
**Efeitos da ingestão do herbicida ácido 2,4
diclorofenoxiacético sobre os neurônios mioentéricos
do duodeno de ratos (*rattus norvegicus*): análises
morfométrica e quantitativa**

ANA PAULA CASTELLO PEREIRA(UNINGÁ)¹
SANDRA REGINA STABILLE(UEM)²

RESUMO

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, apresenta neurotoxicidade, mas seu mecanismo de ação no sistema nervoso não está totalmente conhecido. Entre os efeitos da intoxicação com 2,4-D estão manifestações gastrointestinais. Seus efeitos sobre o plexo mioentérico não são muito conhecidos. Portanto, objetivou-se verificar os efeitos da administração por 15 dias de 5µg e 2,5µg/kg de peso corpóreo de 2,4-D diluído em água nos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos por meio de preparados de membrana corados pelo método de Giemsa e analisados ao microscópio de luz e programa de análise de imagens. A análise quantitativa demonstrou diminuição no número de neurônios do duodeno nos animais que receberam 2,4-D. A incidência de neurônios grandes foi maior nos animais intoxicados. Concluiu-se que o 2,4-D afeta o plexo mioentérico, sendo sua ação manifestada pela diminuição no número de neurônios e aumento na incidência de neurônios grandes.

Palavras-chave: 2,4-D, Plexo Mioentérico, Sistema Nervoso.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os herbicidas apresentaram um rápido cresci-

¹ Professora Mestre Faculdade Ingá – UNINGÁ

² Professora UEM – Maringá-PR anabiologa7@gmail.com

mento no mercado agrícola dos pesticidas devido à prática de monoculturas nas quais o risco de invasão por ervas daninhas é elevado (MIGUEL et al., 1999).

O ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) é um herbicida sistêmico que controla essencialmente ervas de folha larga anuais e algumas perenes (Almeida; Rodrigues, 1988). O 2,4-D é do grupo químico fenoxilacético, existe em formulações contendo sais de amina mais solúveis em água, ou derivados de éster solúveis em solventes orgânicos. Macroscopicamente, caracteriza-se pela apresentação na forma de um pó branco de odor levemente fenólico (Schvartsman, 1991).

Os efeitos de diferentes níveis de concentração do 2,4-D administrados em doses únicas ou continuadas sobre alguns sistemas orgânicos animais, principalmente de cães e ratos, têm sido analisados (Hansen et al., 1971; EPA, 1987; Kelly; Guidotti, 1989; Schvartsman, 1991; Charles et al., 1996a, 1996b; Paulino et al., 1996; Mattsson et al., 1997).

Os sintomas de envenenamento pelo 2,4-D incluem mal-estar, vômitos, enfraquecimento muscular, dificuldades respiratórias, bradicardia, suor excessivo, entre outros (Almeida; Rodrigues, 1988; Charles et al., 1996).

A neurotoxicidade é o efeito predominante na inalação aguda e na ingestão oral provocando sintomas que incluem rigidez dos braços e pernas, incoordenação motora, letargia e anorexia (EPA, 1987).

As pesquisas que verificam a neurotoxicidade do 2,4-D têm sido voltadas para análises do sistema nervoso central (SNC) e, principalmente, para os efeitos advindos do comprometimento daquele sistema (EPA, 1987; Schvartsman, 1991; Mattsson et al., 1997).

Experiências desenvolvidas em laboratório utilizando diferentes dosagens de 2,4-D administradas por via oral, exposição dérmica e, até mesmo, injeção direta no SNC relatam desde ausência de alterações no tecido nervoso, quando em doses baixas e, em doses mais altas, alterações de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos, sugerindo que a toxicidade do 2,4-D é dose dependente e seletiva para os neurônios (Cope et al., 1970; Steiss et al., 1987; Elo; Macdonald, 1989; Schvartsman, 1991; Oliveira; Palermo-Neto, 1993; Duffard et al., 1995; Charles et al., 1996; Mattsson et al., 1997; Bortolozzi et al., 1998 e 2001; Garabrant; Philbert, 2002).

