

Explorando os impactos do glifosato na saúde hepática: uma abordagem avançada com processamento digital de imagens

Jorge Gomes do Nascimento

Mestre, UNOESTE, Brasil.
jgn.jorgegomes@gmail.com

Ana Paulo Alves Favareto

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
anafavareto@unoeste.com

Maíra Rodrigues Uliana

Professora Doutora, UNOESTE, Brasil.
maira@unoeste.com

Sérgio Marques Costa

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

Renata Calciolari Rossi

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

RESUMO

Introdução: O glifosato (N-fosfonometil-glicina) é um herbicida não seletivo, sistêmico, amplamente utilizado nas lavouras. Sua ampla utilização visa majorar a produtividade tornando o processo mais rentável. A exposição à herbicida causa danos à flora a fauna e pode ser um possível agente nocivo ao epitélio hepático e causar alterações patológicas. **Modelo do estudo:** Estudo do tipo experimental. **Objetivo:** analisar os efeitos da exposição crônica oral e inalatória ao em diferentes concentrações ao herbicida glifosato sobre o tecido hepático de ratos, utilizando processamento digital de imagens. Foram utilizados para a pesquisa 112 ratos Wistar distribuídos em 2 grupos de exposição (inalatória e oral) com 14 ratos em cada gaiola. O grupo de exposição inalatória recebeu nebulização diária, enquanto o grupo de exposição oral recebeu alimentação nebulizada com o glifosato. Em ambos os grupos, usamos três concentrações do herbicida caracterizadas com concentrações altas, médias e baixas. Após 180 dias de experimento os animais foram eutanasiados. Foram feitas imagens de microscópio, os núcleos hepáticos selecionados e delimitados, foi criado um banco de dados que possibilitou a análise do processamento digital de 200 mil hepatócitos. **Resultados:** Observou-se que tanto as vias de exposição quanto às dosagens exercem alterações preponderantes, sugestivas de danos hepáticos com valor de ($p < 0,05$). **Conclusão:** A exposição ao glifosato de maneira crônica inalatória apresenta alto potencial nocivo às células hepáticas.

Palavras-chave: Agroquímicos; Glifosato, Toxicidade; Fígado; Hepatócito, Modelos animais

1 INTRODUÇÃO

O glifosato configura hoje o herbicida mais utilizado no Brasil e no mundo, e o aumento do seu consumo já está bem abalizado, sobretudo em países da América do Norte, da América do Sul, Europa e Ásia. O mercado dos herbicidas apresenta-se como um importante agregador financeiro chegando a gerar cerca de US\$ 17 bilhões anualmente, com tendência ao crescimento exponencial (GIANESSI, 2013; BRASIL, 2018). O glifosato é um potente herbicida que atua no mecanismo de inibição da síntese de aminoácidos capaz de extirpar as ervas daninhas (SILVA; SOARES; MELO, 2023). De acordo com estimativas mais recentes, os herbicidas representam quase US\$ 24 bilhões em valor de comércio (BRASIL, 2023; MARTINS-GOMES et al., 2022).

O processo de aplicação dos agrotóxicos ocorre de diversas formas, podem ser pulverizados por meio de aplicação manual, tratores e aviões sobre as plantações, todavia nesse processo além de atingirem o alvo desejado, é alastrado no meio ambiente e podem contaminar o solo, lagos, manancial o ar e os alimentos, além de atingir de maneira direta os trabalhadores, moradores e animais que vivem ao entorno dessas áreas pulverizadas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; SOARES et al., 2021).

Estudos anteriores corroboram com achados demonstrando o auto potencial tóxico do glifosato, tanto para humanos quanto para os animais. Em humanos foi observado que pode ser nocivo, apresentando efeitos carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos, neuroendócrinos, dificuldades respiratórias, problemas de memória e de pele, depressão, entre outros (KWIATKOWSKA; JAROSIEWICZ; BUKOWSKA, 2013; BAEK et al., 2021). Já em animais, estudos mostraram que peixes sofrem alterações espermatogônia, reduzindo a fecundidade, na população de abelhas causa alterações comportamentais e alterações na microbiota intestinal deixando as mais suscetíveis a doenças e morte (ANTUNES et al., 2023; SANTOS et al., 2011).

