



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDREIA CARLA EUGENIO PUPIM

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NO CÓLON DE
RATOS APÓS EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE
MALATION**

Londrina
2021

ANDREIA CARLA EUGENIO PUPIM

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NO CÓLON DE
RATOS APÓS EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE
MALATION**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Londrina
2021

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

P984 Pupim, Andreia Carla Eugenio.
Alterações morfofisiológicas no cólon de ratos após exposição a baixas doses de malation / Andreia Carla Eugenio Pupim. - Londrina, 2021.
98 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2021.
Inclui bibliografia.

1. pesticida organofosforado - Tese. 2. toxicidade - Tese. 3. intestino grosso - Tese. 4. sistema nervoso entérico - Tese. I. de Almeida Araújo, Eduardo José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

CDU 61

ANDREIA CARLA EUGENIO PUPIM

**ALTERAÇÕES MORFOFISIOLÓGICAS NO CÓLON DE
RATOS APÓS EXPOSIÇÃO A BAIXAS DOSES DE
MALATION**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra Glaura Scantamburlo Alves
Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra Nilza Cristina Buttow
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa Dra Patrícia Castelucci
Universidade de São Paulo – USP

Profa Dra Débora de Mello Gonçalves Sant Ana
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 23 de novembro de 2021

Sei que os teus olhos
Sempre atentos permanecem em mim
E os teus ouvidos
Estão sensíveis para ouvir meu clamor
Posso até chorar
Mas a alegria vem de manhã
És Deus de perto e não de longe
Nunca mudaste, tu és fiel
Deus de aliança
Deus de promessas
Deus que não é homem para mentir
Tudo pode passar
Tudo pode mudar
Mais sua palavra
Vai se cumprir
(Deus de Promessas – Davi Sacer)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que foi minha fortaleza de fé, me guiou, me amparou nos momentos mais difíceis, me sustentou e me fez capaz de encarar os desafios que este doutorado me trouxe.

Agradeço a meu esposo Junior, minha filha Isabella e meu filho Gabriel que sempre acreditaram e torceram por mim, que suportaram ao meu lado essa longa caminhada, compreendendo muitas vezes a minha ausência para a finalização dessa etapa na minha vida pessoal e profissional.

Agradeço meus pais José Carlos e Creusa e meus irmãos Alessandro e Agnes que também sempre me incentivaram aos estudos e me apoiaram em todas as decisões que tomei na minha vida.

Agradeço todos os amigos que a vida me trouxe nessa caminhada, a todos amigos do Laboratório de Neurogastroenterologia, Beatriz, Joyce, Matheus, Paulo, Adriano, Vinicius, e Giovanni por todos os incentivos, conversas, discussões e risadas que tivemos durante esses período, em especial, à Camila Basso que juntas trabalhamos no desenvolvimento desse projeto no apoio técnico e emocional. E mais que especial à Camila Machado que sempre me apoiou no âmbito emocional e técnico e será para sempre uma amiga e inspiração como pessoa e pesquisadora.

Agradeço meus amigos de trabalho do Laboratório de Histologia, Mirian Vicentini e Renata Baldo, que também me acompanharam e me apoiaram durante todo esse desafio.

Agradeço meus amigos que não fazem parte da pesquisa, mas que são fundamentais em todos os momentos da minha vida. Em especial à minha amiga Beatriz Nino que, além de ser minha amiga, é também parceira de trabalho e que esteve sempre me incentivando, apoiando e acreditando que eu era capaz de chegar ao final dessa etapa.

Agradeço meu orientador, professor Eduardo José de Almeida Araújo, por todos os ensinamentos e críticas que sempre foram fundamentais na minha vida pessoal e profissional. É para mim um exemplo de professor, pesquisador e um amigo que levarei por toda a vida.

Agradeço todos os professores do Departamento de Histologia que me apoiaram, incentivaram e concordaram com a minha licença de 20h para o desenvolvimento desse projeto pessoal e profissional. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos e exemplos de pessoas e profissionais.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Centro de Ciências Biológicas, todos os diretores e professores por terem me liberado de minhas funções laborais por todo o período do doutorado. Espero poder retribuir com todo o conhecimento adquirido para o apoio a esta instituição que tenho orgulho de fazer parte.

Agradeço ao Programa de Pós- Graduação em Patologia Experimental da UEL, todos os coordenadores, professores, secretários e colegas de turma que este me proporcionou. Todos foram essenciais e exemplos para a minha caminhada.

Agradeço os professores da banca de qualificação Glaura Scantamburlo Alves Fernandes e Nilza Cristina Buttow, por todas as contribuições nesta tese.

Agradeço todos os professores membros da banca de defesa, por todas as contribuições para a finalização da tese.

