



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do Curso de Ciências Biológicas



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LETÍCIA CAVALCANTE DOS SANTOS

**ANÁLISE DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS NO FÍGADO DE RATOS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE BAIXAS DOSES DO INSETICIDA
CLORPIRIFÓS DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL**

Londrina
2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LETÍCIA CAVALCANTE DOS SANTOS

**ANÁLISE DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS NO FÍGADO DE RATOS APÓS
ADMINISTRAÇÃO DE BAIXAS DOSES DO INSETICIDA
CLORPIRIFÓS DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Fábio Goulart de Andrade
Coorientador: Me. Lucas Marcelo Meira da Silva

Londrina – Paraná
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Letícia Cavalcante.

ANÁLISE DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS NO FÍGADO DE RATOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE BAIXAS DOSES DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS DURANTE O PERÍODO PERIPUBERAL / Letícia Cavalcante Santos. - Londrina, 2024.
49 f.

Orientador: Fábio Goulart Andrade.

Coorientador: Lucas Marcelo Meira Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Clorpirifós - TCC. 2. agroquímico - TCC. 3. hepatotoxicidade - TCC. 4. peripuberdade - TCC. I. Andrade, Fábio Goulart. II. Silva, Lucas Marcelo Meira . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Fábio Goulart de
Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Sheila Michele Levy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Me. Pedro Rocha Tenorio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 Maio de 2024

*Dedico este trabalho à minha saudosa e amada Vó Rita,
que me ensinou lições valiosas sobre a verdadeira riqueza que
temos na vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fábio Goulart de Andrade, que me acolheu sob sua orientação desde o final de 2020, e desde então, me incentiva e apoia em todas as minhas atividades acadêmicas, com muitos chocolates, conselhos, e até as broncas quando necessário, sendo não apenas um orientador, mas também, um ombro amigo no qual sei que posso confiar. Me faltam palavras para descrever minha gratidão e admiração pela pessoa e profissional incrível que você é.

Ao meu coorientador e amigo, Lucas Marcelo Meira da Silva. Obrigada pela paciência em todas as correções, e nos infinitos testes bioquímicos. Nossos momentos juntos no laboratório serão lembrados por mim com muito carinho, desde o bom repertório musical escolhido, até as boas risadas e memes no whatsapp. Desejo muito sucesso em sua nova jornada!

À minha banca, Profa. Dra. Sheila Michele Levy e Ms. Pedro Rocha Tenorio. Agradeço por aceitarem o convite e compartilharem parte de seus conhecimentos científicos comigo. Profa. Sheila, te admiro desde o segundo ano da Biologia, e meu interesse na área surgiu após suas excelentes aulas de histologia comparada. É uma honra ser avaliada por você. Pedro, minha gratidão é imensa por todas as vezes que fez-se presente e me auxiliou nas atividades acadêmicas. Sua amizade e conselhos foram um diferencial nos últimos anos. Também agradeço ao Prof. Dr. Osny Ferrari, que aceitou o convite como membro suplente da banca, além de me acolher em sua disciplina. Nossas conversas e suas histórias deixam minhas quinta-feiras mais divertidas.

Aos membros do Laboratório de Análise Histopatológica (Lahip), (Sofia, Maria Emília, e babys Gerson e Vivian) que se tornaram meus amigos e sempre me auxiliaram quando precisei, em especial, aos meus amigos, Gabriel, Marina e Juliany. Gabriel, provavelmente você não se lembra, mas o primeiro contato que tive com um micrótomo foi com sua supervisão. Sua paciência e bom humor me proporcionaram ótimos momentos no laboratório. Ma e Ju, não tenho palavras para descrever o apoio

que me dão, amo nossa sintonia e até as sofrências, sou grata pela amizade de vocês, e quero levá-las para toda vida. Não posso deixar de agradecer aos ex-membros, Isadora e João Vinícius, que acompanharam minhas atividades por anos, deixando as idas ao laboratório extremamente divertidas. Obrigada pela amizade de vocês.

Aos Quirais: Bia, Maria Clara, Murilo, Sandy e Suelen, que foram o melhor presente que a UEL me proporcionou. Eu não teria conseguido sem vocês, nossos 5 anos juntos deixaram o peso de ser estudante em período integral bem mais leves, amo muito cada um de vocês.

À minha melhor amiga Ana, que está comigo desde meus 11 anos, e que mesmo sem nos vermos com a mesma frequência de antigamente, não permitiu que nossa amizade esfriasse.

Ao meu amor de 4 patas, Miá, que me escolheu para ser sua tutora e não desgruda de mim sempre que me sinto ansiosa.

Por fim, a minha base: meus pais Claudia e Osvaldernei, obrigada por não medirem esforços para verem minha felicidade, sei que fazem o possível e impossível para que eu tenha condições de realizar meus sonhos, amo vocês incondicionalmente. Minha tia Val, que sempre esteve comigo nos momentos mais alegres e difíceis, seus conselhos são preciosos na minha vida, obrigada por sempre cuidar de mim. Meus irmãos Gabriel, Vitor e Júlia, vocês são incrivelmente irritantes, mas são as pessoas que eu mais amo na vida, faria qualquer coisa por vocês. E meu noivo/xuxu, Leandro, que desde 2017 me possibilita enxergar o mundo de outra maneira, você é a principal razão de eu querer ser melhor a cada dia, seu amor e carinho deixam a minha vida mais feliz. Essa conquista é para vocês!

SANTOS, Letícia Cavalcante. **Análise de parâmetros histopatológicos e bioquímicos no fígado de ratos após administração de baixas doses do inseticida clorpirifós durante o período peripuberal.** 2024. 43. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

O clorpirifós é um inseticida pertencente à classe dos organofosforados, sendo o grupo com maiores casos de intoxicação. O uso de clorpirifós foi proibido em diversos países da União Europeia, e sua regulamentação no Brasil está em análise, entretanto, segue sendo comercializado. O fígado exerce importante função na metabolização de substâncias tóxicas, sendo o primeiro alvo dos efeitos de toxicidade. A fase peripuberal é de grande importância no desenvolvimento, sendo suscetível à ação de agentes tóxicos. Com isso, o objetivo deste estudo foi analisar se a exposição a baixas doses de clorpirifós durante a fase peripuberal, causa alterações hepáticas em ratos Wistar. Foram utilizados 18 ratos com 25 dias de idade. Os animais foram distribuídos igualmente em 3 grupos (n=6 grupo), sendo: GC, G5 e G15. Os animais do grupo GC receberam doses diárias do veículo (óleo de milho) via gavagem, enquanto os grupos G5 e G15 receberam via gavagem doses diárias de 5 e 15 mg/kg de clorpirifós diluído no veículo, respectivamente. O período do experimento ocorreu durante 40 dias consecutivos. Ao final deste período, os animais foram pesados, anestesiados e eutanasiados, o sangue foi coletado e as amostras do plasma destinadas aos ensaios bioquímicos (enzimas hepáticas e albumina). O fígado dos animais foi retirado, pesado, seccionado, fixado e destinado às avaliações histopatológicas de esteatose, inflamação lobular, degeneração hidrópica e fibrose, para determinação da ocorrência de Doença Hepática Esteatótica Associada à Disfunção Metabólica (MALSD). Não foram encontradas diferenças no peso corpóreo, consumo alimentar e concentração glicêmica dos animais. O consumo hídrico foi reduzido nos animais que receberam doses de 15 mg/kg. Nos achados histológicos, foi encontrado grau leve de esteatose no grupo G15, ausência de focos inflamatórios e degeneração hidrópica em todos os grupos experimentais, indicando uma incerteza para manifestação de MALSD nos animais administrados com doses de 15 mg/kg. Nos resultados bioquímicos não foram encontradas diferenças na concentração plasmática das enzimas ALT e AST, e houve aumento significativo na concentração plasmática de albumina nos animais que receberam doses de 5 e 15mg/kg de clorpirifós. Conclui-se que a administração de baixas doses de clorpirifós causa toxicidade hepática leve, mantendo a arquitetura tecidual parcialmente preservada em ratos machos peripuberis. Os resultados apresentados para as concentrações plasmáticas de albumina foram inconclusivos, porém indicam que pode haver comprometimento da função hepática, mesmo em resposta a baixas doses do inseticida.

Palavras-chaves: hepatotoxicidade; doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica; organofosforados

ABSTRACT

Chlorpyrifos is an insecticide belonging to the class of organophosphates, the group with the highest incidence of poisoning. The use of chlorpyrifos has been banned in several European Union countries, and its regulation in Brazil is under analysis, but it is still being marketed. The liver plays an important role in metabolizing toxic substances and is the first target of toxic effects. The peripubertal phase is of great importance in development and is susceptible to the action of toxic agents. The aim of this study was to analyze whether exposure to low doses of chlorpyrifos during the peripubertal phase causes liver changes in Wistar rats. Eighteen 25-day-old rats were used. The animals were equally distributed into 3 groups (n=6): GC, G5 and G15. The animals in the GC group received daily doses of the vehicle (corn oil) by gavage, while the G5 and G15 groups received daily doses of 5 and 15 mg/kg of chlorpyrifos diluted in the vehicle, respectively. The experiment lasted 40 consecutive days. At the end of this period, the animals were weighed, anaesthetized and euthanized, blood was collected and plasma samples were used for biochemical tests (liver enzymes and albumin). The animals' livers were removed, weighed, sectioned, fixed and used for histopathological assessments of steatosis, lobular inflammation, hydropic degeneration and fibrosis, to determine whether the occurrence of Steatotic Liver Disease Associated with Metabolic Dysfunction (MALSD). No differences were found in the animals' body weight, food consumption or glycemic concentration. Water consumption was reduced in the animals receiving doses of 15 mg/kg. In the histological findings, a mild degree of steatosis was found in the G15 group, as well as the absence of inflammatory foci and hydropic degeneration in all the experimental groups, indicating an uncertainty for the manifestation of MALSD in the animals administered doses of 15 mg/kg. In the biochemical results, no differences were found in the plasma concentration of the enzymes ALT and AST, and there was a significant increase in the plasma concentration of albumin in the animals that received doses of 5 and 15mg/kg of chlorpyrifos. It is concluded that the administration of low doses of chlorpyrifos causes mild liver toxicity, keeping the tissue architecture partially preserved in peripubertal male rats. The results presented for plasma albumin concentrations were inconclusive, but indicate that liver function may be compromised, even in response to low doses of the insecticide.

Keywords: hepatotoxicity; steatotic liver disease associated with metabolic dysfunction; organophosphates;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Agrotóxicos: Panorama geral, histórico e classificação.....	14
2.2 Organofosforados: Estrutura e mecanismo de ação.....	16
2.3 Fígado.....	17
2.3.2 Toxicidade.....	20
2.4 Clorpirifós e toxicidade.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Protocolo experimental.....	23
3.2 Coleta dos materiais.....	24
3.3 Análise histopatológica.....	24
3.3.1 Análise semiquantitativa.....	24
3.3.2 Tricrômico de Masson para Quantificação de Colágeno.....	25
3.4 Análise bioquímica.....	26
3.5 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Dados morfométricos e alimentares.....	27
4.2 Características histopatológicas.....	27
4.3. Características histoquímicas.....	29
4.4. Avaliação de lesão e função hepática.....	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	46

1. INTRODUÇÃO

A atividade agrícola é uma prática de grande importância para a humanidade, realizada desde o início das primeiras civilizações para garantir o suprimento alimentar. Atualmente, a atividade também é exercida para contribuir no desenvolvimento socioeconômico. (Vieira; Carvalho; Zuliani, 2018). Durante o século XX, o aumento populacional e os avanços tecnológicos desencadeou em uma elevada produção agrícola, com desenvolvimento de compostos químicos para promover a eficácia e alta produção nas lavouras (Campagnolla; Macêdo, 2022).

