestinais, neurológicos, carcinogênicos, respiratórios, reprodutivos e endócrinos.

A exposição a pesticidas organofosforados pode ser um fator de risco para anomalias congênitas e outros resultados adversos do nascimento. No contexto dos níveis de segurança, as concentrações podem não exceder os níveis seguros determinados pela legislação. Porém, esses "limites seguros" podem subestimar o aspecto prático do impacto residual dos pesticidas na saúde humana (EMERY; CARRELL, 2006, p. 131, RECIO et al., 2001, p. 1237).

Além disso, a identificação de pesticidas no leite materno realça a importância das preocupações de saúde pública decorrentes de pesticidas residuais (BRODY, RUDEL, 2003, p. 1007).

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que a exposição ao malation provoca alterações na histologia pulmonar, com por exemplo a presença de inflamação dos bronquíolos. Observamos que os ratos que receberam a maior dosagem de malation (M50); apresentaram aumento de células caliciformes, redução da área do bronquíolo, redução da área da luz, com preservação da espessura da camada muscular e aumento do score de inflamação, em

comparação com o grupo controle e com o grupo que recebeu menor dosagem de malation (M10). Isso nos mostra a presença de alteração na histopatologia pulmonar, embora em alguns momentos não obtivemos valores de significância estatística.

Desse modo, nota-se a importância em realizar novas pesquisas em relação ao tema abordado, para que consigamos maiores dados para implementação de alternativas que evidentemente são mais seguras, tanto para o meio ambiente e para a população. As políticas públicas de saúde e práticas agrícolas atuais devem implementar protocolos ambientalmente amigáveis que representem menos riscos à saúde.

6 REFERÊNCIAS

ABOU-DONIA, M. B. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 58, n. 8, p. 484-497, 2003. Doi: 10.3200/AEOH.58.8.484-497

ABRASCO. Brazilian Association of Public Health. Note against aerial spraying of insecticides for vector control; 2016.

AMER, S. M. et al. Cytogenetic studies on the effect of feeding mice with stored wheat grains treated with malathion. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1-2, p. 1-10, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00261-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00261-3)

ANKARBERG, E.; FREDRIKSSON, A.; ERIKSSON, P. Increased susceptibility to adult paraoxon exposure in mice neonatally exposed to nicotine. **Toxicological Sciences**, v. 82, n. 2, p. 555-561, 2004. doi: 10.1093/toxsci/kfh274.

ANTLE, J. M.; PINGALI, P. L. Pesticides, productivity, and farmer health: A Philippine case study. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 76, n. 3, p. 418-430, 1994.

BADR, A. M. Organophosphate toxicity: Updates of malathion potential toxic effects in mammals and potential treatments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 21, p. 26036-26057, 2020. doi: 10.1007/s11356-020-08937-4.

BANERJEE, B. D. et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicology letters**, v. 107, n. 1-3, p. 33-47, 1999. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00029-6.

BASTOS, P. L. et al. Carcinogenicidade e mutagenicidade do malathion e seus dois análogos: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 8, p. 3273-3298, 2020. doi: 10.1590/1413-81232020258.10672018

BOWLES, R. G.; WEBSTER, J. P. G. Some problems associated with the analysis of the costs and benefits of pesticides. **Crop Protection**, v. 14, n. 7, p. 593-600, 1995.

BRODY, J. G.; RUDEL, R. A. Environmental pollutants and breast cancer. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1007-1019, 2003. doi: 10.1289/ehp.6310.

CANTARUTTI, TONY FRANCIS PLEUS. Risco tóxico de resíduos de pesticidas em alimentos e toxicidade reprodutiva em ratos Wistar. **Universidade Federal do Paraná**, 2005.

CARVALHO G.; RIBEIRO S. L. Intoxicações por agrotóxicos em trabalhadores dos pomares de maçãs. Florianópolis: **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2013.

CAVALIERE, M. J. et al. Miotoxicidade por organofosforados. **Revista de saúde pública**, v. 30, n. 3, p. 267-272, 1996. doi: 10.1590/s0034-89101996000300010.

CHANDA, S. M.; POPE, C. N. Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated gestational exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 4, p. 771-776, 1996.

COSTA, L. G. et al. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 44, p. 87-110, 2004. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121424.

COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. **Clinica chimica acta**, v. 366, n. 1-2, p. 1-13, 2006.

DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Farmers' exposure to pesticides: toxicity types and ways of prevention. **Toxics**, v. 4, n. 1, p. 1, 2016. doi: 10.3390/toxics4010001.

EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryo-genesis. **Asian journal of andrology**, v. 8, n. 2, p. 131-142, 2006.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A.. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.

Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trend Anal Chem*. 2011;30(6):815-26. doi: 10.1016/j.ttrac.2011.02.008

GETENGA, Z. M. et al. Dissipation behavior of malathion and dimethoate residues from the soil and their uptake by garden pea (*Pisum sativum*). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 64, p. 359-367, 2000. doi: <https://doi.org/10.1007/s001280000008>.

GOMES, M. J. Ambiente e pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 28, p. 261-269, 2002. doi: 10.1590/S0102-35862002000500004.

GUEVARA, J. L.; MOYA, V. Toxicología médica clínica y Laboral. Madrid: ed. 1995.

IMAMURA, T. et al. An impurity of malathion alters the morphology of rat lung bronchiolar epithelium. **Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 73-79, 1983. doi: 10.1016/0300-483x(83)90058-6.

INOUE, Luana Alves et al. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. **Uniciências**, v. 18, n. 2, 2014.

JAGA, Kushik; DHARMANI, Chandrabhan. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. **Revista panamericana de salud pública**, v. 14, p. 171-185, 2003.

LARINI L. Praguicidas. In: OGA S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 515.

LINHARES A. G. Efeito de pesticidas organofosforados e carbamatos sobre a acetilcolinesterase eritrocitária humana e seu potencial uso como biomarcador da exposição ocupacional. Recife: **Universidade Federal de Pernambuco**, 2014.

LUÍS, A. S. VII. Células do Epitélio Respiratório (Vias Aéreas de Condução). **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 3, n. 4, p. 433-439, 1997. doi: 10.1016/S0873-2159(15)31122-3.

MARONI, M. et al. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. Introduction. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 1-118, 2000.

MATOS, E. L. et al. Efectos de los plaguicidas en trabajadores de cultivos intensivos. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP)**; **104 (2), feb. 1988**, 1988.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, p. 299-311, 2002.

OGA S. Fundamentos de toxicologia. 2a. ed. São Paulo: Atheneu; 2003. 474 p.

Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS. Organização Mundial da Saúde - OMS. Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: [s. n.]; 1996.

PERES, F. et al. Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, p. 564-570, 2001.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 598-604, 2005.

PÓVOA, R. et al. Intoxicação por órgão-fosforado e necrose miocárdica. **Arq. bras. cardiol**, p. 377-80, 1997.

RECIO, R. et al. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. 12, p. 1237-1240, 2001.

REZG, R. et al. Effect of subchronic exposure to malathion on metabolic parameters in the rat. **Comptes rendus biologies**, v. 330, n. 2, p. 143-147, 2007. doi: 10.1016/j.crv.2006.11.002.

RIBEIRO, A. C. C.; MELLA, E. A. C. Intoxicação ocupacional por organofosforados—a importância da dosagem de colinesterase. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 9, n. 2, p. 125-134, 2007.

Santos AA. Avaliação dos efeitos tóxicos induzidos por malation e malatoxon e a possível proteção por oxiomas. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2013.

Santos A. A. Efeito reativador de oximas frente à inibição da enzima acetilcolinesterase cerebral induzida por malation e malaaxon. Florianópolis: **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2009.

SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian journal of petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016.

SHAIKAT, A. H. et al. Assessing the health hazard originated via pesticide chemicals in human through rabbit model in agricultural production system in Bangladesh. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2022. doi: 10.1186/s40360-022-00567-5

SILVA, A. P. et al. Lactational exposure to malathion inhibits brain acetylcholinesterase in mice. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 1101-1105, 2006.

Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX. Casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e faixa etária [Internet]. [citado em 2021 Maio 15]. Disponível em: https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil7_2.pdf.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1117-1127, 2003.

VINHAL, D. C.; SOARES, V. H. C.. Intoxicação por organofosforados: uma revisão da literatura. **Revista Científica FacMais**, v. 14, n. 3, p. 61-75, 2018..

World Health Organization - WHO. Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: Unep; 1990.

WYATT, I. et al. Intrabronchial instillation of paraquat in rats: lung morphology and retention study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 38, n. 1, p. 42-48, 1981. doi: 10.1136/oem.38.1.42.