Agradeço todos os quais eu possa ter esquecido de mencionar aqui, mas que de maneira direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento desse projeto desafiador em minha vida.

A minha gratidão e o meu muito obrigada.

Um dia, você vai sorrir muito e vão dizer que foi sorte. Foi sorte todas as vezes em que chorou e viu as oportunidades à sua frente, depois de muito esforço. Foi sorte todas as vezes em que apenas você viu que não bastaria esforço, mas estar ao lado das pessoas certas para colocar seus projetos em dia. Simplesmente, porque percebeu que há um abismo entre seu sonho e ver que nem todos torcem por isso. Você aprendeu que um sonho é sua jornada particular com ALGO MAIOR e apenas isso. Diziam ainda ser “sorte” cada passo alcançado, mas apenas você sabia quantos tropeços o fizeram querer voar para mais longe e alto. Não tenha medo do fim, pois quem o teme esquece de viver.

Quando você alcançar o topo, vão dizer que foi sorte, poucos vão reconhecer o quanto você lutou para chegar lá no alto.

Tenha fé

Trecho do livro O segundo horizonte, por Suzy Hekamiah

PUPIM, Andreia Carla Eugenio. **Alterações morfofisiológicas no cólon de ratos após exposição a baixas doses de malation.** 2021. 98 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Malation (MAL) é um inseticida organofosforado inibidor das colinesterases, muito utilizado para o controle de pragas na agricultura como no combate de mosquitos vetores transmissores de várias arboviroses. O uso deste pesticida químico, expõe os seres humanos aos seus efeitos tóxicos. Sintomas gastrointestinais são observados devido acúmulo de acetilcolina e de alterações no sistema nervoso entérico (SNE) resultando em modificações morfofisiológicas dos órgãos do trato gastrointestinal. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da exposição contínua de duas doses de MAL: 10 e 50 mg/Kg, consideradas baixas de acordo com DL50 oral, no cólon de ratos avaliando a estrutura da parede e parâmetros de motilidade colônica. Ratos Wistar foram distribuídos em três grupos: Controle que recebeu solução salina 0,9% e os grupos M10 e M50 que receberam 10 e 50 mg/Kg, respectivamente, de MAL via gavagem por 40 dias. O cólon foi coletado para análises histopatológicas, do SNE, atividade de colinesterase e análises funcionais. Os dados coletados foram avaliados de acordo com o tipo de distribuição. Ambos os grupos foram comparados em relação ao controle. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $P < 0,05$. Após período experimental foi observado em ambos os grupos alterações significativas no fenótipo dos pellets fecais, menor tempo de trânsito intestinal no grupo M50. Após eutanásia constatou-se redução da atividade da butirilcolinesterase. Alterações macroscópicas não foram significativas. Microscopicamente houve atrofia da mucosa em M10 e hipertrofia no M50, e aumento da profundidade das criptas em M50. As camadas submucosa e musculares dos grupos estavam atrofiadas, com redução da massa citoplasmática das células dos estratos musculares demonstrada com aumento do número de núcleos. Na avaliação da densidade populacional de neurônios do SNE, não foram observadas alterações de neurônios imunorreativos (IR) para HuC/D e calretinina no plexo submucoso (PS) e de neurônios IR para HuC/D, ChAT e nNOS no plexo mioentérico (PM), com redução da proporção de neurônios colinérgicos em relação ao total de neurônios no grupo M50 no cólon proximal (CP), porém no PM no cólon distal (CD) houve perda neuronal de neurônios IR para HuC/D em ambos grupos e menor número para nNOS em M10. Os corpos celulares neuronais estavam hipertrofiados em M10 em ambas as porções e no M50 no CD, com atrofia do M50 na CP no PS. No PM observou-se atrofia no grupo M10 para todas as populações avaliadas no CP e no CD para HuC/D e nNOS, e hipertrofia para ChAT no CD no M50. As baixas doses de MAL desencadearam uma série de alterações nos padrões de motilidade do cólon e da frequência, a duração e a direção dos Complexos Motores Migratórios Colônicos (CMMCs). Em M10, observou-se contrações simultâneas que apresentavam maior pressão e tempo de duração, e aumento no intervalo entre as contrações, sem alterar o perfil dos CMMCs. Em M50, a alteração de motilidade foi mais expressiva, com redução na frequência de CMMCs anterógrados e aumento na frequência de CMMCs retrógrados. Conclui-se que a exposição oral contínua ao MAL causou modificações estruturais e funcionais do cólon de ratos em ambas as doses.

Palavras-chave: dengue; pesticida; acetilcolina; colinesterase; motilidade.