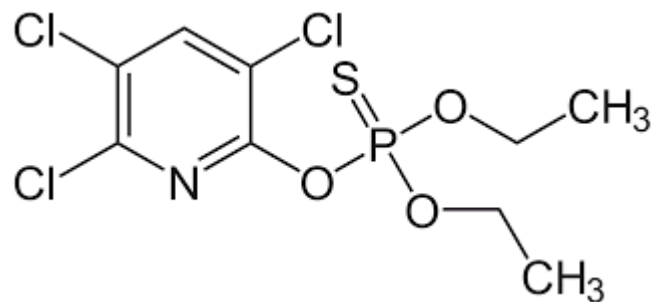
O uso intensivo de agrotóxicos tem gerado reflexões e discussões a respeito de seu uso, principalmente em países subdesenvolvidos. De acordo com um relatório publicado pela Organização Não Governamental (ONG) *Public Eyes*, países com baixo desenvolvimento carecem de fiscalizações e regulamentações sobre o uso de compostos químicos, aumentando o uso de agrotóxicos, culminando em prejuízos na saúde da população. Os problemas vão desde a contaminação no solo, na água, no ar, e nos alimentos, ocasionando danos à saúde da população, e principalmente em trabalhadores rurais que são expostos diariamente aos agrotóxicos (Gaberel; Hoikenss, 2019).

Uma das classes de agrotóxicos mais utilizadas na agricultura é a dos organofosforados, usada no controle de uma grande variedade de pragas. Os organofosforados foram inseridos no mercado como uma proposta para a substituição dos organoclorados, por apresentarem melhor taxa de degradação no ambiente, além de grande eficácia como inseticida (Moura *et al.*, 2020) . Apesar de desempenhar eficiência nas lavouras, também está relacionado à maioria dos casos de intoxicação por agrotóxicos (Toledo; Garcia, 2021).

Entre as moléculas pertencentes ao grupo dos organofosforados, está o clorpirifós (O,O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-ol fosforotioato) (Figura 1), utilizado como inseticida, formicida e acaricida. No Brasil, sua aplicação é principalmente nos cultivos de algodão, soja, café, banana, batata, milho, trigo, citros, entre outros, fazendo-se presente na produção da maioria dos alimentos. Dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Ambientais (IBAMA), relatam que o consumo de clorpirifós no Brasil entre 2014 e 2019 foi de aproximadamente 47 mil toneladas,

além de ocupar a 10ª posição da molécula mais comercializada no país (ANVISA, 2018; ANVISA, 2019; IBAMA, 2020). O Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA) relatou dados da avaliação de 4.616 amostras de alimentos entre 2017 e 2018, das quais 1.072 apresentaram valores insatisfatórios com detecção de irregular de agrotóxicos. Dessas amostras, o clorpirifós foi identificado em 5,3% onde 4,6% eram irregulares, sendo utilizado em lavouras e produtos sem autorização de uso (ANVISA, 2019).

Figura 1 - Estrutura química do inseticida Clorpirifós.



Fonte: Wikipedia

O clorpirifós é considerado como uma molécula altamente tóxica para o meio ambiente (Classificação ambiental II), devido sua extensa acumulação no solo, e moderadamente ou altamente tóxico para a saúde, dependendo da formulação utilizada, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) . Contém uma baixa solubilidade na água, e é solúvel em alguns solventes orgânicos. Sua lipossolubilidade está relacionada com a presença de Cloro (Cl) em sua composição (Fournier *et al.*, 1993; Smegal, 2000). No solo, sua degradação é lenta devido características apolares, com uma meia vida de 30-120 dias ou mais, dependendo das condições do pH, do ecossistema, e da via de aplicação (John; Shaik, 2015).

A absorção do clorpirifós no organismo pode ser pela via oral, através da ingestão de alimentos com resquícios do composto, pelas vias respiratórias por meio dos aerossóis e poeira, e pela via cutânea, sendo os trabalhadores rurais os mais expostos (Geer *et al.*, 2004; Testai; Buratti; Di Consiglio, 2010). O contato com alimentos e a água com resíduos de clorpirifós é a principal via de contaminação. Após ser ingerido, é absorvido no trato gastrointestinal, onde irá para a corrente sanguínea.

Em humanos e ratos, sua metabolização é realizada pelo fígado, por meio da família dos citocromos P450, formando o produto clorpirifós-oxon, um metabólito com maior poder de toxicidade do que a forma original. Por ser instável, o produto é hidrolisado em 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), além de formar outros produtos como o TCP e dietil fosfato (DETP) (Sultatos, 1984; Usepa 2014).

A via de excreção do clorpirifós é através da urina e das fezes, sendo a urina o principal meio de excreção em humanos (70%) e em ratos (84%). O clorpirifós em sua forma original não é encontrado na urina, sendo sua forma TCP presente na eliminação. O tempo de meia vida de eliminação do TCP na urina é de aproximadamente 27h quando ingerido via oral (Usepa, 2014).

O órgão responsável pela metabolização do clorpirifós é o fígado, sendo o primeiro alvo dos efeitos de toxicidade no organismo. Um estudo realizado com ratos administrados com doses de 6,75 mg/kg de clorpirifós e óleo de milho, demonstrou o acúmulo de clorpirifós neste órgão, e alterações nos hormônios femininos, prejudicando o ciclo estral de ratas (Kamalesh *et al.*, 2014). Outro estudo publicado por Ismail (2021), demonstrou que trabalhadores expostos ao clorpirifós durante a adolescência, apresentaram alterações na concentração plasmática das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), marcadores de lesão hepática. Em camundongos machos adultos, a administração de doses de 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1,0 mg/kg, e 10mg/kg durante 12 semanas indicaram a presença de inflamação hepática (Zhang *et al.*, 2021).

Assim com os demais organofosforados, o clorpirifós tem ação na inibição da acetilcolinesterase (AChE), levando ao acúmulo de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Nos insetos, o resultado da inibição da AChE causa a paralisia das junções neuromusculares, e conseqüentemente, a morte (Founier *et al.*, 1993). Em humanos, a intoxicação por clorpirifós apresenta quadros neurológicos, respiratórios e cardiovasculares, com sintomas de náuseas, vômitos, tontura, confusão, bradicardia, e broncoconstrição. Em casos de alta toxicidade, pode levar a paralisção e a morte. A toxicidade causada por agrotóxicos, como os organofosforados, também está relacionada com o aparecimento de câncer e doenças neurológicas (Meshram *et al.*, 2014).

A comercialização de clorpirifós é alvo de debate entre os governos de diversos países. Em 2020, a União Europeia não renovou a licença para sua comercialização, proibindo a venda de inseticidas com essa substância (Europe Commission, 2020). A Austrália também proibiu o uso de clorpirifós em hortas caseiras e para uso doméstico em 2020, e segue com o processo de reavaliação para as demais funções agrícolas (APVMA, 2020). Em 2021, os Estados Unidos também banuiu o uso de clorpirifós (United States Government, 2023). No Egito, desde 2022 o clorpirifós passou a ser utilizado apenas nas culturas de algodão, e contra gafanhoto e cupins, sendo proibido nas demais lavouras (Echa, 2022). No Brasil, sua utilização passou a ser discutida, passando por processos de reavaliação entretanto, segue sendo comercializada (ANVISA, 2022). O motivo pela proibição de clorpirifós em determinados países é devido à falta de informações sobre doses seguras, e os níveis de toxicidade.

Na literatura, há diversos estudos sobre a toxicidade de clorpirifós em ratos adultos e neonatos, porém, há poucas informações a respeito da fase peripuberal. O período peripuberal é de grande importância para o desenvolvimento, pois é durante essa fase que ocorre o término de maturações biológicas (Perobelli, 2014). Por esse motivo, faz-se necessário estudos a respeito do assunto, a fim de verificar se a exposição ao clorpirifós na adolescência leva a alterações biológicas.

Considerando a hipótese testada de que “baixas doses de clorpirifós causam alterações no fígado de ratos durante a peripuberdade”, o objetivo geral deste trabalho foi analisar parâmetros histopatológicos e bioquímicos neste órgão em ratos após administração de doses de 5 mg/kg e 15 mg/kg do inseticida clorpirifós durante o período peripuberal. Como objetivos específicos, ficou estabelecido: determinar as características histopatológicas do fígado, e avaliar os marcadores de lesão e função hepática de ratos submetidos a baixas doses de clorpirifós no período peripuberal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agrotóxicos: Panorama geral, histórico e classificação

A revolução verde originou-se como resposta a grande preocupação pela produção de alimentos durante o século XX, impactando significativamente na agricultura. O movimento trouxe o desenvolvimento de técnicas e um grande investimento em maquinários agrícolas, sementes geneticamente modificadas, e a introdução de insumos químicos nos plantios, como os agrotóxicos, aumentando a eficiência e produção alimentar (Nadkarni; Conway; Barbier, 1991).

Os agrotóxicos são compostos químicos utilizados na agricultura, com a finalidade do controle de pragas e outras substâncias. Embora tenha sido criado para melhorar a produtividade nas lavouras, o uso exagerado dos compostos estão associados a casos de problemas de saúde e ambientais (Food and agriculture Organization of the United Nations, 2016).

A classificação dos agrotóxicos podem ser de formas variadas, classificados de acordo com sua ação, podendo ser pesticida (agem no controle de pragas em geral), herbicida (controle de ervas- daninhas), acaricidas (controle de ácaros), fungicidas (controle de fungos), e inseticidas (controle de insetos). Também são classificados de acordo com seu grupo químico, podendo ser organofosforados, organoclorados, clorofosforados, piretroides e carbamatos (Conway, 2003). Os agrotóxicos também recebem classificação de acordo com seu potencial tóxico, podendo ser classificados como extremamente tóxicos, altamente tóxicos, moderadamente tóxicos, pouco tóxicos e relativamente inofensivos. A classificação toxicológica e a regulamentação dos agrotóxicos no Brasil é de responsabilidade da ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde (MS). Outros órgãos também são responsáveis pela regulamentação, como o IBAMA, atuando na análise de toxicidade ambiental, e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pela avaliação de segurança e eficácia nas lavouras (Brasil, 1989; Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento, 2012).

No Brasil, a utilização de agrotóxicos iniciou nos anos 90, e desde 2008, lidera o ranking mundial de maior consumidor de agrotóxicos, também sendo considerado um dos maiores produtores agrícolas do mundo (Grigori, 2019). Dados

do Instituto Nacional de Câncer (2018) mostram que o mercado brasileiro de agrotóxicos aumentou 190% nos últimos 10 anos. O alto consumo de agrotóxicos também é justificado pelas políticas que incentivam o agronegócio como um grande destaque na economia do Brasil (Serra *et al.*, 2016).

De acordo com Moreira e colaboradores (2002), as ações causadas pela utilização de agrotóxicos podem ser de diferentes vias: ocupacional, quando em contato direto com os trabalhadores rurais; ambiental, quando a contaminação atinge o solo, água e atmosfera; e alimentar, quando ingerido pela população por meio dos alimentos.