Apesar do fato de que a pesquisa brasileira em relação ao impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana tenha crescido nos últimos anos, ainda não é suficiente para conhecer a extensão da carga química de exposição ocupacional e a dimensão dos danos à saúde. Um dos problemas apontados é a falta de informações sobre o consumo de agrotóxicos e a insuficiência dos dados sobre intoxicações por estes produtos (TOSETTO; ANDRIOLI; CHRISTOFFOLI, 2021; FIGUEIREDO; TRAPE; ALONZO, 2011).

No presente estudo foram analisadas as alterações morfológicas em fígado de ratos que foram submetidos cronicamente ao glifosato, sob a forma oral e inalatória em diferentes concentrações do agente químico, utilizando-se do processamento digital de imagens como ferramenta de mensuração quantitativa. Além disso, foram avaliadas as respectivas alterações de acordo com a concentração e sua respectiva via de exposição, estabelecendo vias de comparação da exposição humana ao glifosato. Pelo que sabemos, este estudo é inovador, pois é o único que avalia uma quantidade tão grande de células hepáticas após a exposição ao glifosato.

2 MÉTODOS

2.1 Aspectos de natureza ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista para ser realizado de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA). Todo o material biológico usado na elaboração do presente estudo encontra-se armazenado no laboratório da universidade, proveniente de um outro estudado já aprovado e realizado, intitulado ‘COMPARAÇÃO MORFOLÓGICA PULMONAR DE RATOS EXPOSTOS CRONICAMENTE POR VIA INALATÓRIA E ORAL AOS HERBICIDAS GLIFOSATO E ÁCIDO 2,4 DICLOROFENOXIACÉTICO’, aprovado em 13/11/2019 sob protocolo 5684, de responsabilidade da Dra. Renata Calciolari Rossi.

2.2 Protocolo de exposição ao herbicida glifosato

O protocolo de experimentação contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®, o qual foi administrada as seguintes concentrações diluídas em 10 ml de cloreto de sódio.

- Grupo controle: Solução composta apenas por 10 ml de Cloreto de sódio;
- Grupo baixa concentração: Solução composta por $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare, diluídos em Cloreto de sódio;
- Grupo média concentração: Solução composta por $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare, diluídos em Cloreto de sódio;
- Grupo alta concentração: Solução composta por $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare, diluídos em Cloreto de sódio.

O tempo de exposição foi de aproximadamente 15 minutos, para que toda a solução fosse nebulizada. Os animais que foram expostos por via inalatória foram nebulizados diariamente. A ração dos animais expostos por via oral foi trocada a cada dois dias, sendo a nebulização da ração realizada 24 horas antes de ser ofertada aos animais. Todos os animais foram submetidos a 180 dias de experimento.

2.3 Coleta dos materiais

Depois de realizado o protocolo de experimentação, os animais foram eutanasiados utilizando-se de tiopental sódico (30 mg/kg do peso corporal) por via intraperitoneal. Após esta

etapa, procedeu-se a retirada do fígado destes animais e posteriormente o processamento e confecção dos blocos em parafina.

2.4 Análise histológica

Foram realizados cortes de 5µm das amostras de fígado, foram corados com Hematoxilina e Eosina para posterior seleção das áreas hepáticas mais apropriadas para avaliação morfológica. Foram incluídos no estudo lâminas de fígado com preservação da arquitetura histológica. O protocolo da técnica de Hematoxilina e Eosina consiste primeiramente em desparafinizar, alcoolizar (álcool absoluto) e hidratar. Em seguida a este procedimento mergulha-se em Hematoxilina de Harris por 5 minutos e lava-se em água corrente, após isso mergulha-se a lâmina no diferenciador por 4 segundos (álcool ácido clorídrico) e lava-se rapidamente em água corrente. Subsequente a esta fase, o fragmento é mergulhado em Eosina por 5 minutos, seguido por álcool absoluto, para posterior montagem em meio sintético com entelan. Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para quantificar as células hepáticas, em toda extensão do corte do tecido do fígado dos ratos.