PUPIM, Andreia Carla Eugenio. **Morphophysiological changes in the colon of rats after exposure to low doses of malathion.** 2021. 98 p. Thesis (PhD in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Malathion (MAL) is an organophosphate insecticide that inhibits cholinesterases, widely used to control pests in agriculture and to combat mosquitoes that transmit various arboviruses. The use of this chemical pesticide exposes humans to its toxic effects. Gastrointestinal symptoms are effects observed due to the accumulation of acetylcholine and changes in the Enteric Nervous System (ENS) resulting in morphophysiological changes in the organs of the gastrointestinal tract. The objective of this study was to evaluate the effects of continuous exposure of two doses of MAL: 10 and 50 mg / Kg, considered low according to the oral LD50, in the colon of rats, evaluating the wall structure and colonic motility parameters. Wistar rats were divided into three groups: Control that received 0.9% saline solution and groups M10 and M50 that received 10 and 50 mg / kg, respectively, of MAL via gavage for 40 days. The colon was collected for histopathological, the ENS, cholinesterase activity and functional analyses. The collected data were evaluated according to the type of distribution. Both groups were compared in relation to the control. Statistical differences were considered when $P < 0.05$. After the experimental period, significant changes in the phenotype of faecal pellets were observed in both groups, with shorter intestinal transit time in the M50 group. After euthanasia there was a reduction in the activity of butyrylcholinesterase. Macroscopic changes were not significant. Microscopically, there was mucosal atrophy in M10 and hypertrophy in M50 and increase crypt depth in M50. The submucosal and muscle layers of groups were atrophied, with a reduction in the cytoplasmic mass of cells in the muscle strata demonstrated by an increase in the number of nucleus. In the evaluation the population density of ENS neurons, no changes were observed from immunoreactive (IR) neurons to HuC/D and calretinin in the submucosal plexus (SP) and from IR neurons to HuC/D, ChAT and nNOS in the myenteric plexus (MP), with a reduction in the proportion of cholinergic neurons in relation to the total number of neurons in the M50 group in the proximal colon (PC), but in the MP in the distal colon (DC) there was neuronal loss of IR neurons to HuC/D in both groups and a lower number to nNOS in M10. Neuronal cell bodies were hypertrophied in M10 in both portions and in M50 in DC, with atrophy of M50 in PC in SP. In MP, atrophy was observed in group M10 for all populations evaluated in PC and DC to HuC/D and nNOS, and hypertrophy to ChAT in DC in M50. Low doses of MAL triggered a series of changes in colon motility patterns and the frequency, duration and direction of Colonic Migratory Motor Complexes (CMMCs). In M10, simultaneous contractions were observed, which presented greater pressure and duration, and an increase in the interval between contractions, without changing the profile of the CMMCs. At M50, the change in motility was more expressive, with a reduction in the frequency of anterograde CMMCs and an increase in the frequency of retrograde CMMCs. It is concluded that continuous oral exposure to MAL caused structural and functional changes in the colon of rats at both doses.

Keywords: dengue; pesticide; acetylcholine; cholinesterase; motility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do trato digestivo com as camadas da parede	30
Figura 2 – Organização do plexo mioentérico de humanos e mamíferos médios e grandes	33

ARTIGO

Figure 1 – Action of MAL on colonic physiology	76
Figure 2 – Macroscopic and histological colonic analyses	77
Figure 3 – Neurons of the enteric nervous system (ENS) in the submucosal (SP) and myenteric (MP) plexus.....	78
Figure 4 – Analysis of general colonic intestinal motility in the proximal, medial proximal, medial distal and distal colon.....	80
Figure 5 – Analysis of frequency (nb/min), area (mmHg.s), amplitude (mmHg) and duration (s) of colonic contractions according to the classification of types of contraction (aboral propulsive, oral propulsive, simultaneous non-propulsive and not propulsive alone)	82
Figure 6 – Colonic migratory motor complexes (CMMCs).....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Toxicológica23

ARTIGO

Table 1 – Antibodies used in the immunofluorescence technique.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

REVISÃO DE LITERATURA

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChR	Receptores de Acetilcolina
AH	Pós-hiperpolarização
ATP	Adenosina Trifosfato
BuChE	Butirilcolinesterase
Calr	Calretinina
ChAT	Colina Acetiltransferase
CMMCs	Complexos motores migratórios Colônicos
DL50	Dose Letal 50
EPSP	Potenciais pós-sinápticos excitatórios
FAO	Food and Agriculture Organization
fEPSPs	Potenciais pós-sinápticos excitatórios rápido
ICCs	Células Intersticiais de Cajal
IPANs	Neurônios Intrínsecos Sensoriais
mAChR	Receptores Acetilcolina Muscarínicos
MAL	Malation
nAChRs	Receptores Acetilcolina Nicotínicos
NE	Norepinefrina
ONSn	Óxido nítrico sintase neuronal
OF	Organofosforados
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido Nítrico
ONU	Programa da Organização das Nações Unidas
PM	Plexo mioentérico
PS	Plexo submucoso
RPCs	Contrações fásicas rítmicas colônicas
S	Neurônio sináptico
SEPSPs	Potenciais pós-sinápticos excitatórios lentos

SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
SOM	Somatostatina
TGI	Trato Gastrointestinal
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
VPAC1	Receptor Peptídeo Intestinal Vasoativo tipo 1

ARTIGO

AB pH1.0	Alcian Blue pH 1.0
AB pH2.5	Alcian Blue pH 2.5
ACh	Acetylcholine
AF	Alexa fluor
AUC	Area under the curve
BSA	Bovine serum albumin
B.W	Body weight
BuChE	Butyrylcholinesterase
Calr ⁺	Calretinin
ChAT ⁺	Choline acetyltransferase
CMMCs	Colonic migratory motor complexes
DC	Distal colon
DL50	Lethal dose 50
DPN	Days postnatal
GIT	Gastrointestinal tract
HE	Hematoxylin and Eosin
HuC/D ⁺	Hu protein (was counted for the evaluation of the total population)
IR	Immunoreactive neurons
M10	Malathion 10mg/kg
M50	Malathion 50mg/kg
MAL	Malathion
MDC	Middle distal colon
MP	Myenteric plexus
MPC	Middle proximal colon
Nb	number

nNOS ⁺	Neuronal nitric oxide synthase
NO	Nitric oxide
NOLA	Nitric oxide synthase inhibitor - N-omega-nitro-L-arginine
OP	Organophosphate
P	Plexus
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Proximal colon
SP	Submucosal plexus
UEL	State University of Londrina
VIP	Intestinal vasoactive peptide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	AGROTÓXICOS/PESTICIDAS.....	21
2.1.1	Toxicidade Dos OF	27
2.2	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO	29
2.2.1	Estrutura Do Trato Digestório	29
2.2.2	Estrutura Do Sistema Nervoso Entérico	32
3	OBJETIVOS	41
3.1	OBJETIVO GERAL	41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Exposition to Low Dose of Malathion Causes Morpho-Physiological Changes in The Colon of Rats	42
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	97
	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo 137/2016	97
	ANEXO B – Diretrizes Gerais para Preparação de Manuscritos para submissão de artigo na The Journal of Physiology.....	98

1. INTRODUÇÃO

A Dengue é uma doença muito antiga e que ressurgiu no final do último século, principalmente devido à distribuição geográfica bastante ampliada, tanto para o vírus quanto dos mosquitos vetores, passando a ser considerada, a doença infecciosa tropical mais importante depois da malária, isso ainda no ano de 1998. O aumento da atividade epidêmica, e da circulação de novas variantes do vírus (hiperendemicidade), além do surgimento da dengue hemorrágica em novas regiões geográficas, foram determinantes para isto ocorrer (GUBLER, 1998; ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000).

Além das doenças causadas pelo vírus do Dengue, houve a introdução de novas doenças como as causadas pelo vírus Zika e o vírus Chikungunya, e que possuem um ponto em comum, ambas são transmitidas pelo mesmo mosquito vetor: o *Aedes aegypti* e que continuam sendo objetivos de grave atenção no problema de saúde pública nacional e mundial (GUBLER, 1998; ISTÚRIZ; GUBLER; BREA DEL CASTILLO, 2000).

O mosquito vetor *Aedes aegypti* está extremamente adaptado à reprodução em ambientes urbanos, através da postura de ovos em recipientes que acumulam água parada. A água da chuva acumulada é um facilitador, podendo acumular mesmo em pequenos reservatórios como copos descartáveis, pneus, plantas, cisternas e/ou grandes reservatórios de água abertos próximos as populações. Esses reservatórios são importantes armazenadores de grande quantidade ovos que, que irão gerar inúmeros mosquitos adultos (GUBLER, 1998).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, passou a publicar a partir do ano de 2007, dados epidemiológicos da doença com a primeira publicação em 01/07/2007, trazendo relatos e recomendações para o combate e controle do mosquito (SVS, 2007), no ano de 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) elaborou diretrizes para fornecer informações práticas e atualizadas, sobre a gestão clínica e entrega de serviços clínicos; a gestão de vetores e prestação de serviços de controle de vetores; testes de diagnóstico; e vigilância, preparação e resposta a emergências. As diretrizes orientam para a utilização de métodos de controle de vetores, que incluem a eliminação ou manejo dos habitats, como os larvicidas e com

1 inseticidas, e o uso de agentes biológicos e a aplicação de adulticidas (WHO; FOR;
2 TDR, 2009).