Os impactos resultantes do uso de agrotóxicos no Brasil e no mundo levam a discussões e reflexões acerca dos riscos à saúde e os prejuízos ambientais causados pelo alto consumo. No Brasil, estima-se que de 2013 até 2022 foram notificados 124.295 casos de intoxicação exógena, sendo definido pela manifestação clínica e/ou laboratorial devido à exposição de substâncias químicas (Ministério da Saúde, 2023). Ao analisar a associação de agrotóxicos com trabalhadores expostos, 31 pesticidas foram relacionados com um maior potencial no desenvolvimento de câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de bexiga, e leucemia (Varghese *et al.*, 2020). Em mulheres, os agrotóxicos também estão associados ao desenvolvimento de câncer de mama. com alteração na expressão dos receptores estrogênicos, aumento de ductos com hiperplasias, e diminuição dos níveis séricos de progesterona e estradiol (Yang; Lee; Park, 2020).

No meio ambiente, os impactos causados pela utilização em larga escala de agrotóxicos têm sido associados à diminuição de organismos que não são alvos específicos dos compostos químicos. Estudos demonstraram efeitos nocivos causados por agrotóxicos sobre ácaros predadores, ocasionando alterações no equilíbrio biológico (Costa *et al.*, 2012; Santos; Gravena, 1997). A redução das populações de insetos polinizadores também é um fator preocupante, podendo causar alterações em ecossistemas e redução na reprodução de plantas, culminando consequentemente na perda da biodiversidade (Kremen, 2004). A contaminação da água ocasionada pelas altas concentrações de agrotóxicos depositadas no ambiente altera o equilíbrio de ecossistemas aquáticos, além de causar toxicidade em animais. Um estudo apresentado por Ugurlu e colaboradores (2015), demonstrou efeitos de

toxicidade no tecido branquial do crustáceo *Gammarus kischineffensis* causados pela exposição de tiametoxama, relatando a presença de vacuolização e infiltração homeostática. Os malefícios causados pela contaminação por agrotóxicos na água vão além das alterações de populações e ecossistemas aquáticos, podendo gerar riscos à saúde devido à exposição humana a longo prazo a resíduos encontrados na água (Moreira *et al.*, 2012)

Os sintomas causados pela intoxicação por agrotóxicos vão desde náuseas, vômitos, diarreias, alterações respiratórias, neurológicas, endócrinas, e até casos de câncer. Uma outra problemática, são casos assintomáticos, que levam anos para serem descobertos (Calvert, 2008).

2.2 Organofosforados: Estrutura e mecanismo de ação

Entre as classes de agrotóxicos com maiores casos de intoxicação, estão os organofosforados. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo sofrem por intoxicação relacionadas aos pesticidas durante todos os anos, e entre os resíduos desses compostos químicos, os organofosforados representam mais de 50% dos casos (George *et al.*, 2014).

Os organofosforados são um grupo de compostos químicos derivados do ácido fosfórico, e são altamente lipossolúveis. Embora tenham um alto poder de toxicidade, são amplamente utilizados no mundo devido seu elevado potencial pesticida, e degradação no ambiente (Kumar, 2011; Faria, 2007). Em sua maior parte, os organofosforados não apresentam toxicidade em sua forma original, mas sim, quando passam pela biotransformação nos organismos, gerando metabólitos tóxicos. (Mostafalou; Abdollahi, 2017).

Os organofosforados agem principalmente na inibição irreversível das enzimas colinérgicas AChE e butilcolinesterase (BuchE). A acetilcolinesterase está relacionada com os nervos e músculos estriados, sendo localizada nas sinapses do sistema nervoso central, parassimpático e também nos eritrócitos. É responsável pela degradação da ACh, um neurotransmissor que desempenha um papel importante nos impulsos nervosos. A BuchE é encontrada no plasma e em determinados tecidos. Sua função também está relacionada à degradação da ACh (Delfino; Ribeiro; Figueiroa-Villar, 2009).

Uma vez que a ACh é liberada na fenda sináptica, ocorre sua ligação aos receptores nicotínicos e muscarínicos. Por sua vez, a AChE age interrompendo essa ligação, hidrolisando o ACh em colina e acetato. Os receptores colinérgicos muscarínicos atuam principalmente no sistema nervoso parassimpático, desempenhando funções na regulação da frequência cardíaca e no relaxamento dos vasos sanguíneos. Já os nicotínicos, são encontrados no sistema nervoso central, envolvidos na transmissão sináptica entre neurônios, e encontrados também no sistema nervoso periférico, atuando nas junções neuromusculares, e na transmissão de impulsos nervosos para a musculatura esquelética. Em casos de desregulação do sistema colinérgico, pode resultar em quadros de intoxicação, com sintomas neurológicos, cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, entre outros (Ventura *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 1996).

2.3 Fígado

2.3.1. Morfofisiologia

O fígado é a maior glândula do corpo, pertencente ao sistema digestório. Também é considerado o segundo maior órgão do organismo, ocupando cerca de 2 a 5% do peso corporal médio. Em humanos, sua média de peso é de 1,5kg. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma (Bangru; Kalsotra, 2020).

É um órgão maciço e liso, revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, e sua estrutura está dividida em lóbulos, sendo a parte morfofuncional do órgão. Em humanos, os lóbulos se dividem em 4 partes, sendo eles: lobo direito, lobo esquerdo, lobo quadrado, e lobo caudado. Sua parte superior está ligada ao diafragma, enquanto a inferior, ao abdômen, estômago e outras vísceras. A ligação do fígado às demais regiões do organismo se dá por meio de porções do peritônio, denominadas de ligamentos. Os ligamentos são classificados como ligamento falciforme, que une o fígado ao abdomen, separando os lóbulos esquerdo e direito; ligamento coronário; ligamento triangular esquerdo e direito; e ligamento redondo, que é remanescente do cordão umbilical (Bismuth, 1982)

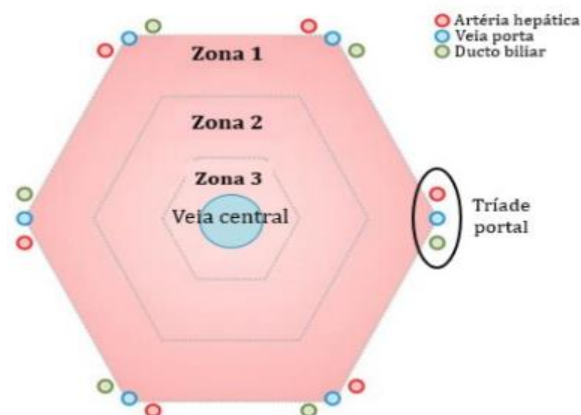
Diversas células são encontradas no fígado. Estão presentes os hepatócitos, que correspondentes até 80% das células do fígado, células endoteliais,

colangiócitos, células endoteliais sinusoidais, e células pertencentes ao sistema imune, com predominância de células *natural killer* (NK), e macrófagos denominados células de Kupffer (CK) (SI-Tayeb; Lemaigre; Duncan, 2010).

A estrutura de cada lobo forma um arranjo hexagonal, embora em humanos essa visualização não seja tão evidente, disposta em cordões de hepatócitos, envoltos em redes capilares sinusoides. Ao meio do hexágono, está presente a veia centrolobular, e nas extremidades o espaço porta (tríade portal), formada pela veia porta, artéria hepática e ducto biliar (Huppert; Iwafuchi; 2019).

O fígado recebe grande parte da circulação sistêmica do organismo. A veia porta irá receber sangue venoso através da circulação portal, que irá se misturar com o sangue arterial, rico em oxigênio. As ramificações do espaço porta estendem-se até os sinusoides, que transportará o sangue até a veia centrolobular, ocorrendo então a desoxigenação. Devido a diferença do sangue que circula no fígado, os hepatócitos terão funções diferentes de acordo com a sua localização, dessa forma, o lóbulo pode ser caracterizado em 3 zonas metabólicas, como observado na Figura 2. Os hepatócitos localizados próximo ao espaço porta tem contato com o sangue mais oxigenado, e com grande quantidade de nutrientes e outras substâncias absorvidas no intestino, essa região é denominada zona 1. Os hepatócitos dispostos próximo a veia central recebem sangue menos oxigenado, estes fazem parte da zona 3. A zona 2 é uma zona intermediária entre as demais (Freitas-lobes *et al.*, 2017; Trefts; Ganon; Wasserman, 2017).

Figura 2 - Zonas metabólicas do fígado



Fonte: Adaptado de Trefts et al, 2017.

Os hepatócitos da Zona 1 participam de diversos mecanismos de metabolização. Estão envolvidos em atividades de gliconeogênese, síntese de ureia, e metabolismo energético de ácidos graxos. Já os da Zona 3, estão envolvidos com a glicólise, glicogênese, e no metabolismo de xenobióticos, sendo prejudicados em atividades com baixa oxigenação (Buzato; Arana; Carvalho, 2016).

O fígado está envolvido com diversas atividades exócrinas e endócrinas, justificando sua importância na homeostase do organismo. Realiza funções como o armazenamento de glicogênio, ácidos graxos e triglicerídeos, participa do metabolismo e síntese proteica, como a albumina e proteínas da coagulação, participa da síntese biliar, e está associado a biotransformação de substâncias (SI-Tayeb; Lemaigre; Duncan, 2010).

Seu papel na metabolização é de grande importância na desintoxicação de substâncias tóxicas e xenobióticos, gerando produtos metabolizados de fácil excreção. O processo de metabolização ocorre em diferentes etapas: *biotransformação, conjugação e excreção*. A fase de biotransformação ocorre nos hepatócitos, e inclui a participação da família de enzimas citocromo P450 (CYPs) que realizam reações de redução ou oxidação, resultando em metabólitos hidrossolúveis. Durante a conjugação, os metabólitos são conjugados com outras moléculas, tornando-se mais hidrossolúveis e passíveis de excreção. Na última fase, os metabólitos conjugados são excretados pela bile, ou transportados para a circulação sanguínea (Almazroo; Miah; Venkataramanan, 2017).

2.3.2 Toxicidade

Por ser um órgão extremamente vascularizado desempenha importante papel na biotransformação e metabolismo de xenobióticos, assim, fica mais exposto a substâncias tóxicas, ocasionando alterações nos marcadores de função e lesão hepática. O acúmulo e a presença de células do sistema imune são indicativos de alterações teciduais causadas por patógenos, sendo os achados mais comuns as CK, NK, células dendríticas, células T, e outros macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Lasram *et al.*, 2014).

As CK são comumente encontradas no endotélio sinusoidal da região periportal do fígado, participando da defesa contra a presença de patógenos. Na presença de lesão, são capazes de liberar citocinas que desencadeiam o processo inflamatório, além do recrutamento de outros macrófagos desencadeando a ativação do sistema complemento (Kubes; Jenne, 2018). As células NK estão distribuídas no parênquima hepático, participando da defesa contra células tumorais, hepatócitos infectados, e na regeneração tecidual. As células dendríticas também contribuem na defesa, promovendo o recrutamento de leucócitos, e a ativação do sistema complemento gerando respostas imunológicas inatas (Bogdanos; Gao; Gershwin, 2013).

Por ser um órgão com grande atividade metabólica e de desintoxicação, em casos de intoxicação, pode ocorrer o desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em alterações teciduais e no funcionamento das células. Exemplos de agentes pró-oxidantes são os radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), que apresentam uma alta reatividade, atuando como mensageiros secundários em atividades de transdução causada por respostas a citocininas, desempenhando papel importante na regulação de processos biológicos (Hussain *et al.*, 2016; Jones, 2008).