Em relação ao 2,4-D, o mecanismo da neurotoxicidade ainda não está esclarecido (Bortolozzi et al., 2001). Entre os mecanismos propostos

para a ação do 2,4-D no SNC, Elo; Macdonald (1989) sugerem a inibição do transporte de ácidos orgânicos para fora do cérebro com aumento nos níveis de metabólitos ácidos resultantes da biogênese das aminas. Bradberry et al. (2000) relatam a ocorrência de alterações na membrana celular do neurônio com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Bortolozzi et al. (1998) ressaltam que ocorre aumento nos níveis de serotonina provavelmente em função do aumento de sua biossíntese, ou por inibição da recaptação desse neurotransmissor ou da enzima monoamina oxidase (MAO). Di Paolo et al. (2001) sugerem que o 2,4-D pode levar a alterações covalentes que afetam a estrutura da proteína e a atividade biológica. Modificações na integridade funcional e estrutural de proteínas nas membranas plasmática e das organelas podem disparar alterações no metabolismo energético afetando atividades biológicas celular como a síntese de ATP, sinalização, regulação de reações de biossíntese e catabólica, transportes de metabólitos e de íons (Palmeira et al., 1997). O 2,4-D é inibidor moderado da fosforilação oxidativa e tem ação tóxica direta sobre os músculos estriados e uma possível, porém discutida, ação tóxica sobre os nervos periféricos (Schvartsman, 1991).

Os processos envolvidos no mecanismo da digestão em nível de trato gastrointestinal são controlados pelo sistema nervoso entérico e, entre esses, encontra-se a atividade motora controlada pelo plexo mioentérico, subdivisão do sistema nervoso entérico (Sternini, 1988) no qual, além da acetilcolina e noradrenalina, foram identificados neurotransmissores como a serotonina, substância P, VIP, óxido nítrico somatostatina, neuropéptido Y entre outros (Belai et al., 1988).

Inúmeras pesquisas sobre condições de diabetes, envelhecimento, câncer, entre outras, têm comprovado alterações nos neurônios mioentéricos responsabilizando-as, em parte, pelas disfunções gastrointestinais presentes (Santer; Baker, 1988; Romano et al., 1996; Mello et al., 1997; Zanoni et al., 1997; Hernandez et al., 2000; Fregonesi et al., 2001; Souza; Furlan, 2001).

O mecanismo envolvido no comprometimento do plexo mioentérico naquelas condições, apesar de não estar totalmente desvendado, tem sido atribuído ao estresse oxidativo (Kyvenhoven; Meinder, 1999) e a redução da eficiência dos sistemas antioxidantes (Baynes, 1991). O estresse pode ser amplificado e propagado por um ciclo auto-catalítico de estresse metabólico levando a morte celular com

aumento de espécies reativas ao oxigênio e diminuição dos mecanismos antioxidantes (Baynes, 1991).

Uma vez que o 2,4-D tem ação sobre o sistema nervoso central, é de se esperar que atue também sobre o plexo mioentérico. Sendo assim, tendo em vista os sintomas relativos ao aparelho digestório decorrentes da intoxicação com 2,4-D, consideramos importante verificar seus efeitos nos neurônios mioentéricos já que os mesmos participam dos mecanismos envolvidos na digestão.

Portanto, utilizando-se de preparados de membrana, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da administração de 2,4-D sobre alguns aspectos morfológicos e quantitativos dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos.

PRESSUPOSTOS METODOLÓGICOS

Foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, de 60 dias de idade, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com ciclo de iluminação artificial controlado para 12h claro/12h escuro, a uma temperatura ambiente controlada de 22°C, por um período de 15 dias.

Os animais foram pesados diariamente e constituíram três grupos com cinco animais em cada como descrito a seguir:

Grupo A: formado por animais que receberam 5,0µg/kg de peso corpóreo/dia de 2,4-D diluídos em 10 ml de água durante 15 dias;

Grupo B: formado por animais que receberam 2,5µg/kg de peso corporal/dia de 2,4-D diluídos em 10 ml de água durante 15 dias.