Para cada imagem, a contagem de hepatócitos íntegros e lesados foi realizada de forma automática utilizando uma metodologia com base em técnicas de processamento digital de imagens. Para isso, inicialmente, foi realizado um pré-processamento nas imagens para a segmentação de cada hepatócito; a sequência, e os hepatócitos segmentados foram classificados como íntegros ou lesados, seguindo algumas métricas obtidas dos hepatócitos das imagens e alguns parâmetros definidos empiricamente:

- Área do hepatócito (contagem dos pixels interiores da região do hepatócito segmentado) calculada utilizando o algoritmo de preenchimento de região (MARQUES FILHO; NETO, 1999).
- Pontos de contorno do hepatócito (perímetro) usando o algoritmo Border Following (SUZUKI et al., 1985).
- Retângulo envolvendo o hepatócito a partir dos planos cartesianos;
- Retângulo mínimo envolvendo o hepatócito segmentado (possivelmente rotacionado) utilizando os pontos de contorno obtidos pelo algoritmo Border Following (SUZUKI et al., 1985).

Com o uso do processamento de imagem foi possível dar maior robustez a quantidade de células estudadas; foram avaliadas 25 mil células hepáticas de cada grupo, perfazendo o total de 200 mil células avaliadas.

As classificações dos hepatócitos como íntegros ou lesados foram realizadas seguindo algumas regras e alguns parâmetros mínimos e máximos atribuídos empiricamente às métricas definidas e obtidas dos hepatócitos segmentados das imagens. Foi definido que todos os hepatócitos encontrados nas bordas das imagens, ou menores do que um tamanho mínimo de 43x43, ou com área menor que uma área mínima de 725, ou perímetro menor que um perímetro mínimo de 175, ou largura menor do que uma largura mínima de 37 seriam excluídos da classificação.

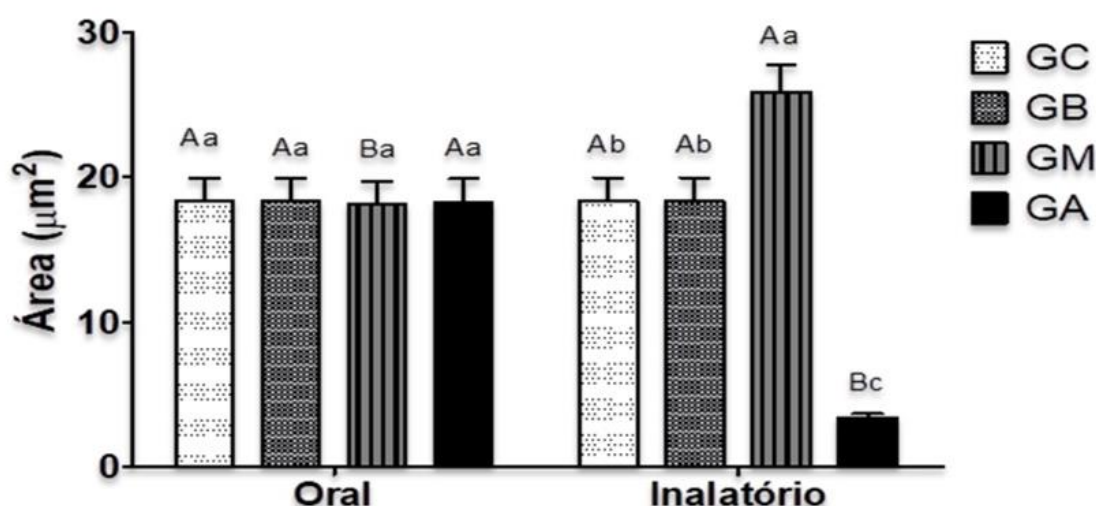
Após a confecção das lâminas, foram capturadas imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD) para analisá-las morfometricamente. Foi utilizado o software Image-Pro Plus® (Versão 7.0, Media Cybernetics). Para a análise dos resultados foi criado um banco de

dados eletrônico (Excel®).