Em situações de desequilíbrio, o aumento excessivo de EROs pode levar a oxidação de proteínas, podendo causar danos na estrutura hepática, na função proteica, e alterações no metabolismo, podendo influenciar no surgimento de doença hepática esteatótica associada a disfunção metabólica (MALSD) (Videla *et al.*, 2004). A MALSD é caracterizada pelo acúmulo excessivo de ácidos graxos nos hepatócitos, causados por disfunção genética, dietas hipercalóricas, e desequilíbrio de atividades

oxidativas. O aumento de gordura nos hepatócitos também estão associados às alterações teciduais, inflamação, presença de fibrose e cirrose hepática (Bellentani, 2017).

Além de alterações do parênquima hepático, em casos de lesão também é comum encontrar alterações na concentração de enzimas transaminases hepáticas, como ALT e AST, que desempenham importantes funções no metabolismo de aminoácidos, e no ciclo da ureia. Sua elevada concentração é um importante indicador de lesão hepática (De-Jesus; Sousa; Barcelos, 2014).

2.4 Clorpirifós e toxicidade

A relação entre o clorpirifós e toxicidade é um importante fator a ser compreendido, visto que a utilização desta molécula no Brasil ainda faz se presente nos cultivos, resultando em resíduos nos alimentos e na água, que pode acarretar em danos à saúde (Britto *et al.*, 2015). Na literatura, é possível observar uma variedade de efeitos que a exposição ao clorpirifós pode causar. De acordo com a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA), o clorpirifós pode ser tóxico quando ingerido, e nocivo em contato com a pele (Efsa, 2019).

No sistema nervoso, o clorpirifós pode acarretar em danos no funcionamento cerebral, induzindo em alterações na proliferação neuronal, e reduzindo a síntese de DNA e proteína (Prieto, 2013). Em um trabalho, a exposição ao clorpirifós em embriões de ratos em cultura, causou anomalias mitóticas e apoptose na fase de fechamento do tubo neural (Roy *et al.*, 1998).

A exposição de clorpirifós também está relacionada com alterações no sistema reprodutor. Um estudo onde ratos adultos foram expostos a doses de 1 mg/kg de clorpirifós durante 60 dias, apresentou redução do peso dos órgãos reprodutores, na motilidade espermática, e anormalidades dos espermatozoides (Khalaf *et al.*, 2022). Nos rins, a exposição de clorpirifós é capaz de ocasionar lesões teciduais, com alterações na cápsula de Bowman, congestão vascular, dilatação tubular, e presença de infiltrados inflamatórios (Rekha; Raina; Hamid, 2013).

Alterações metabólicas também são encontradas devido à exposição ao clorpirifós, ocorrendo interferências das vias glicolíticas, resistência insulínicas, alterações do perfil lipídico e enzimas pancreáticas, além de alterações na estrutura

hepática. (Peris-Sampedro *et al.*, 2015; Blanco *et al.*, 2020; Liang *et al.*, Zhang *et al.*, 2021;).

Similar aos trabalhos relatados, em um estudo utilizando peixes expostos a diferentes concentrações de clorpirifós durante 28 dias, observou-se lesões no fígado, com presença de congestão sinusoidal, infiltrado inflamatório, e grânulos citoplasmáticos eosinófilos, além da morte de animais na primeira semana de exposição (Chaparro *et al.*, 2013).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (OF. CIRC. CEUA Nº 034/2021), conforme Anexo A. Os cuidados e manuseio dos animais foram conduzidos seguindo os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Animais Experimentação (CONCEA).

3.1 Protocolo experimental

Foram utilizados 18 ratos machos da linhagem Wistar, com idade inicial de 22 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram aclimatados no Biotério do Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução da UEL, durante 3 dias que antecederam o início do período experimental.

No 25º dia pós-natal (DPN), os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=6 animais/grupo) denominados: grupo controle (C), grupo clorpirifós 5 mg/kg (G5) e grupo clorpirifós 15 mg/kg (G15). O GC recebeu apenas o veículo (óleo de milho) em igual volume. Os animais do G5 receberam diariamente clorpirifós na dose de 5 mg/kg via gavagem, enquanto o grupo G15 recebeu clorpirifós na dose de 15 mg/kg, diluídos em óleo de milho. Essas doses foram baseadas em estudos de exposição ao clorpirifós. Como variação da menor dose de efeito adverso observado (LOAEL) para exposição do sistema neurológico é de 3 a 15 mg/kg, as doses foram definidas a fim de desenvolver um modelo toxicológico assintomático, sem sinais de intoxicação colinérgica (Breslin *et al.*, 1996). O Clorpirifós utilizado foi proveniente da *Sumitomo Chemical* (Klorpan 480 EC [48%], São Paulo, Brasil).

O período de tratamento ocorreu entre o 25º e o 65º DPN, que correspondem ao período peripuberal dos ratos Wistar (Clegg, 1960; Ojeda *et al.*, 1980). Os animais foram acomodados em gaiolas contendo 3 animais por gaiola e receberam água e ração da marca *ad libitum*. O consumo de água e ração foram aferidos a cada três dias durante todo período experimental, além do peso dos animais, que foram verificados diariamente. Os animais foram avaliados diariamente

em busca de sinais de toxicidade colinérgica. O biotério foi mantido em condições de temperatura constante ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob um ciclo claro-escuro de 12h, iniciando-se a fase clara às 7h da manhã.

3.2 Coleta dos materiais

No 41º dia experimental, os ratos (DPN 65) foram mantidos em jejum de 12 horas antes da eutanásia. No momento da eutanásia, os animais foram pesados e anestesiados com a combinação de cetamina 75 mg/kg p.c. (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) e xilazina 10 mg/kg p.c. (Anasedan®, Paulínia, Brasil) e realizado a eutanásia por exsanguinação. O sangue foi coletado em seringas heparinizadas (Hemofol®, São Paulo, Brasil), e centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos, para separação do plasma, posteriormente armazenado a -20°C .

Após a dissecação de cada animal, o fígado foi retirado, pesado em balança analítica de precisão, seccionado, fixado em solução de Bouin aquoso por 48 horas e destinado ao Laboratório de Análise de Histopatológica (LAHip) do Departamento de Histologia da UEL, onde foi realizado o processamento histológico de rotina para inclusão em parafina (Anexo B) histológica e armazenados até a microtomia.

3.3 Análise histopatológica

Em micrótomos semi automáticos, foram obtidos cortes histológicos não seriados, com 5 μm de espessura, destinados aos procedimentos descritos a seguir.

3.3.1 Análise semiquantitativa

Para a identificação das características histológicas hepáticas, dois cortes histológicos não seriados por animal foram corados com hematoxilina e eosina (HE) (Anexo C), observados e fotografados em um sistema de captura de imagens acoplado a um fotomicroscópio (Motic, Xiamen, China) e as imagens foram analisadas no *software ImageJ*.

Nestes cortes histológicos corados com HE, em aumento de 400x, foram obtidas 10 imagens aleatórias da região adjacente à veia centrolobular, e 10 imagens adjacentes ao espaço porta. A análise histopatológica semiquantitativa foi realizada considerando os graus de esteatose, inflamação lobular, e degeneração hidrópica

(Tabela 1) para determinação de doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica - MALSD (Tabela 2) (Levene; Goldin, 2012).

Tabela 1 - Sistema de Pontuação das Alterações Teciduais Hepática

Esteatose (0-3)	Inflamação Lobular (0-3)	Degeneração Hidrópica (0-2)
0: <5%	0: Nenhum	0: Nenhum
1: 5-33%	1: <2 focos/x 20 campos	1: leve, poucos
2: 34-66%	2: 2-4 focos/x 20 campos	2: moderado, muitos
3: >66%	3: >4 focos/x 20 campos	
Espaço aproximado (%) da imagem ocupado por esteatose, em qualquer grau de alteração.	Número de focos de infiltrado nos campos capturados, independente do tamanho.	Espaço aproximado (%) da imagem ocupado por hepatócitos alterados.

Tabela 2 - Escore dado pela soma dos graus de esteatose, degeneração hidrópica e infiltrado.

Pontuação de Atividade MALSD: 0-8
0-2 ausência de MALSD
3-4 incerto para MALSD
5-8 confirmado para MALSD

3.3.2 *Tricrômico de Masson para Quantificação de Colágeno*

Para análise histoquímica, foi utilizado a coloração de tricrômico de Masson (Anexo D) para determinação de fibrose, através da detecção de colágeno total no fígado. Todas as análises semi-qualitativas foram conduzidas de forma cega. Para a avaliação, foram registradas 10 imagens do parênquima hepático, em aumento de 100x.

A análise das fibras de colágeno total presentes no fígado foi conduzida conforme protocolo adaptado de Levene; Goldin 2012 (Tabela 3).

Tabela 3 - Estadiamento de fibrose

Pontuação	Definição
0	Nenhum
1	Periportal ou perisinusoidal
1A	Leve - perisinusoidal e centrolobular (zona 3)
1B	Moderado - perisinusoidal e centrolobular (zona 3)
1C	Portal e periportal
2	Portal, periportal e perisinusoidal
3	Pontes de fibrose entre os vasos
4	Cirrose

3.4 Análise bioquímica

Para verificar a ocorrência de lesão hepática, as amostras de plasma foram processadas para determinar as concentrações de aspartato aminotransferase (ALT) e alanina aminotransferase (AST), usando kits comerciais cinéticos (Labtest® Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil) e seguindo as instruções do fabricante. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro em 340 nm (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL e os resultados foram expressos como U/L de ALT e AST plasmático.

Para avaliação quantitativa da albumina plasmática, kit comercial (Vida Bioctenologia LTDA, Belo Horizonte, MG, Brasil) foi utilizado seguindo as instruções do fabricante. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro em 620 nm (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific) do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL e os resultados foram expressos como g/dL.

3.5 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada usando teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre as médias foi realizada por análise de variância (ANOVA de uma via), com pós-teste de Dunnet. Em distribuição não paramétrica, a comparação dos

dados foi realizada por teste de Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dados morfométricos e alimentares

Conforme observado na Tabela 4, não foram encontradas diferenças entre o peso corpóreo inicial e final, peso do fígado e consumo alimentar dos animais. No entanto, o consumo hídrico foi menor no grupo em que foi administrado 15 mg/kg de clorpirifós.

Tabela 4 - Efeitos no peso corporal, do fígado, no consumo alimentar e hídrico após a administração de baixas doses de clorpirifós em ratos no período peripuberal.

Parâmetros	Grupos		
	GC (n = 6)	G5 (n = 6)	G15 (n = 6)
Peso corpóreo inicial (g) ¹	56,500 ± 9,149	56,870 ± 7,568	52,71 ± 6,970
Peso corpóreo final (g) ¹	292,000 ± 46,370	292,60 ± 25,13	294,6 ± 19,40
Peso do fígado (g) ¹	9,694 ± 1.517	9,438 ± 1,132	9.881 ± 1.330
Consumo alimentar (g) ²	151,40 (211,60-109,40)	164,6 (219,3-112,0)	148,9 (184,4-108,4)
Consumo hídrico (ml) ²	226,0 (295,0-150,0)	220,0 (300,0-155,0)	165,0 (245,0-121,3)*

GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós. ¹Dados apresentados como média ± desvio padrão, analisados por ANOVA de uma via, pós-teste de Dunnett. ²Dados representados por mediana e intervalo interquartil, analisados por Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn, *P<0,05 em relação ao GC.

4.2 Características histopatológicas

Conforme visualizado na Tabela 5, as alterações histopatológicas estão presentes em todos os grupos. Contudo, no grupo em que foi administrado 15 mg/kg de clorpirifós, observa-se mais alterações.