Grupo C: formado por animais que receberam água sem o 2,4-D.

Todos os animais receberam ração comercial Nuvital *ad libitum*. Os animais dos grupos A e B, após ingestão de toda a água diária contendo 2,4-D, também tiveram acesso à água sem o herbicida.

Eutanásia e obtenção dos segmentos intestinais

Ao final dos 15 dias de experimento, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e, posteriormente, foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

O trato gastrointestinal foi retirado após secção ventral longitudinal de cada animal e o duodeno foi isolado para análises morfológicas e quantitativas dos neurônios mioentéricos.

Obtenção dos preparados de membrana

O duodeno obtido de cada animal foi lavado em solução fisiológica, distendido e fixado em solução de formaldeído, ácido acético glacial e cloreto de sódio (Barbosa, 1978).

Após um período de fixação de 24 horas, os segmentos obtidos foram microdissecados ao estereomicroscópio Olympus SZ40 com transiluminação para retirada da túnica mucosa e da tela submucosa, com preservação das túnicas muscular e serosa. Os preparados de membrana assim obtidos foram corados pelo método de Giemsa (BARBOSA, 1978), desidratados, diafanizados e colocados entre lâmina e lamínula com resina Permout.

Análise quantitativa dos neurônios mioentéricos

Os preparados de membrana obtidos em cada grupo foram analisados ao microscópio de luz Biosystems Bioval equipado com objetiva de 40x. Cada preparado de membrana foi dividido em quatro quadrantes de igual tamanho. Em cada quadrante foram escolhidos ao acaso dez campos, perfazendo-se o total de 40 campos microscópicos por preparado de membrana.

Em cada campo, foram contados todos os neurônios presentes, desprezando os meios neurônios em um campo e considerando os de outro, sucessivamente.

A área fornecida pela objetiva de 40x previamente mensurada foi de 0,224 mm². O resultado da contagem foi expresso como o número médio de neurônios presentes em 8,96 mm² de duodeno.

Análise morfométrica dos neurônios mioentéricos

Ao microscópio de luz equipado com objetiva de 40x e micro câmara fotográfica digital 3CCD Pró serus foram capturadas imagens de cada preparado de membrana as quais foram gravadas em CD-ROM.

Com auxílio de um computador e do programa de análise de imagens Image Pró-plus, versão 4.5, foi mensurada a área do perfil do

pericário (PP) de 100 neurônios mioentéricos por preparado de membrana.

Posteriormente, para cada grupo, foram calculados a média e o desvio padrão das mensurações obtidas e estabelecidos intervalos de valores que permitiram a classificação dos neurônios de acordo com as suas dimensões. Neurônios com medidas da área do PP pertinentes ao intervalo resultante da média \pm desvio padrão obtidos do grupo controle foram considerados de tamanho médio. Aqueles com dimensões superiores ou inferiores ao referido intervalo foram considerados grandes e pequenos, respectivamente.

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente com a utilização do teste de Tukey e análise de variância para comparação dos resultados entre os grupos. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise dos preparados de membrana do duodeno ao microscópio de luz evidenciou o plexo mioentérico com a constituição ganglionar característica já descrita em outros animais, inclusive em ratos da linhagem Wistar (Leaming; Cauna, 1961; Ali; McLelland, 1979; Gabella, 1979; Molinari et al., 1994; Souza; Furlan, 2001; Zanin et al., 2001).

A quantidade de neurônios mioentéricos variou entre os animais que receberam ou não 2,4-D diluído em água. O número médio de neurônios presentes em 8,96mm² de duodeno dos ratos controle foi 1608,8. Nos ratos que receberam 2,5µg e 5µg de 2,4-D, encontramos 1396,2 e 1326 neurônios/8,96mm² de duodeno, respectivamente. Nossos resultados comprovam que ocorreu uma diminuição significativa ($P>0,05$) no número de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos tratados com 2,4-D quando comparado com os animais do grupo controle. Contudo, não houve diferença significativa entre a média de neurônios dos ratos que receberam 2,5µg e 5µg de 2,4 D. Esses resultados sugerem um efeito neurotóxico do 2,4-D sobre os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos quando administrado via oral em doses de 2,5µg e 5µg/kg de peso corporal por um período de 15 dias (Tabela 01).