3 RESULTADOS

O período de exposição ao glifosato apresentou alterações no epitélio hepático dos animais expostos por via inalatória, os animais cuja exposição procedeu por via oral, não apresentaram alterações quando comparados ao grupo inalatório. Os resultados da ANOVA de dois fatores evidenciam que a Via de Administração (Oral e Inalatória) apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) conforme exposto na figura 1.

Figura 1 – Comparação entre os grupos de exposição e as concentrações do herbicida.



Legenda: Letras maiúscula comparação entre grupos (Inalatório e Oral). Letras minúsculas comparação entre as doses (GC=Grupo Controle; GB=Grupo Baixa Concentração; GM=Grupo Média Concentração; GA=Grupo Alta Concentração.) Letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,05$). Fonte: Autores, 2024.

Outro achado preponderante foi encontrado o grupo de exposição inalatória, o qual demonstrou alterações no grupo de média concentração inalatória, este grupo destacou se entre todos, com maior número de células alteradas com redução do tamanho do núcleo, a via de administração e a dose apresentaram efetividade em causar efeitos nocivos. Os resultados obtidos através do ANOVA de dois fatores abalizam este achado com evidencia de valor de $p < 0,05$. Ratificando que a interação entre a via de administração e a dose também mostra um efeito expressivo.

A análise de comparações múltiplas (Bonferroni), a média do grupo GM da via de administração inalatória foi maior em comparação com os outros grupos. Este grupo também apresentou maior média em comparação com a via de administração oral. Já quando observamos o grupo GA da via de administração inalatória foi menor em comparação com os outros grupos desta mesma via. Isso poderia ter levado ao resultado de interação.

A interação significativa entre Dose e Via de administração indica que o efeito da Dose nos resultados varia dependendo da Via de administração. Isso significa que a influência da Dose não é consistente em todos os níveis de Via de administração. Tanto a Dose quanto o Via de administração têm efeitos significativos e isolados nos resultados. Devido à interação significativa, os efeitos da Dose e da Via de administração nos resultados não podem ser interpretados de forma independente, o efeito de um depende do nível do outro.

4 DISCUSSÃO

Embora o uso e a interação do glifosato sejam um tema bastante abordado, no que tange alterações as células hepáticas, carecem de mais estudos para definir o mecanismo de interação, e as suas respectivas implicações em longo prazo, no processo de surgimento de patologias (CHRISTENSEN, 2023). A presente pesquisa aborda uma temática de extrema importância para a sociedade, com robustez de resultados, foram analisadas 200 mil células hepáticas, para que então fosse possível chegar aos resultados alcançados.

Neste contexto o presente estudo traz novas e relevantes informações acerca da temática. A pesquisa angariou dados importantes da exposição oral e inalatória ao glifosato, a pesquisa evidenciou que há uma maior interação quando o mecanismo de contaminação do glifosato é por via inalatória; evidenciou ainda que a dosagem de media concentração quando administrada por via inalatória apresenta uma interação significativa sendo capaz de causar danos hepáticos.

A via inalatória com dose de media concentração apresentou maiores alterações que a via de alta concentração, esse achado pode ser atribuído por uma provável sensibilidade maior a medias concentrações de ingrediente ativo (PARIZI et al., 2020).

Esses achados corroboram com a pertinência da temática, tendo em vista as grandes áreas de pulverização, que expõe trabalhadores ao glifosato. A deriva do produto faz com que moradores de áreas próximas também sejam indiretamente expostos ao ingrediente ativo nocivo.

Os resultados evidenciam que as concentrações de ingrediente ativo, assim como a via, são preponderantes para as alterações. Contudo a exposição crônica mesmo em doses altas não culminou em letalidade, é possível que em maior tempo de observação, fosse observado o desenvolvimento de quadros e agravos que levassem a letalidade, outros estudos com período de exposição análoga a este, chegaram a resultados semelhantes sem que houvesse o óbito das matrizes estudadas, o que embasa a necessidade de estudos observacionais a longo prazo para acompanhar o desenvolvimento dos agravos sugestivos obtidos com a exposição crônica (MAIA et al., 2021).