3 As Diretrizes Nacionais para Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue,
4 orientam para várias medidas na prevenção ou redução da transmissão do vírus, das
5 referidas doenças e que dependem do controle dos mosquitos vetores, principalmente
6 dos mosquitos fêmeas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE
7 VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

8 Podem ser utilizados vários métodos para o combate ao mosquito e ser
9 realizado por diversas maneiras, através da utilização de pesticidas químicos como
10 forma de controle do mosquito vetor nas diversas fases de vida, como as larvária e a
11 adulta (WHO; FOR; TDR, 2009).

12 Os métodos de controle químico que visam vetores na fase adulta, têm
13 como objetivo, causar impacto na densidade populacional dos mosquitos e também
14 em sua longevidade, como os adulticidas, que podem ser aplicados como tratamentos
15 de superfície residual ou espaciais, com a utilização de carros fumacês (BRASIL.
16 MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2009).

17 Já foram utilizados vários tipos de pesticidas adulticidas no combate ao *Aedes*
18 *aegypti*, como o Deltametrina da classe dos piretroídes, muito utilizado no Brasil para
19 este fim, porém com a utilização frequente, acabou em resultar na geração de
20 mosquitos resistentes a este composto (FONTOURA, 2008). Outros pesticidas
21 também utilizados, pertencem a classe dos organofosforados (OF) e carbamatos que
22 atuam no Sistema Nervoso Central (SNC) dos insetos (BRAGA; VALLE, 2007).

23 Para o combate ao mosquito *Aedes aegypti* no ano de 2020 foram distribuídos
24 para todos os estados os pesticidas larvicida Pyriproxyfen, o adulticida CIELO(R) e o
25 adulticida Fludora(R) (SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE); MS
26 (MINISTÉRIOS DA SAÚDE), 2020), porém o adulticida utilizado no Brasil até o meio
27 do ano de 2020 foi o Malation (MAL) da classe dos OF.

28 O MAL é um inseticida de amplo espectro muito utilizado em todo o mundo para
29 fins agrícolas para melhorar a produção de alimentos, para fins domésticos em jardins
30 e no tratamento de parasitas, e na saúde pública para o controle de vetores
31 transmissores de doenças (TCHOUNWOU et al., 2015).

1 Os OF são classificados como moderados ou fracamente polares. Em relação
2 à meia vida são moderados ou não persistentes, e na classificação toxicológica
3 pertencem a classe IV (pouco tóxico) dependendo da fonte (WHO; FOR; TDR, 2009).
4 Eles agem inibindo a acetilcolinesterase (AChE) levando a um acúmulo de acetilcolina
5 (ACh) nas fendas sinápticas nos SNC e parassimpático principalmente nas conexões
6 neurais dos músculos, e conseqüentemente o excesso de ACh interrompe a
7 propagação do impulso nervoso através das sinapses colinérgicas neuronais
8 (SARABIA; MAURER; BUSTOS-OBREGÓN, 2009). Todavia, os inseticidas são
9 compostos químicos muito prejudiciais ao ambiente de acordo com a dose de
10 utilização e via de exposição (BONILLA et al., 2008).

11 O MAL pode ser absorvido por diversas vias, sendo a via oral uma das
12 principais. Após a sua absorção, ele é transportado para vários órgãos e tecidos,
13 incluindo o fígado onde ocorre a metabolização e a formação do metabólito ativo
14 malaoxon, considerado muito mais tóxico que o MAL (TCHOUNWOU et al., 2015). A
15 toxicidade do MAL poder variar de acordo com a Dose Letal 50 (DL50) e a via de
16 exposição, sendo que na via oral em ratos este pode variar de 1500 a 2000 mg/kg
17 (EPA, 2000).

18 A exposição ao MAL está associada a diversas patologias, como as doenças
19 metabólicas (LASRAM et al., 2009), de desequilíbrio do sistema antioxidante que
20 resulta dos efeitos do estresse oxidativo (ALP et al., 2012), das alterações no sistema
21 imunológico (NAIN et al., 2011), o desenvolvimento de inflamação e hepatotoxicidade
22 (KALENDER et al., 2010) entre outras. Também podem ocorrer efeitos agudos nas
23 populações expostas ao MAL, como dificuldade respiratória (CHOI et al., 1998),
24 distúrbios cardiovasculares (DIVE et al., 1994) e transtornos gastrointestinais
25 (RIVETT; POTGIETER, 1987).