Tabela 1. Média, erro padrão da média e desvio padrão do número de neurônios mioentéricos presentes em 8,96 mm² de duodeno de ratos que receberam ou não 2,4-D diluídos em 10ml de água durante 15 dias.

Tratamentos	Número de neurônios mioentéricos do duodeno		
	Média*	Erro padrão da média	Desvio padrão
Grupo A (5 µg de 2,4-D)	1326 ^b	50,52	116,3
Grupo B (2,5 µg de 2,4-D)	1396,2 ^b	45,04	112,9
Grupo C (sem 2,4-D)	1608,8 ^a	70,04	156,6

*Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey (P< 0,05)

Diminuição no número de neurônios do plexo mioentérico é descrita para outras condições experimentais tais como diabetes, envelhecimento, desnutrição e câncer (Santer; Baker, 1988; Romano et al., 1996; Mello et al., 1997; Zanoni et al., 1997; Hernandez et al., 2000; Fregonesi et al., 2001; Souza; Furlan, 2001), sugerindo que esses neurônios também são suscetíveis a alterações quando submetidos a condições adversas a saúde.

O estresse oxidativo e alterações da microvascularização dos nervos podem levar a degeneração de neurônios mioentéricos. Segundo Baynes (1991) o estresse leva a morte celular por aumentar a concentração de espécies reativas ao oxigênio e por diminuir os mecanismos antioxidantes sugerindo que, no caso do plexo mioentérico de animais diabéticos, por exemplo, a diminuição no número de neurônios pode ser decorrente da amplificação e propagação do ciclo auto-catalítico de estresse metabólico.

Em relação ao perfil do pericário (PP) dos neurônios do duodeno observamos variações que permitiram identificar neurônios de tamanhos pequeno, médio e grande nos três grupos estudados. A presença de neurônios de diferentes tamanho no plexo mioentérico não representa uma alteração na constituição deste plexo e era esperada uma vez que Santer; Baker (1988), Molinari et al. (1994), Mello et al. (1996), Natali; Miranda-Neto (1996), Sant'Ana et al. (1997), entre outros, descreveram o plexo mioentérico constituído por neurônios pequenos, médios e grandes em diferentes segmentos do trato gastrointestinal de ratos e de outras espécies animais.

A média da área do PP dos neurônios mioentéricos não foi a mesma para os grupos que receberam ou não o 2,4-D, contudo não

constatamos diferenças significativas ($P>0,05$) entre elas. Os animais do grupo controle apresentaram neurônios mioentéricos com área média do PP igual a $217,14\mu\text{m}^2$. As médias da área do PP dos neurônios mioentéricos de ratos que receberam $2,5\mu\text{g}$ e $5\mu\text{g}$ de 2,4-D foram $213,39\mu\text{m}^2$ e $241,92\mu\text{m}^2$, respectivamente (Tabela 02).

Tabela 2. Média e desvio padrão da área do perfil celular do pericário (PP) dos neurônios mioentéricos do duodeno de ratos que receberam por 15 dias $5\mu\text{g}$ e $2,5\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo de 2,4-D diluídos em 10 ml de água e de ratos que não receberam 2,4-D

Tratamentos	Área do perfil celular do pericário (PP) em μm^2	
	Média*	Desvio Padrão
Grupo A ($5\mu\text{g}$ de 2,4-D)	241,92 ^a	78,17
Grupo B ($2,5\mu\text{g}$ de 2,4-D)	213,39 ^a	66,17
Grupo C (controle)	217,14 ^a	70,15

*Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem ($P>0,05$) pelo teste de Tukey

Em relação a frequência de neurônios pequenos, médios e grandes observamos que houve predominância nos três grupos de neurônios de tamanho médio (Tabela 03). Predominância de neurônios de tamanho médio no plexo mioentérico de diversos segmentos do trato gastrointestinal de ratos também foi relatada por diversos autores, tanto em condições normais como em situações de indução experimental de patologias ou adversidades ao organismo (Santer; Baker, 1988; Romano et al., 1996; Mello et al., 1997; Zanoni et al., 1997; Hernandez et al., 2000; Fregonesi et al., 2001; Souza; Furlan, 2001; Zanin et al., 2001).