Tabela 5 - Escore atribuído para avaliação das alterações histopatológicas em ratos Wistar peripuberais após a administração de clorpirifós.

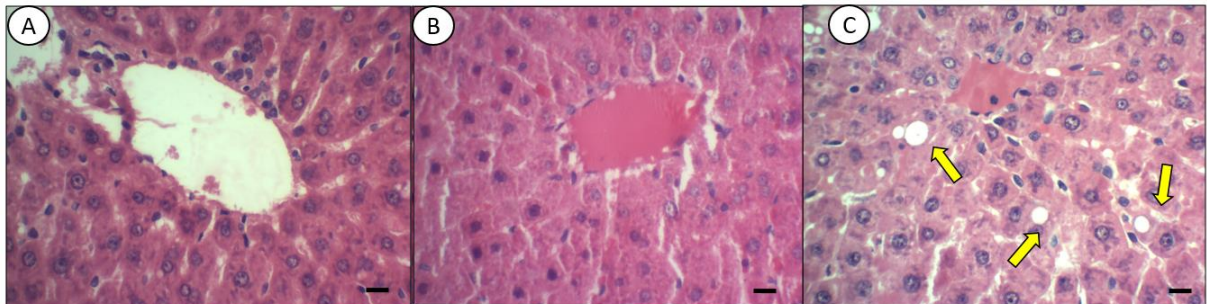
Grupos	Esteatose (0-3)	Inflamação Lobular (0-3)	Degeneração Hídrica (0-2)
Controle	0	0	2

G5	0	0	1
G15	1	0	2

Legenda: GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós. Esteatose: score 0: <33%; score 1: 5-33%. Inflamação lobular: Score 0: nenhum foco inflamatório. Degeneração Hidrópica: score 1: leve; score 2: moderado.

A coloração com HE, seguido das avaliações realizadas, demonstrou grau leve de esteatose apenas no grupo G15 (Figura 3).

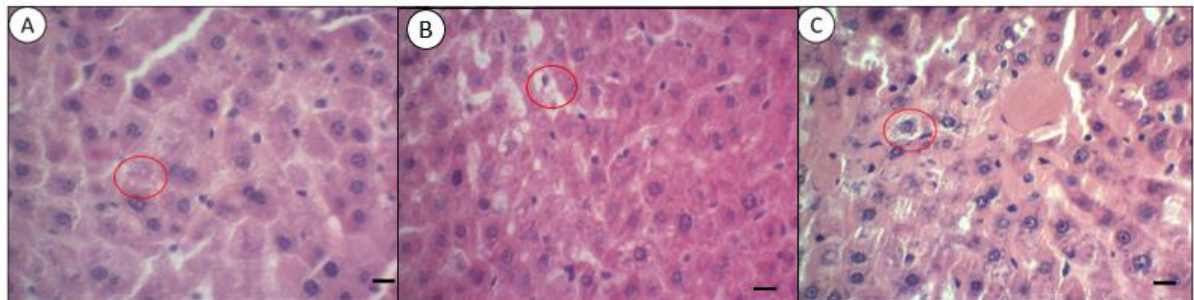
Figura 3 - Alterações histopatológicas: esteatose



Legenda: Fotomicrografias de esteatose hepática (grau I) (seta amarela), nos grupos GC (A), G5(B) e G15 (C). Coloração HE. Barra: 10 μ m. GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós

Não foram encontrados focos inflamatórios nos grupos experimentais. Já a presença de degeneração hidrópica (Figura 4) foi observada em todos os grupos.

Figura 4 - Alterações histopatológicas: degeneração hidrópica



Legenda: Fotomicrografias de degeneração hidrópica (círculo vermelho) nos hepatócitos do grupo C (A), G5 (B) e G15. Coloração HE. Barra: 10 μ m. GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós

Após análise da pontuação obtida, foi indicada incerteza de MALSD apenas nos animais do grupo G15 e ausência nos grupos GC e G5 (Tabela 6).

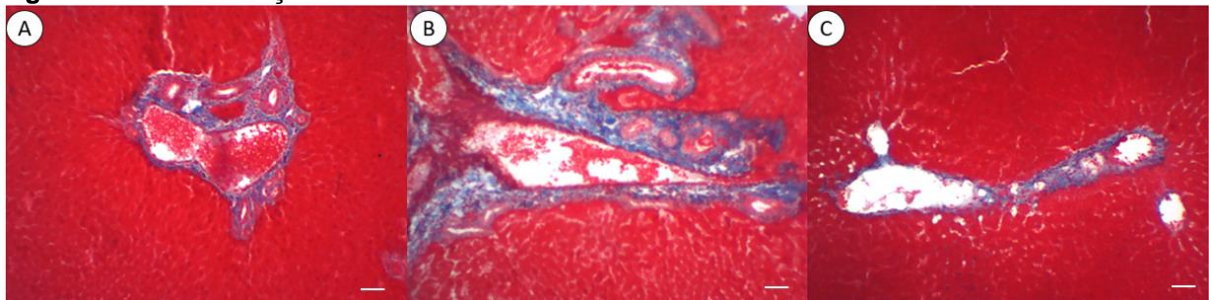
Tabela 6: Determinação de Doença Hepática Esteatótica Associada a Disfunção Metabólica (MALSD)

GRUPOS	ATIVIDADE DE MALSD
GC	Negativo
G5	Negativo
G15	Incerto

GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós.

4.3. Características histoquímicas

Foi constatada a presença de fibrose portal leve (pontuação 1) em todos os animais, independente do grupo experimental, indicando que a administração de clorpirifós não causou alterações neste parâmetro (Figura 5).

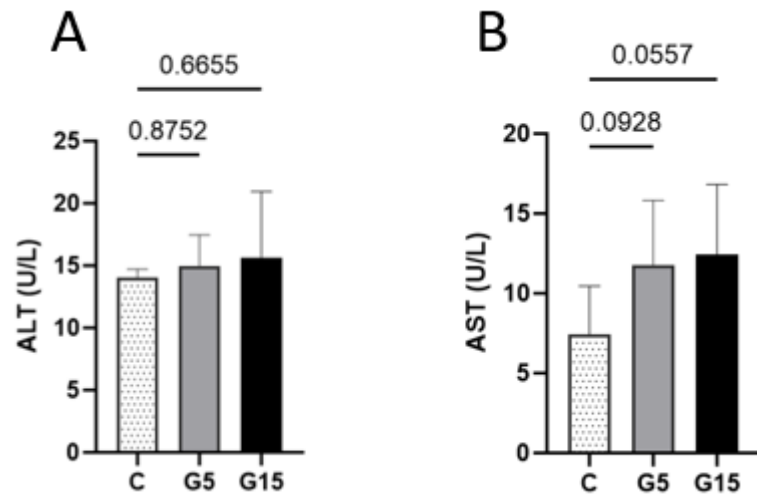
Figura 5 - Caracterização de fibrose tecidual

Legenda: Fotomicrografias da região portal com marcação de colágeno (azul), evidenciando fibrose portal leve no parênquima hepático do C (A), G5 (B) e G15. Coloração Tricrômico de Masson. Barra: 50 μ m. GC: ratos do grupo experimental que receberam o veículo (óleo de milho); G5: ratos do grupo experimental que recebeu 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg de clorpirifós

4.4. Avaliação de lesão e função hepática

Na avaliação da concentração plasmática de ALT e AST para determinação de lesão hepática não foram encontradas diferenças, conforme mostra a Figura 6.

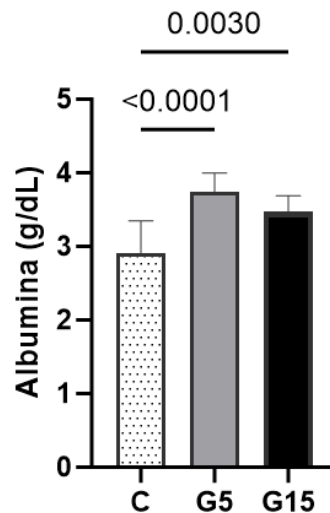
Figura 6 – Concentrações plasmáticas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) (A) e aspartato aminotransferase (AST) (B) de ratos Wistar após a administração de clorpirifós no período peripuberal.



GC: ratos do grupo controle que receberam óleo de milho; G5: ratos do grupo experimental que receberam 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg. Valores expressos como média e desvio padrão da média. ANOVA de uma via, pós-teste de Dunnett ($P < 0,05$).

Para avaliação de função hepática, foi dosada a concentração de albumina no plasma, que indicou diferença entre os grupos que receberam clorpirifós e o GC (Figura 7).

Figura 7 - Concentração plasmática de albumina em ratos Wistar após a administração de clorpirifós no período peripuberal



Legenda: GC: ratos do grupo controle que receberam óleo de milho; G5: ratos do grupo experimental que receberam 5 mg/kg de clorpirifós; G15: ratos do grupo experimental que receberam 15 mg/kg. Valores expressos como média e desvio padrão da média. ANOVA de uma via, pós-teste de Dunnett ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de baixas doses de clorpirifós pode causar alteração nas concentrações plasmáticas de albumina, na ingestão hídrica e resultar em alterações hepáticas leves, que remetem à incerteza para a manifestação de MALSD.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, observou-se que a administração de 5 e 15mg/kg de clorpirifós a ratos Wistar peripuberal não influenciou o peso corpóreo, o peso do fígado e o consumo alimentar, mantendo os valores estáveis. Os resultados condizem com um estudo encontrado na literatura, onde o peso corporal de ratas gestantes expostas a doses similares, de 5,4 mg/kg e 13,5 mg/kg de clorpirifós, via gavagem durante 21 dias não relatou diferença no peso corpóreo e consumo alimentar em comparação ao grupo controle. No mesmo estudo, a prole das ratas também não apresentou diferença no peso corporal médio no DPN 21 (Abderrahim *et al*, 2020).

Quanto à baixa ingestão hídrica observada, essa alteração pode estar relacionada a alterações hormonais, neurológicas e no equilíbrio osmótico (McKinley *et al.*, 2006). Um dos órgãos responsáveis pelo controle osmótico no organismo é o rim, que realiza processos de absorção e reabsorção da água, conferindo a manutenção hídrica e eletrolítica no organismo (Faria *et al.*, 2019). Em casos de lesão tecidual, a funcionalidade renal pode ser afetada, por meio de disfunções nos processos de reabsorção, resultando em retenção do líquido corporal e podendo influenciar na percepção da sede e desidratação (Lindeman *et al.*, 2001). A presença de lesões renais pode estar associada à toxicidade causada pela ação de compostos químicos, como os agrotóxicos (Mossini; Nishiyama; Machado; 2017). Um estudo onde foram administradas doses de 10 mg/kg de clorpirifós e 50 mg/kg de clorpirifós + fungicida carbendazim (CBZ) em ratas, via gavagem durante 7 dias, foram verificadas alterações nos níveis de ureia e creatinina e teciduais, com presença de infiltrados inflamatórios renais em ambos grupos, e presença de degeneração hídrica nos animais que receberam ambos os compostos. Neste estudo citado, embora não haja dados sobre a ingestão hídrica, comprova-se que a exposição ao clorpirifós pode levar a danos nos rins, podendo indicar alterações de sua

funcionalidade (Abolaji, *et al.*, 2017). No presente trabalho, os estudos das possíveis alterações renais estão em andamento.