Tão importante quanto a cronicidade da exposição é a via de contaminação. A via de exposição ao ingrediente ativo pode provocar respostas imunológicas mais exacerbadas, resultando em diferentes tipos de resposta. No presente estudo, observou-se que a via inalatória apresentou maiores alterações quando comparada à via de administração oral. O grupo exposto à média concentração do ingrediente ativo por via inalatória apresentou maior injúria às células hepáticas. As diferentes concentrações do ingrediente ativo administradas por via oral não resultaram em alterações significativas, sugerindo que a exposição oral seja menos

nociva. Esse achado contrasta com um estudo realizado em carpas que foram contaminadas via oral através da alimentação e que evidenciou danos hepáticos significativos, com alterações nos níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), indicando injúria hepática (ABDELMAGID et al., 2023).

O processo de exposição crônica ao glifosato ocorre majoritariamente pela via inalatória, seja de maneira direta através do manuseio, da aplicação do produto, ou de maneira indireta pela deriva que leva as gotículas para lugares além do local de pulverização. O presente estudo evidenciou que a dosagem de média concentração inalatória, é responsável por alterações de relevância científica, esta dosagem é capaz de suscitar alterações importantes às células hepáticas, o que é sugestivo de alterações e danos ao fígado. A cronicidade da exposição traz consigo alterações relevantes em diversos processos fisiológicos, assim como encontrado nesta pesquisa, outro estudo realizando a coleta de urina de trabalhadores da área rural que expuseram-se nos últimos anos durante o processo de pulverização, encontrou glifosato sendo excretado na urina (CHANG et al., 2023).

As diferentes concentrações de exposição vêm sendo observadas com o objetivo de estabelecer níveis de segurança quanto ao contato com o glifosato. Na presente pesquisa, não foi possível observar relevância nos baixos níveis de exposição, tanto na exposição oral quanto na inalatória. As baixas concentrações não apresentaram disparidades significativas nas alterações. Em contrapartida, um estudo de coorte prospectivo realizado com pessoas expostas à contaminação inalatória devido à deriva acompanhou gestantes expostas ao glifosato por um período de 18 anos, durante o qual as crianças foram monitoradas. Todas estavam a cerca de 1,6 km de distância do local de aplicação do glifosato. Este estudo inferiu que essa exposição crônica exacerbou o risco de injúria hepática, entre outras doenças (ESKENAZI, 2023).

Observou-se no grupo exposto a alta concentração inalatória de ingrediente ativo, uma média menor do que os outros grupos da mesma via, isso reforça a ideia de que a Via de Administração influencia diferentemente o efeito das doses, evidenciando como um processo de interação pode se manifestar. Em controversa ao estudo realizado com metodologia e tempo de exposição semelhante, que observou uma maior alteração relativa a altas concentrações e alterações esôfago e intestino delgado e grosso, independente do sexo (DE MARIASERRA; 2021).

5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo evidenciam que o herbicida glifosato causa alterações no epitélio hepático, quando administrado por via inalatória em média concentração, por período crônico.

A via de exposição oral no que tange tecido hepático não demonstrou resultados sugestivos de alterações, independente das doses administradas, enquanto que o grupo exposto por via inalatória em média concentração apresentou alterações sugestivas de dano hepático. Um período maior de acompanhamento seria necessário para observar o progresso dos danos e assim compreender até que ponto as injúrias ao tecido hepático poderiam suscitar um quadro de ineficácia da homeostase.

A exposição crônica ao glifosato em diferentes concentrações e por diferentes meios seja oral ou inalatório, apresentam alterações nas dimensões do núcleo do tecido hepático,

essas alterações podem culminar em desenvolvimento de quadros patológicos. É indubitável a necessidade de maiores estudos, em períodos maiores e maiores populações ensejando, acompanhar as alterações ao longo do tempo.