Tabela 3. Incidência de neurônios mioentéricos de diferentes tamanhos presentes no duodeno de ratos que receberam $5\mu\text{g}$ e $2,5\mu\text{g/kg}$ de peso corpóreo de 2,4 D por 15 dias e de ratos que não receberam 2,4-D.

Tamanho do neurônio	Frequência (F) e Porcentagem (%) de neurônios					
	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	5 μg de 2,4-D		2,5 μg de 2,4D		sem 2,4 D	
	F	%	F	%	F	%
Pequeno ($<146,99\mu\text{m}^2$)	52	10,4%	67	16,7%	82	16,4%
Médio ($146,99$ a $287,29\mu\text{m}^2$)	314	62,8%	279	69,8%	326	65,2%

Grande (> 287,29µm²)	134	26,8%	54	13,5%	92	18,4 %
Total	500	100%	400	100%	500	100%

Apesar da predominância de neurônios de tamanho médio, constatamos que a incidência de neurônios grandes foi maior nos animais que receberam 5µg de 2,4-D, do que nos animais do grupo controle. Esses resultados sugerem que, embora por mecanismos ainda desconhecidos, o 2,4-D interfere no plexo mioentérico alterando não apenas o número de neurônios, mas também propiciando o aumento na incidência de neurônios com área de PP maior.

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

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

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

Modificações na membrana plasmática e de organelas interferindo no metabolismo energético do neurônio como a síntese de ATP, regulação das reações de biossíntese e catabólicas, transporte de metabólitos e íons levando, inicialmente a um aumento do volume do pericário são relatadas por Palmeira et al. (1997) como responsáveis pelos efeitos tóxicos do 2,4-D. Elo e MacDonald (1989) sugerem que a neurotoxicidade é devida a inibição do transporte de ácidos orgânicos para fora do cérebro com aumento nos níveis de metabólitos ácidos resultantes da biogênese das aminas. Bradberry et al. (2000) relatam a ocorrência de alterações na membrana celular do neurônio com desacoplamento da fosforilação oxidativa e interrupção do metabolismo da acetil coenzima A. Aumento nos níveis de serotonina, provavelmente em função do aumento da biossíntese, ou por inibição da recaptção desse neurotransmissor ou, ainda, inibição da enzima mono amina oxidase (MAO) foi descrito por Bortolozzi et al. (1998) sendo que Fuller (1992) acrescenta que, ao inibir a MAO, ocorre acúmulo das aminas livres no citoplasma do neurônio facilitando a autoxidação.

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

CONCLUSÕES

Nas condições em que nosso experimento foi conduzido podemos concluir que o 2,4-D quando administrado por via oral diluído em água nas doses de 5 µg e 2,5 µg/kg de peso corpóreo por um período de 15 dias altera os neurônios do plexo mioentérico do duodeno de ratos levando a uma degeneração dos neuronal manifestada pela diminuição no número de neurônios.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

BELAI, A. et al. Progressive changes in adrenergic, serotonergic, and peptidergic nerves in proximal colon of streptozotocin-diabetic rats. *Gastroenterol.*, 95:1234-1241, 1988.

BERWICK, P. **2,4-dichlorophenoxyacetic acid poisoning in man**. *JAMA*, 214(6):1114-1117, 1970.

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

BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, R.; DUFFARD, A.M.E. Asymmetrical development of the monoamine systems in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid treated rats. *Neurotoxicol.*, 178:1-9, 2002.

BORTOLOZZI, A. et al. Intracerebral administration of 2,4-ciclorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. *Neurotoxicol.*, 22(2):221-232, 2001.