Em relação à esteatose hepática, é definida como um aglomerado lipídico nos hepatócitos, formada a partir da síntese de triglicerídeos por meio dos ácidos graxos, pode ser ocasionada por uma dieta rica em gordura, disfunções metabólicas, e intoxicações (Valls *et al.*, 2006). A ação dos inseticidas podem influenciar na deposição de gordura nos hepatócitos, devido aos efeitos tóxicos que podem alterar o metabolismo (Cano *et al.*, 2021; Ford *et al.*, 2017). Similarmente a nosso trabalho, um estudo onde ratos Wistar foram expostas a baixas doses de 3 mg/kg e 6 mg/kg de clorpirifós via gavagem, durante 4 semanas, foi possível observar esteatose nos grupos expostos a clorpirifós comparado ao grupo controle, o que corrobora nossos resultados, indicando que a exposição a clorpirifós pode promover maior deposição de gordura nos hepatócitos (Ezzi *et al.*, 2016).

A presença de infiltrado inflamatório no fígado é uma resposta imunológica, onde há o recrutamento de macrófagos, linfócitos entre outras células na presença de lesão tecidual (SI-Tayeb; Lemaigre; Duncan, 2010). A ausência dos focos inflamatórios neste estudo indica que a administração de clorpirifós não ocasionou danos hepáticos que desencadeassem uma resposta inflamatória. O resultado obtido diverge de um estudo publicado em 2019, onde foi detectada a presença de infiltrado inflamatório em ratos Wistar com 8 semanas expostos a doses de 5 mg/kg de clorpirifós durante 21 dias (Owumi; Din, 2019).

Outro achado histológico em todos os grupos, foi a presença de degeneração hidrópica nos hepatócitos. A degeneração hidrópica é caracterizada como o acúmulo de água no citoplasma, causada pelo desequilíbrio osmótico e atividades de absorção e reabsorção da água (Miranda; Santos, 2008). Em casos de lesão tecidual, pode ser uma das primeiras alterações a ser encontrada, variando em sua intensidade, podendo ser reversível (Abdelhalim e Jarra, 2011). Nossos resultados indicam que a exposição a clorpirifós não está associada ao surgimento de degeneração hidrópica. Entretanto, um estudo realizado com ratos Wistar expostos a doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg via gavagem, durante 8 semanas consecutivas, pode ser observado a presença de degeneração hidrópica nos grupos expostos a clorpirifós, indicando lesão tecidual devido a exposição (Tripathi; Srivastav, 2010).

A fibrose é caracterizada pela presença excessiva de colágeno, desencadeado pelo reparo de lesões causadas no tecido, podendo evoluir a casos de cirrose (Andrade, 2005). A presença de colágeno é comum ao redor dos vasos, estando associada a funções estruturais, como suporte, além de importância em casos de lesões (Figueira, *et al.*, 1993). Nossos resultados se assemelham a um estudo publicado por Ravikumar e colaboradores (2022), que avaliaram os efeitos oxidativos e alterações histológicas em dois grupos de ratos Wistar, onde o primeiro grupo era expostos a doses de 25mg/kg de clorpirifós via gavagem, durante 28 dias, e o outro a doses de 25mg/kg com a combinação de 22,9 mg/kg de cádmio. No estudo, foi encontrado fibrose periportal moderada apenas em ratos expostos pela combinação dos compostos, indicando que a exposição isolada de clorpirifós não foi capaz de causar danos que levem a severa reparação tecidual em dose maior.

A MALSD pode ser encontrada em situações de agravamento de alterações teciduais, principalmente o acúmulo de gordura nos hepatócitos, causados pelo aumento de triglicerídeos no tecido, que podem ser agravados em inflamação tecidual, degeneração hepatocelular e fibrose. Esses fatores podem ser desencadeados por disfunções metabólicas, dietas hipercalóricas e fatores genéticos (Contos *et al.*, 2004; Calzadilla; Adams; 2016). Na literatura é possível encontrar dados que relatam a ação de inseticidas no desenvolvimento de MALSD, causada pelo agravamento de disfunções metabólicas, como o aumento da lipogênese (Yang; Park, 2018). Um estudo com células *in vitro* incubadas com doses de 0; 1,25; 5; 20 e 80 μM de clorpirifós relatou o aumento da concentração de triglicerídeos, desencadeada pelo aumento de ácidos graxos livres, e aumento da lipogênese hepática, em células induzidas com 20 e 80 μM de clorpirifós, indicando que clorpirifós influencia no desenvolvimento de MALSD (Howell *et al.*, 2016).

As enzimas ALT e AST são marcadores para determinação de lesão hepática. Um aumento de suas concentrações na circulação sanguínea, indica que foram liberadas das células hepáticas, devido a lesões teciduais, que podem ser causadas pela ação de compostos tóxicos, e alterações metabólicas (Zamin *et al.*, 2002). Nossos resultados diferem parcialmente de um estudo conduzido em 2017, que demonstraram aumento da atividade de ALT e AST em ratos Wistar adultos expostos a doses de 10 mg/kg de clorpirifós, via gavagem durante 30 dias. No mesmo

estudo, ratos expostos a doses de 5 mg/kg de clorpirifós mantiveram níveis normais das enzimas comparado ao grupo controle (Peiris e Dhanushka, 2017). Em outro estudo, a administração de doses de 5 mg/kg em ratas Wistar adultas, via gavagem, durante 21 dias, causou o aumento das enzimas transaminases (Tanvir *et al.*, 2016).

Outro marcador importante para determinar a função adequada do fígado é a albumina, a proteína mais abundante no plasma sanguíneo. Alterações hepáticas geralmente são associadas à diminuição na sua concentração plasmática (Vannucchi; Unamuno; Marchini; 1996). Casos de hiperalbumina geralmente estão associados a desidratação, que pode ser desencadeados por fatores de estresse fisiológico, e utilização de compostos químicos (Mutlu *et al*, 2006). Nossos resultados, no entanto, diferem da maioria dos estudos apresentados na literatura, onde a administração de clorpirifós geralmente causa redução nas concentrações plasmáticas de albumina. Um experimento realizado por Fayinminnu e colaboradores (2017), apresentou resultados onde a administração de doses de 18,9 mg/kg de clorpirifós não revelou diferença nas concentrações de albumina comparado ao grupo controle, entretanto, no mesmo estudo, a exposição de ratos a dose de 25,9 mg/kg de clorpirifós ocasionou uma redução dos níveis de albumina, indicando a diminuição da função hepática ocasionada pela exposição ao clorpirifós. Em um outro estudo, ratos Wistar machos e fêmeas receberam doses de 6,75 mg/kg de clorpirifós via gavagem, durante 28 dias consecutivos, onde a concentração plasmática de albumina não apresentou diferença entre os grupos experimentais (Mansour; Mossa, 2010).

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração de baixas doses de clorpirifós causa toxicidade hepática leve, mantendo a arquitetura tecidual parcialmente preservada em ratos machos peripuberais. Os resultados apresentados para as concentrações plasmáticas de albumina foram inconclusivos, porém indicam que pode haver comprometimento da função hepática, mesmo em resposta a baixas doses do inseticida. Assim, devido à diversidade de casos demonstrados na literatura com lesões hepáticas associadas à exposição ao clorpirifós junto com os achados deste estudo que demonstram alterações histopatológicas leves e alteração na concentração de albumina, faz-se necessária a continuidade dos estudos a fim de compreender os mecanismos que levam a sua toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABDELHALIM, Mohamed Anwar K.; JARRAR, Bashir M. Gold nanoparticles induced cloudy swelling to hydropic degeneration, cytoplasmic hyaline vacuolation, polymorphism, binucleation, karyopyknosis, karyolysis, karyorrhexis and necrosis in the liver. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 1-6, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1476-511X-10-166>. Acesso em: 10 de abr. de 2024.
- ABDERRAHIM, K., BOUANANE, S. BABA AHMED, F. Z., MERHZOUK, H. Effects of chlorpyrifos on brain oxidant/antioxidant parameters in pregnant/lactating rats and their offspring. **Revue Agrobiologia**. 2020.
- ABOLAJI, A. O. et al. Insecticide chlorpyrifos and fungicide carbendazim, common food contaminants mixture, induce hepatic, renal, and splenic oxidative damage in female rats. **Human & experimental toxicology**, v. 36, n. 5, p. 483-493, 2017.
- ALMAZROO, O. A; MIAH, M. K; VENKATARAMANAN, R. **Drug metabolism in the liver**. Clinics in Liver Disease, [S.I.], v. 21, n. 1, p. 1–20, fev. 2017..
- ANDRADE, Zilton A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 514-520, 2005.
- AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY (APVMA). **Chlorpyrifos**. Available at: <https://apvma.gov.au/node/50091>, 2020. Acesso: 17 de março de 2024.
- BANGRU, S; KALSOTRA, A. Cellular and molecular basis of liver regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S.I.], v. 100, n. [S.I.], p. 74–87, abr. 2020. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.12.004
- BELLENTANI, Stefano. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Liver international**, v. 37, p. 81-84, 2017.
- BISMUTH. HENRI. (1982). Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. **World journal of surgery**, 6(1), 3–9.
- BLANCO, J.; GUARDIA-ESCOTE, L.; MULERO, M.; BASAURE, P.; BIOSCA-BRULL, J.; CABRÉ, M.; COLOMINA, M. T.; DOMINGO, J. L.; SÁNCHEZ, D. J. Obesogenic effects of chlorpyrifos and its metabolites during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 137, p. 111171, 2020.
- BOGDANOS, Dimitrios P.; GAO, Bin; GERSHWIN, M. Eric. Liver immunology. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 567, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Monografia C20**. Clorpirifós. 2018 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4226json-file-1>. Acesso em: 10 de mar. de 2024.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Nova metodologia define reavaliação de agrotóxicos.** Brasília: DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 03 set. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/nova-metodologia-define-reavaliacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 10 mar. 2024.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (ANVISA). **Relatório das amostras analisadas no período de 2017 - 2018.** Brasília, DF: ANVISA, 2019. 136 p. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>. Acesso em: 10 de mar. de 2024.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Ibama.gov.br, Brasília, DF, 07 de out. 2020, 11:59. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso em: 10 de mar. de 2024.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). 2018. **Nota pública acerca do posicionamento do Instituto Nacional de Câncer sobre o Projeto de Lei nº 6.299/2002.** Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: <ps://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nota-publica-inca--pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>. Acesso em: 10 de mar. de 2024.

BRASIL, Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989. “Lei Federal dos Agrotóxicos”. Brasília, **Diário Oficial da União** de 12/07/1989. Disponível em: Acesso em: 22 de março de 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de Procedimentos para Registro de Agrotóxicos, 2012.** Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/agrotoxicos/Manual%20de%20Procedimentos%20para%20Registro%20de%20Agrot%C3%B3xicos.pdf. Acesso em 10 de abr. de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018. 193 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 10 de mar. de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Intoxicações exógenas por agrotóxicos no Brasil - 2013 a 2022.** Boletim Epidemiológico, 12, v. 54., 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-12>.

BRESLIN, W. J. et al. Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. **Toxicological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 119-130, 1996.

BRITTO, F. B., MENEZES, T. M., VASCO, A. N., NETTO, A. O. A. Avaliação do risco de contaminação hídrica por agrotóxicos no Perímetro Irrigado Betume no Baixo Rio São Francisco. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada-RBAI**, v. 9, n. 3, p. 158-170, 2015. Disponível em: <<https://www.inovagri.org.br/revista/index.php/rbai/article/view/301>>. Acesso em: 04 de abr. de 2024.