26 O trato gastrointestinal (TGI) é caracterizado principalmente por possuir um
27 sistema nervoso próprio denominado de sistema nervoso entérico (SNE), onde estão
28 localizados muitos neurônios responsáveis pelo controle da função gastrointestinal
29 (FURNESS et al., 2014; GUYTON; HALL, 1997).

30 Diante disto, verificou-se na literatura, que a utilização deste composto poderia
31 ocasionar danos ao organismo e ao sistema gastrointestinal, como citado em alguns
32 estudos, que avaliaram a toxicidade aguda e crônica, que demonstraram os efeitos

1 causados após exposições ao MAL (GUPTA; PAUL, 1974; STEVENS, 1974). Em um
2 modelo de exposição agudo de MAL em ratos Wistar, resultou em alterações no TGI
3 com diminuição acentuada da atividade de enzimas e redução da absorção intestinal
4 (CHOWDHURY et al., 1980). Em outro estudo de exposição ao MAL, ratos machos
5 Wistar foram expostos ao MAL (50 mg/kg de peso corpóreo) por 45 dias e
6 demonstraram diversas alterações nas funções intestinais (ANTON et al., 2000).
7 Mesmo assim ainda há escassos estudos no cólon com a utilização de OF e com
8 doses baixas em comparação com a DL50 oral para ratos.

9 Portanto, este estudo tem grande aplicabilidade ao avaliar os efeitos da
10 exposição oral ao MAL em ratos jovens e por um longo período de exposição, através
11 da administração de doses consideradas baixas sobre o sistema digestório de ratos.

1 2. REVISÃO DE LITERATURA

2

3 2.1 AGROTÓXICOS/PESTICIDAS

4 Diversas são as denominações que podemos utilizar para identificar muitas
5 substâncias químicas, e que são utilizadas no controle de pragas e doenças de
6 plantas, como os agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios
7 de planta ou veneno.

8 No Brasil até a Constituição de 1988 (publicada em 1989), tratava esse grupo
9 de produtos químicos por defensivos agrícolas, o que pelo seu próprio significado,
10 excluía os agentes utilizados nas campanhas sanitárias urbanas. Porém com a Lei
11 Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 esse grupo de produtos químicos passou a
12 ser tratados como agrotóxicos, que são os produtos e os agentes de processos físicos,
13 químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no
14 armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção
15 de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes
16 urbanos, hídricos e industriais. Cujas finalidades sejam alterar a composição da flora ou
17 da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos, considerados nocivos
18 (CONHECIMENTO; AMBIENTE, 2014). Esta lei dispõe sobre as atividades realizadas
19 com agrotóxicos no território nacional, desde a sua produção ou importação até o
20 destino de seus resíduos e embalagens.

21 As disposições da lei federal do uso de agrotóxicos foram regulamentadas pelo
22 Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Nela foram incluídos aspectos quanto ao
23 uso de agrotóxicos como a classificação, certificação de prestadores de serviços,
24 transporte, aplicação, segurança para os trabalhadores e destino dos resíduos e
25 embalagens vazias. Em 2005 o Ministério do Trabalho criou a Norma
26 Regulamentadora de Segurança e Saúde no Trabalho na Agricultura, Pecuária,
27 Silvicultura, Exploração Florestal e Aquicultura, a NR nº 31, estabelecendo os
28 preceitos, a serem observados na organização e no ambiente de trabalho, em
29 qualquer atividade da agricultura, incluindo as atividades industriais desenvolvidas no
30 ambiente agrário.

1 Do ponto de vista mundial consta na literatura internacional em língua inglesa,
2 que o grupo de substâncias/produtos químicos aqui definido como agrotóxicos, recebe
3 a denominação de pesticida (*pesticide*). E assim é denominada segundo a Food and
4 Agriculture Organization (FAO) e a Organização das Nações Unidas (ONU),
5 responsáveis pelas áreas de agricultura e alimentação, que definem os
6 agrotóxicos/pesticidas como qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas
7 para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças
8 humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de
9 danos durante (ou interferindo) na produção, processamento, estocagem, transporte
10 ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que deva
11 ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que
12 acometem os corpos de animais de criação (FAO, 2003).

13 Pesticidas constituem uma categoria heterogênea de substâncias químicas,
14 para a finalidade do controle de pestes como os insetos presentes nas plantações e
15 também os vetores transmissores de doenças, sendo amplamente utilizado na
16 agricultura e também nas campanhas de saúde pública (BOLOGNESI, 2003).