BORTOLOZZI, A. et al. Behavioral alterations induced in rats by a pre- and postnatal exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol. Teratol.*, 21(4):451-465, 1999.

BORTOLOZZI, A. et al. Regionally specific changes in central brain monoamine levels by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in acute treated rats. *Neurotoxicol.*, 19(6):839-852, 1998.

BRADBERRY, S.M. et al. Mechanisms of toxicity, clinical features, and management of acute chlorophenoxy herbicide poisoning: a review. *J Toxicol. Clin. Toxicol.*, 38:111-122, 2000.

CHARLES, J. M. et al. Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fundamental Applied Toxicol.*, 33:166-172, 1996a.

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

CHARLES, J. M. et al. Comparative subchronic studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, amine and ester in rats. *Fund Appl Toxicol*, 33:161-165, 1996b.

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

DI PAOLO, O.; DUFFARD, A.M.E.; DUFFARD, R. *In vivo and in vitro binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. Chemico-Biological Interactions*, 137:229-241, 2001.

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

DUFFARD, R. et al. Central nervous system myelin deficit in rats exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid throughout lactation. *Neurotoxicol. Teratol*, 18(6):691-696, 1996.

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

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

FREGONESI, C.E.P.T. et al. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 59:50-53, 2001.

FULLER, R.W. Comparison of MPTP and amphetamines as dopaminergic neurotoxins. In: LANGSTONS, J.W.; YOUNG, A. eds., *Neurotoxins and neurodegenerative disease*. New York: New York Academic Sciences, 1992.

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

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

GARCIA, G. et al. Morphological study of 5-HT neurons and astroglial cells on brain of adult rats perinatal or chronically exposed to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol.*, 22:733-741, 2001.

HANSEN, W. H. et al. Chronic toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats and dogs. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 20:122-129, 1971.

HERNANDES, L. et al. Streptozotocin-induced diabetes duration is important to determine changes in the number and basophily of myenteric neurons. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 58(4):1035-1039, 2000.

JESSELL, T.M. Reactions of neurons to injury. In: KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. eds. **Principles of neural science**. 3.ed. Norwalk: Appleton & Lange, 1991.

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

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

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

MATTSSON, J. L. et al. Single-dose and chronic dietary neurotoxicity screening studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rats. *Fund. Applied Toxicol.*, 40:11-119, 1997.

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

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

MOLINARI, S.L. et al. Estudo morfológico do plexo mioentérico do estômago glandular do pato (*Anas sp.*). *Rev. Unimar*, 16(2):419-426, 1994.

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

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

PALMEIRA, C.M. et al. Structural alterations in isolated hepatocytes induced by the herbicides paraquat, dinoseb, and 2,4-D. *Med. Sci. Res.*, 25:339-342, 1997.

PAULINO, C. A. et al. Acute, subchronic and chronic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) intoxication in rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, 38(5):348-352, 1996.

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

SANT'ANA, D.M.G. et al. Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon rats subjected to proteic desnutrition. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(4):687-695, 1997.

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

SCHVARTSMAN, S. S. **Intoxicações agudas**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

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

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

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

VINSON, J.A. et al. In vitro and in vivo reduction of erythrocyte sorbitol by ascorbic Acid. *Diabetes*, 38:1036-1041, 1989.

ZANONI, J.N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetics rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55:696-702, 1997.

ZANIN, S.T.M. et al. Densidade dos neuronios mioentéricos nadh-diaforase positivos do jejuno de ratos (*Rattus norvegicus*). *Arq. Ciênc. Saúde da Unipar*, 5(1):3-7, 2001.

ZANONI, J.N. et al. Evaluation of the population of nadph-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Autonomic neurosc.*, 104(1):32-38, 2003.

ZANONI, J.N. et al. Morphological and quantitative analysis of the neurons of myenteric plexus of the cecum of streptozotocin-induced diabetics rats. *Arq. Neuropsiquiatr.*, 55(4):696-702, 1997.