BUZATO, Carla B. Collares; ARANA, Sarah; CARVALHO, Carolina Prado de França; "Histologia do Fígado, Vias Biliares e Pâncreas", p. 335 -368. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

CALVERT, G. M., KARNIK, J., MEHLER, L., BECKMAN, J., MORISSEY, B., SIEVERT, J., BARRET, R., LACKOVIC, M., MABEE, L., SCHWARTZ, A., MITCHELL, Y., & MORAGA-MCHALEY, S. (2008). **Acute pesticide poisoning among agricultural workers in the United States, 1998-2005**. *American journal of industrial medicine*, 51(12), 883–898.

CALZADILLA BERTOT, Luis; ADAMS, Leon Anton. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 5, p. 774, 2016.

CAMPAGNOLLA, Clayton; MACÊDO, Manoel Moacir Costa. Revolução Verde: passado e desafios atuais. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 39, n. 1, p. 26952, 2022.

CANO, Raquel et al. Role of endocrine-disrupting chemicals in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease: a comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4807, 2021.

CHAPARRO, Jenny et al. Inmunolocalización hepática de CYP P450 en un experimento de toxicidad subaguda por Clorpirifos 0, 0-dietil 0-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia *Oreochromis spp.* **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 8, n. 2, p. 61-72, 2013.

CLEGG, E.J. The age at which male rats become fertile. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 1, p. 119–120, 1960.

CONTOS, M. J.; CHOUDHURY, J.; MILLS, A. S.; SANYAL, A. J. The histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Clin Liver Dis**, v. 8, n. 3, p. 481–500, 2004.

CONWAY, G. **Produção de alimentos no século XXI biotecnologia e meio ambiente**. São Paulo: Estação Liberdade, 2003.

COSTA, R.; ROCHA, L. C. D.; FREITAS J. A. de; COURA JÚNIOR G. M.; SANTOS O. M. dos; COUTO E. O. do. Efeito de agrotóxicos usados na cultura do morangueiro

sobre o predador *Phytoseiulus macropilis* (Banks) em laboratório, semicampo e campo no sul de Minas Gerais. **Revista Agroambiental**, v. 4, n. 3, p. 1-12, 2012.

DE-JESUS, Gisleide Cardoso; DE SOUSA, Helio Henrique Barros Arruda; BARCELOS, Rejane da Silva Sena. Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 41, n. 3, 2014.

DELFINO, Reinaldo T.; RIBEIRO, Tatiana S.; FIGUEROA-VILLAR, José D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 407-428, 2009

ECHA. Chlorpyrifos: Draft Risk Profile. 2022. Disponível em: <https://echa.europa.eu/documents/10162/8a51d7d9-e9a4-2513-e975-492fb70f825c>. Data de acesso: 10 de abr. de 2024

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. **EFSA Journal**, v. 17, n. 8, p. e05809, 2019.

EUROPEAN COMMISSION. Chlorpyrifos & Chlorpyrifos-methyl. **ec.europa.eu**. [S. l], [S. l], [S. l]. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances/chlorpyrifos_chlorpyrifos-methyl_en.

EZZI, Lobna et al. Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 4859-4867, 2016.

FAYINMINNU, Olajumoke Oke; TIJANI, S. O.; FADINA, O. O. **Toxicity assessment of sub lethal doses of chlorpyrifos on the kidney and liver organs of male Wistar Rats**. 2017. Disponível em: <http://ir.library.ui.edu.ng/handle/123456789/8203>. Acesso: 20 de mar. de 2024.

FARIA, J., AHMED, S., GERRITSE, K., MIHALIA, S. M. & MASEREEU, W. R. 2019. Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 93, 3397–3418.

FARIA, N. M. X., FASSA, A. G. F. & FACCHINI, L. A. (2007). Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciências e Saúde Coletiva**, 12(1), 25-38. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2007.v12n1/25-38/pt>. Acesso em: 10 de abr. de 2024.

FIGUEIRA, Lucivaldo Tapajós; JÁCOMO, Alfredo Luiz; RODRIGUES JUNIOR, Aldo Junqueira. Anatomia aplicada do ligamento falciforme do fígado. **Rev. bras. ciênc. morfol**, p. 98-101, 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Guidelines on highly hazardous pesticides**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.

FORD, B.; BATEMAN, L. A.; GUTIERREZ-PALOMINOS, L.; PARK, R.; NOMURA, D. K. Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 2, p. 133-140, 2017. Acesso em: [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S2451-9456\(16\)30474-3.pdf](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S2451-9456(16)30474-3.pdf)

FOURNIER, D., MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M. (1993). **Drosophila acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates**. *Chemico-biological interactions*, 87(1-3), 233-238. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90047-3](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90047-3)

FREITAS-LOPES, Maria Alice *et al.* Differential location and distribution of hepatic immune cells. **Cells**, v. 6, n. 4, p. 48, 2017.

GEORGE, N.; SINGH, C.P.; SONDHAI, S.; SAINI, S.; PURI, N.; GUPTA, N. Biodegradation and analytical methods for detection of organophosphorous pesticide: chlorpyrifos. **International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology**, v. 20, n. 2, p. 79, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Prakram-Chauhan/publication/318393184_Biodegradation_and_Analytical_Methods_for_Detection_of_Organophosphorous_Pesticide_Chlorpyrifos/links/596715db458515e9af9b6d1e/Biodegradation-and-Analytical-Methods-for-Detection-of-Organophosphorous-Pesticide-Chlorpyrifos.pdf. Acesso em: 20 de mar. de 2024.

GEER, L. A.; CARDELLO, N.; DELLARCO, M. J.; LEIGHTON, T. J.; ZENDZIAN, R.P.; ROBERTS, J. D.; BUCKLEY, T. J. Comparative Analysis of Passive Dosimetry and Biomonitoring for Assessing Chlorpyrifos Exposure in Pesticide Workers. **The Annals of Occupational Hygiene**, vol. 48, p. 683–695, 29 out. 2004.

GOODMAN, Louis Sanford *et al.* **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9o ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 161–176. Disponível em: <https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC1916578&blobtype=pdf>. Acesso em: 20 de mar. de 2024.

GRIGORI, P. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo? **Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz**, 3 jul 2019..

HOWELL, G. E., III; MULLIGAN, C.; YOUNG, D.; KONDAKALA, S. Exposure to chlorpyrifos increases neutral lipid accumulation with accompanying increased de novo lipogenesis and decreased triglyceride secretion in McArdle-RH7777 hepatoma cells. **Toxicol. In Vitro** 2016, 32, 181– 189.

HUPPERT, S. S; IWAFFUCHI-DOI, M. **Molecular regulation of mammalian hepatic architecture**. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 132, n. [S.I], p. 91–136, 2019.

HUSSAIN, Tarique *et al.* Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016.

ISMAIL, A. A.; HENDY, O.; RASOUL, G. A.; OLSON, J. R.; BONNER, M. R.; ROHLMAN, D. S. Acute and cumulative effects of repeated exposure to chlorpyrifos on the liver and kidney function among egyptian adolescents. **Toxics**, v. 9, n. 6, p. 137, 2021.

JOHN, E. M.; SHAIKE, J. M. **Chlorpyrifos**: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, v. 13, n. 3, p. 269-291, 2015.

JONES, Dean P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 4, p. C849-C868, 2008.

KAMALESH DAS, *et al.* **Chlorpyrifos suppresses female reproductive function in rat.** (2014). *International Journal of Pharma and Bio Ciências*. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20143165962>

KHALAF, A. A.; OGALY, H. A.; IBRAHIM, M. A.; ABDALLAH, A. A.; ZAKI, A. R.; TOHAMY, A. F. The Reproductive Injury and Oxidative Testicular Toxicity Induced by Chlorpyrifos Can Be Restored by Zinc in Male Rats. **Biological Trace Element Research**, vol. 200, p. 551–559, 2022.

KREMEN, C. **Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits?** In: FREITAS, B. M.; PORTELA, J. O. B. (Ed.). *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004. p. 115-124. 285 p

KUBES, P; JENNE, C. Immune responses in the liver. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 247–277, 26 abr. 2018.

KUMAR, B.; KUMAR, S.; GAUR, R.; GOEL, G.; MISHRA, M.; SINGH, S. K.; PRAKASH, D.; SHARMA, C.S. **Persistent organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in intensive agricultural soils from North India.** *Soil Water Res*, 6(4), 190-197., 2011. Disponível em: <https://www.agriculturejournals.cz/pdfs/swr/2011/04/05.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2024.

LASRAM, M. M; DHOUIB, I. B; BOUZID, K; LAMINE, A. J; ANNABI, A; BELHADJHMIDA, N; AHMED, M. B; FAZAA, S. E; ABDELMOULA, J; GHARBI, N. Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to malathion in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 542–553, set. 2014.

LEVENE, A. P.; GOLDIN, R. D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141–152, 2012.

LIANG, Y.; ZHAN, J.; LIU, D.; LUO, M.; HAN, J.; LIU, X.; LIU, C.; CHENG, Z.; ZHOU,

Z.; WANG, P. **Organophosphorus pesticide chlorpyrifos intake promotes obesity and insulin resistance through impacting gut and gut microbiota.** *Microbiome*, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2019.

LINDEMAN, Robert D. et al. Prevalence of mild impairment in renal function in a random sample of elders from a biethnic community survey. **International Urology and Nephrology**, v. 33, p. 553-557, 2001.

MANSOUR, Sameeh A.; MOSSA, Abdel-Tawab H. Oxidative damage, biochemical and histopathological alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 1, p. 14-23, 2010.

MCKINLEY, Michael J. *et al.* **Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst.** In: *Seminars in nephrology*. WB Saunders, 2006. p. 249-257.

MIRANDA, P. C., SANTOS, P. C. G. Degeneração hídrica. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, Garça**, n. 10, 2008. Disponível em: http://www.faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/eTQlkgQ4H5ZqTDE_2013-5-29-10-33-53.pdf. Acesso em: 20 de abr. de 2024.

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**, vol. 7, no 2, p. 299–311, 2002.

MOREIRA, J. C., PERES, F., SIMÕES A. C., PIGNATI, W. A., DORES, E. D. C., VIEIRA, S. N., MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, 1557-1568, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.org/pdf/csc/2012.v17n6/1557-1568/pt>. Acesso em: 20 de mar. de 2024.

MOSSINI, S. A. G., NISHIYAMA, P., MACHADO, P. A. L. Agrotóxicos-aspectos gerais e implicações para a saúde humana. **Agrotóxicos. um enfoque multidisciplinar. EDUEM**, p. 63-83, 2017.

MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of toxicology**, 91(2), 549-599.

MOURA, Luiza Taciana Rodrigues, *et al.* Exposição ocupacional a agrotóxicos organofosforados e neoplasias hematológicas: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, 2020.

MUTLU, Ece A.; KESHAVARZIAN, Ali; MUTLU, Gökhan M. Hyperalbuminemia and elevated transaminases associated with high-protein diet. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 41, n. 6, p. 759-760, 2006.

NADKARNI, M. V. CONWAY, G. R., BARBIER, E. B. After the Green Revolution: Sustainable Agriculture for Development (Book Review). **Indian Journal of**

Agricultural Economics, v. 46, n. 4, p. 624, 1991. Disponível em: <https://www.proquest.com/openview/5b559a65f2974e063e76e6af3b5fb98b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1818936>. Acesso: 10 mar. de 2024.