17 Um pesticida ideal seria aquele que consegue atacar as pragas-alvo de forma
18 eficaz e causar menor ou nenhum problema de saúde para outras espécies, incluindo
19 os humanos (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009). Entretanto, a grande
20 maioria dos pesticidas, quando utilizados podem sofrer transformações como as
21 fotoquímicas e produzir metabólitos secundários, que podem ser mais tóxicos para
22 os seres humanos e para o meio ambiente que o composto primário (JOKANOVIĆ,
23 2001; ZAMY; MAZELLIER; LEGUBE, 2004).

24 Dentro do grupo dos agrotóxicos/pesticidas, eles podem ser classificados
25 quanto a natureza da praga/alvo, como os inseticidas (no controle de insetos),
26 fungicidas (fungos), herbicidas (plantas invasoras), desfolhantes (folhas indesejadas),
27 fumegantes (bactérias do solo), rodenticidas/raticidas (roedores/ratos), moluscocidas
28 (moluscos), nematocidas (nematoides) e os acaricidas que combatem os ácaros
29 (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

30 Os agrotóxicos/pesticidas podem também ser classificados de acordo com sua
31 Dose Letal 50 (DL50), ou seja, de acordo com a quantidade de uma determinada
32 substância que é necessária ingerir ou administrar, para provocar a morte de pelo

1 menos 50% da população em estudo como demonstrada na tabela 1 (OPAS; OMS,
2 1996):

3 **Tabela 1** – Classificação toxicológica:

Classe toxicológica	Classificação	DL50 oral ratos	Rótulo
I	Extremamente tóxico	<5mg/kg	Vermelho
II	Altamente tóxico	>5 até 50mg/kg	Amarelo
III	Moderadamente tóxico	>50 até 500mg/kg	Azul
IV	Pouco tóxico	>500mg/kg	Verde

4

5 **Fonte:** (OPAS; OMS, 1996) modificada pelo próprio autor

6

7 A toxicidade causada pelos pesticidas, e principalmente pelos pertencentes a
8 classe dos organofosforados (OF), tem se tornado um grave problema de saúde
9 mundial. No entanto estes compostos ainda são muito utilizados na agricultura e para
10 algumas medidas de prevenção e redução de mosquitos vetores de doenças
11 perigosas, como as que são transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti* vetores do
12 vírus do Dengue, Zika, Chikungunya e da febre amarela. Sendo ainda a utilização de
13 pesticidas químicos somado a outros métodos, eficaz para o controle dos mosquitos,
14 principalmente em relação às fêmeas adultas (WHO; FOR; TDR, 2009).

15 Inicialmente, os pesticidas organoclorados foram utilizados no controle da
16 malária e do tifo, principalmente na Índia, mas sua utilização foi proibida ou restringida
17 na década de 60 devido a sua alta toxicidade. Em consequência houve a liberação e
18 utilização de novas classes de pesticidas, como os carbamatos, os piretroídes e os
19 OF (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY, 2009).

20 O OF malation (MAL) é muito utilizado em todas as regiões do mundo,
21 principalmente por ser considerado de baixa toxicidade, quando comparado a outros
22 OF, porém como consequência da utilização indiscriminada, veem expondo a
23 população mundial quase que diariamente a diversas fontes de

1 utilização/contaminação por estes pesticidas (AKTAR; SENGUPTA; CHOWDHURY,
2 2009; BADR, 2020).

3 Os pesticidas OF são facilmente absorvidos pela pele, pelo trato respiratório e
4 pelo TGI sendo que muitas vezes sua absorção é favorecida pelos solventes
5 presentes em suas formulações (COLOSIO; TIRAMANI; MARONI, 2003;
6 JEYARATNAM; MARONI, 1994). Dentre as vias de absorção, a cutânea é favorecida
7 quando em temperaturas elevadas ou por lesões na pele, sendo um das principais
8 vias de exposição relacionadas aos trabalhadores da agricultura as via cutânea e a
9 respiratória. Porém, a falta de equipamentos de proteção individual e a má
10 higienização das mãos, antes da alimentação nos locais de trabalho em áreas
11 contaminadas, torna a via oral também uma via das mais importantes na exposição a
12 intoxicação.

13 Os OF, depois de absorvidos pelo corpo, sofrem diversas reações de
14 biotransformação. A maioria destes compostos são geralmente lipofílicos, que
15 favorece a incorporação nas membranas e penetração nas células, além de provocar
16 perturbações físicas e químicas e presumivelmente disfunção das membranas
17 (SELMÍ; EL-FAZAA; GHARBI, 2012; VIDEIRA et al., 2001). As reações de
18 biotransformação que ocorrem, são direcionadas principalmente para a formação de
19 metabólitos muito tóxicos, que mesmo em baixas quantidades (5%) podem ser muito
20 significativas do ponto de vista toxicológico (JOKANOVIĆ, 2001).