Há um grande caminho a ser percorrido a fim de evidenciar o efeito deletério do glifosato, não somente na saúde do homem, quanto para todo o ecossistema. É de crucial importância buscar meios e alternativos mais seguros para a população exposta e também para o meio ambiente. Assim sendo, são necessários maiores estudos de comparação entre grupos e sistemas corpóreos para desta forma mitigar os riscos que a exposição ao glifosato pode causar. Sugere-se ampliar as pesquisas sobre os efeitos da exposição por períodos mais longos na saúde animal, humana e ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABDELMAGID, A. D. et al. Glyphosate-induced liver and kidney dysfunction, oxidative stress, immunosuppression in Nile tilapia, but ginger showed a protection role. **Veterinary Research Communications**, v. 47, n. 2, p. 445-455, 2023.
- ANTUNES, B. C. et al. O herbicida glifosato pode interferir nas interações sociais de abelhas *Apis mellifera* operárias?. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, p. e29412642439-e29412642439, 2023.
- BAEK, Y. et al. Evolution of glyphosate-resistant weeds. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** Volume 255: Glyphosate, p. 93-128, 2021.
- CHANG, V. C. et al. Glyphosate exposure and urinary oxidative stress biomarkers in the Agricultural Health Study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 115, n. 4, p. 394-404, 2023.
- CHRISTENSEN, K. Looking beyond Cancer: Glyphosate and Liver, Metabolic Diseases in Youth. **Environmental Health Perspectives**, v. 131, n. 5, p. 054002, 2023.
- DE MARIA SERRA, F. et al. Subchronic exposure to a glyphosate-based herbicide causes dysplasia in the digestive tract of Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 43, p. 61477-61496, 2021.
- ESKENAZI, B. et al. Association of lifetime exposure to glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) with liver inflammation and metabolic syndrome at young adulthood: findings from the CHAMACOS study. **Environmental health perspectives**, v. 131, n. 3, p. 037001, 2023.
- FIGUEIREDO, G. M. de; TRAPE, A. Z.; ALONZO, H. A. Exposição a múltiplos agrotóxicos e prováveis efeitos a longo prazo à saúde: estudo transversal em amostra de 370 trabalhadores rurais de Campinas (SP). **Rev Bras Med Trab**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2011.
- GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. **Pest management science**, v. 69, n. 10, p. 1099-1105, 2013.
- KWIATKOWSKA, M.; PAWEŁ, J.; BUKOWSKA, B. Glyphosate and its formulations--toxicity, occupational and environmental exposure. **Medycyna Pracy**, v. 64, n. 5, p. 717-729, 2013.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.
- MAIA, F. C. C. et al. Cardiovascular damage associated with subchronic exposure to the glyphosate herbicide in Wistar rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 37, n. 4, p. 210-218, 2021.
- MARQUES FILHO, O.; NETO, Hugo Vieira. **Processamento digital de imagens**. Brasport, 1999.
- MARTINS-GOMES, C. et al. Glyphosate vs. glyphosate-based herbicides exposure: A review on their toxicity. **Journal**

of *Xenobiotics*, v. 12, n. 1, p. 21-40, 2022.

PARIZI, J. L. S. et al. Evaluation of buccal damage associated with acute inhalation exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) in mice. **BMC veterinary research**, v. 16, p. 1-10, 2020.

SANTOS, A. C. B. et al. Efeitos da contaminação por glifosato em duas gerações do peixe *Poecilia reticulata* (Peter, 1859): Sistema de defesa antioxidante, biotransformação de xenobióticos, colinesterase e metabolismo de aminoácidos. **Jornada de iniciação científica e tecnológica**, v. 1, n. 11, 2021.

SILVA, L. G.; SOARES, U. G.; MELO, S. G. F. Evolução da mecanização agrícola: a trajetória da mecanização das colheitadeiras e tratores um estudo com o olhar sobre as máquinas da CASE IH®. **Scientia Generalis**, v. 4, n. 2, p. 419-428, 2023.

SUZUKI, Satoshi et al. Topological structural analysis of digitized binary images by border following. **Computer vision, graphics, and image processing**, v. 30, n. 1, p. 32-46, 1985.

TOSETTO, E. E.; ANDRIOLI, A. I.; CHRISTOFFOLI, P. I. Análises das causas das subnotificações das intoxicações por agrotóxicos na rede de saúde em município do Sul do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 12, p. 6037-6047, 2021.