OJEDA, S. R.; ANDREWS, W. W.; ADVIS, J. P.; WHITE, S. S. Recent advances in the endocrinology of puberty. **Endocrine Reviews**, v. 1, n. 3, p. 228–257, 1980. Acesso em: 25 jun. 2023

OWUMI, Solomon E.; DIM, Uche J. Manganese suppresses oxidative stress, inflammation and caspase-3 activation in rats exposed to chlorpyrifos. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 202-209, 2019.

PERIS-SAMPEDRO, F, *et al.* Chronic exposure to chlorpyrifos triggered body weight increase and memory impairment depending on human apoE polymorphisms in a targeted replacement mouse model. **Physiology and Behavior**, v. 144, p. 37–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.03.006>>. Acesso em: 20 mar. 2024.

PEIRIS, D.C., DHANUSHKA, T. Low doses of chlorpyrifos interfere with spermatogenesis of rats through reduction of sex hormones. **Environ Sci Pollut Res** 24, 20859–20867 (2017).

PEROBELLI, J. **The Male Peripubertal Phase as a Developmental Window for Reproductive Toxicology Studies**. *Current Pharmaceutical Design*, v. 20, n. 34, p. 5398–5415, 2014.

REKHA, R.; RAINA, S.; HAMID, S. Histopathological effects of pesticide-cholopyrifos on kidney in albino rats. **International Journal of Research in Medical Sciences**, v. 1, n. 4, p. 465, 2013. Disponível em: <<https://www.msjonline.org/index.php/ijrms/article/view/2651>>. Acesso em: 10 de abr. 2024.

SANTOS, A. C. dos; GRAVENA, S. Seletividade de acaricidas a insetos e ácaros predadores em citros. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 26, n. 1, p. 99-105, 1997. Acesso em: 20 de mar. de 2024.

SERRA, L. S.; MENDES, M. R. F.; SOARES, M.; MONTEIRO, I. P. **Revolução Verde: reflexões acerca da questão dos agrotóxicos**. *Revista Científica do Centro de Estudos em Desenvolvimento Sustentável da UNDB*, v. 1, n. 4, 2016. Disponível em: <http://sou.undb.edu.br/public/publicacoes/revolu%CC%81o%20verde%20e%20agrot%C3%B3xicos%20-%20marcela%20ruy%20f%CC%81lix.pdf>. Acesso em: 10 de abr. de 2024.

SI-TAYEB, Karim; LEMAIGRE, Frédéric P.; DUNCAN, Stephen A. Organogenesis and development of the liver. **Developmental cell**, v. 18, n. 2, p. 175-189, 2010. Disponível em: [https://www.cell.com/developmental-cell/pdf/S1534-5807\(10\)00055-9.pdf](https://www.cell.com/developmental-cell/pdf/S1534-5807(10)00055-9.pdf). Acesso em: 20 de mar. de 2024.

SMEGAL, D. C. **Human Health Risk Assessment Chlorpyrifos**. Washington, DC: [s. n.], 8 jun. 2000. Disponível em: https://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/hed_ra.pdf

SULTATOS, L. G.; SHAO, M.; MURPHY, S. D. The role of hepatic biotransformation in mediating the acute toxicity of the phosphorothionate insecticide chlorpyrifos. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 73, no 1, p. 60–68, mar. 1984.

TANVIR, E. *et al.* **A model of chlorpyrifos distribution and its biochemical effects on the liver and kidneys of rats**. *Human & Experimental Toxicology*. 2016;35(9):991-1004.

TESTAI, Emanuela; BURATTI, Franca Maria; DI CONSIGLIO, Emma. **Chlorpyrifos**. In: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**. pp. 1505-1526. Istituto Superiore di Sanità. Janeiro de 2010.

TOLEDO, Jucineia; GARCIA, Simone Domingues. Os principais agrotóxicos utilizados no Paraná e o reflexo na saúde/The main pesticides used in Paraná and their impact on health. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19719-19734, 2021.

TREFTS, E., GANNON, M., WASSERMAN, D. H., 2017. **The liver**. *Curr. Biol.* 27, R1147–R1151.

TRIPATHI, Sarojni; SRIVASTAV, Ajai Kumar. Liver profile of rats after long-term ingestion of different doses of chlorpyrifos. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 97, n. 1, p. 60-65, 2010.

UĞURLU, P.; ÜNLÜ, E.; SATAR, E. I. **The toxicological effects of thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda)**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 2, p. 720-726, Mar. 2015.

UNITED STATES GOVERNMENT. Environmental Protection Agency (EPA). **EPA Continues Work to Reduce Chlorpyrifos Exposure**. Washington: DC: Environmental Protection Agency (EPA), 02 de maio de 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticides/epa-continues-work-reduce-chlorpyrifos-exposure>

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Chlorpyrifos: Revised Human Health Risk Assessment for Registration Review**. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. EPA-HQ-OPP2008-0850-0195, December 29, 2014.

VALLS, Carlos et al. Fat in the liver: diagnosis and characterization. **European radiology**, v. 16, p. 2292-2308, 2006.

VANNUCCHI, H.; DE UNAMUNO, M. R. D. L; MARCHINI, J. S. Avaliação do estado nutricional. **Medicina**, v. 29, p. 5-18, 1996.

VARGHESE, J. V; SEBASTIAN, E, M; IGBAL, T; TOM, A. A. Pesticide applicators

and cancer: a systematic review. **Reviews on Environmental Health**, v. 36, n. 4, p. 467–476, dez. 2020.

VENTURA, Ana LM et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 37, p. 66-72, 2010.

VIDELA, L. A; RODRIGO, R; ARAYA, J; PONIACHIK, J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1499–1507, nov. 2004.

VIEIRA, M. M.; DE CARVALHO, A. M. P.; ZULIANI, D. Q. **As intenções do uso de agrotóxicos no Brasil: políticas públicas, debate socioambiental e agronegócio.** Anais do Seminário Nacional de Sociologia da UFS-ISSN 2526-3013, v. 2, 2018;

RAVIKUMAR, Y. et al. Changes in biochemical parameters, antioxidative enzymes and histopathology of liver induced by cadmium (Cd) and chlorpyrifos (CPF) in wistar rats. **Indian Journal of Animal Research**, v. 56, n. 9, p. 1090-1094, 2022.

ROY, T. S. et al. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. **Teratology**, v. 58, n. 2, p. 62-68, 1998.

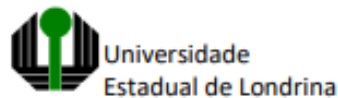
YANG, Jason S.; PARK, Yeonhwa. Insecticide exposure and development of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10132-10138, 2018.

YANG, K. J; LEE, J; PARK, H. L. Organophosphate pesticide exposure and breast cancer risk: a rapid review of human, animal, and cell-based studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 14, p. 5030,jul. 2020.

ZAMIN Jr, I., MATTOS, A. A. D., PERIN, C., & RAMOS, G. Z. (2002). A importância do índice AST/ALT no diagnóstico da esteatohepatite não- Alcoólica. *Arquivos de Gastroenterologia*, 39, 22-26.

ZHANG, Y.; JIA, Q.; HU, C.; HAN, M.; GUO, Q.; LI, S.; BO, C.; ZHANG, Y.; QI, X.; SAI, L.; PENG, C. Effects of chlorpyrifos exposure on liver inflammation and intestinal flora structure in mice. **Toxicology Research**, v. 10, n. 1, p. 141–149, 2021.

ANEXO A - Ofício da Comissão de Ética no Uso de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 034/2021

Londrina, 01 de abril de 2021.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: **"Efeitos sistêmicos e reprodutivos da exposição ao clorpirifós durante o período peripuberal de ratos Wistar"** protocolo CEUA n° **013.2021** sob a responsabilidade de **Fábio Goulart de Andrade**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia 01/04/2021.

Este projeto tem por objetivo verificar os efeitos sistêmicos e reprodutivos da exposição ao clorpirifós durante o período peripuberal de ratos Wistar. **Grau de invasividade: 2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	19/04/2021 a 18/04/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/ Wistar
N° de animais	30
Peso/ Idade	22 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL.
Amostras a serem coletadas	Sangue, testículos, epidídimos, próstata, ductos deferentes, fígado, glândulas adrenais, rins, intestino: jejuno proximal e cólon distal, tecido adiposo perivisceral.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Prof.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora do Comitê de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
Instituição nº 1431-3464

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Fábio Goulart de Andrade

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Histologia /CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB

C/C para o Biotério Central da UEL/ CCB

Campos Universitários: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 405), km 300 - Fone (51) 3371-4000 PARANÁ - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 60511 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRIINA - PARANÁ - BRASIL

ANEXO B - PROTOCOLO DE INCLUSÃO EM PARAFINA

ETAPA	TEMPO
ÁLCOOL 92% OU 95% I	20 minutos
ÁLCOOL 92% OU 95% II	20 minutos
ÁLCOOL 92% OU 95% III	20 minutos
ÁLCOOL 100% I	20 minutos
ÁLCOOL 100% II	20 minutos
ÁLCOOL 100% III	20 minutos
XILOL I	20 minutos
XILOL II	20 minutos
XILOL III	20 minutos
XILOL IV (ESTUFA)	20 minutos
PARAPLAST® I	20 minutos
PARAPLAST® II	20 minutos
PARAPLAST® III	20 minutos
PARAPLAST® IV	20 minutos
INCLUSÃO EM FORMA DE SILICONE	

ANEXO C - COLORAÇÃO EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

ETAPA	TEMPO
XILOL I	3 MINUTOS
XILOL II	3 MINUTOS
ÁLCOOL 100%	1 MINUTO
ÁLCOOL 95%	1 MINUTO
ÁLCOOL 70%	1 MINUTO
ÁGUA DESTILADA	1 MINUTO
HEMATOXILINA*	10 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	3 TROCAS
1% ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL EM ETANOL 95%	45 SEGUNDOS
ÁGUA DE TORNEIRA	5 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	3 Mergulhos
EOSINA* 0,25%	2 MINUTOS
ÁGUA DESTILADA	3 TROCAS
ÁLCOOL 70%	10 Mergulhos
ÁLCOOL 95%	1 MINUTO
ÁLCOOL 100%	1 MINUTO
ÁLCOOL 100%	1 MINUTO
XILOL	3 MINUTOS
XILOL	3 MINUTOS
MONTAR LÂMINAS	

ANEXO D - COLORAÇÃO TRICRÔMICO DE MASSON

ETAPA	TEMPO
XILOL I	3 minutos
XILOL II	3 minutos
ÁLCOOL 100%	3 minutos
ÁLCOOL 95%****	3 minutos
ÁLCOOL 70%****	3 minutos
ÁGUA DESTILADA	3 minutos
ÁCIDO PÍCRICO ALCOÓLICO SATURADO*	5 minutos
ÁGUA CORRENTE	5 minutos
ESCARLATE + FUCSINA*	1 minuto
ÁGUA DESTILADA	3 vezes
ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO + FOSFOMOLIBIDICO*	15 minutos
AZUL DE ANILINA*	3 minutos
ÁCIDO ACÉTICO 1%**	3 minutos
ÁGUA DESTILADA	3 vezes
ÁLCOOL 70%	3 vezes
ÁLCOOL 95%	1 minuto
ÁLCOOL 100%	1 minuto
ÁLCOOL 100%	1 minuto
XILOL + ÁLCOOL (1:1) ***	1 minuto
XILOL (16)	3 minutos
XILOL (17)	3 minutos

Montagem com Bálsamo do Canadá

Tempo Total ± 1 hora e 10 minutos.