21 A intoxicação dos OF, resulta da interação das moléculas com seus respectivos
22 alvos, sendo que o início, a gravidade e a duração dos sintomas são determinados
23 pela dose ou concentração, a duração da exposição, a via, as propriedades físico-
24 químicas, a taxa de metabolização, a degradação enzimática e o envelhecimento das
25 colinesterases (KAMANYIRE, 2004; KARALLIEDDE; EDWARDS; MARRS, 2003).

26 O MAL, Dietil 2-dimetoxifosfinotioilsulfanedioilbutanodissulfato - $C_{10}H_{19}O_6PS_2$
27 (IUPAC, 2016) é um pesticida/inseticida que não ocorre naturalmente, ou seja, é um
28 composto químico desenvolvido em laboratório. Quando puro, o MAL é um líquido
29 incolor, já o MAL de qualidade técnica que contém > 90% de MAL e mais impurezas
30 em um solvente, é um líquido amarelo-amarronzado que cheira a alho, muito utilizado
31 para matar insetos em plantações agrícolas e em jardins, para tratar piolhos em

1 humanos e para tratar pulgas em animais de estimação, também é usado para matar
2 mosquitos em grandes áreas externas (ATSDR, 2011).

3 É um dos inseticidas OF amplamente usado na agricultura e em programas de
4 saúde pública (COLOSIO; TIRAMANI; MARONI, 2003; MARONI et al., 2000). Isso
5 ocorre principalmente por possuir toxicidade relativamente baixa nos mamíferos e
6 seletividade alta para insetos quando comparados com outros inseticidas OF. Uma
7 vez que, os insetos, os alvos do MAL, possuem baixos níveis ou ausência da enzima
8 carboxiesterases, que são responsáveis por hidrolisar e detoxicar os OF, como o MAL,
9 havendo a liberação do mesmo e seus metabólitos com menor e/ou nenhuma
10 toxicidade através da urina ou das fezes (CHAMBERS; MEEK; CHAMBERS, 2010).
11 Por isso os insetos são gravemente afetados pela toxicidade do MAL, uma vez que
12 ocorre uma decomposição hidrolítica muito mais lenta nestes organismos (BŁASIAK
13 et al., 1999; FUKUTO, 1990; JOKANOVIĆ, 2001). As carboxiesterases são enzimas
14 que estão amplamente distribuídas no tecido dos mamíferos, com níveis mais
15 elevados no fígado, porém também são encontradas ainda no trato gastrointestinal
16 (TGI) e no cérebro (BRODEUR; DUBOIS, 1967; BURATTI et al., 2005; BURATTI;
17 TESTAI, 2005).

18 Todavia, mesmo nos mamíferos a exposição ao MAL pode oferecer riscos, uma
19 vez que a toxicidade do MAL também está altamente correlacionada com seus
20 metabólitos, e ainda por contaminantes nas formulações de MAL (BAIOMY et al.,
21 2015). Dependendo do grau de pureza de algumas formulações comerciais, o MAL
22 pode possuir contaminantes como o seu próprio metabolito primário o malaoxon, que
23 são potentes inibidores das carboxiesterases, resultando no desequilíbrio no processo
24 de desintoxicação e/ou biotransformação, e conseqüentemente ocorrer aumento
25 significativo na formação de mais malaoxon, e conseqüentemente, o agravamento e
26 aumento da toxicidade do mesmo (BURATTI et al., 2005).

27 O análogo bioativado do MAL o malaoxon (BŁASIAK et al., 1999; BLASIAK;
28 STAŃKOWSKA, 2001; HAZARIKA et al., 2003) é considerado até 40 vezes mais
29 tóxico que o MAL (BADR, 2020; BAIOMY et al., 2015), esse metabolito primário, é
30 formado como um produto de sua degradação ambiental, estando também disponível
31 para exposição humana direta (EPA, 2009, 2011).

1 A ativação metabólica do MAL, é mediada pelo citocromo P-450 para a
2 toxicidade colinérgica, através da forma do metabolito primário ativo malaoxon
3 (ABDOLLAHI et al., 2004; GUYTON; HALL, 1997). A taxa de conversão deste
4 metabolito, é o que determinará a toxicidade e o tempo de início dos sintomas após a
5 exposição (BADR, 2020; BAIOMY et al., 2015; KARALLIEDDE; EDWARDS; MARRS,
6 2003).

7 O MAL é absorvido rapidamente por diferentes vias e após distribuído para
8 diferentes órgãos do corpo, podendo acarretar no desenvolvimento de diversas
9 patologias (SELMI et al., 2018). As vias de absorção da maioria dos OF e
10 especialmente do MAL, deve-se principalmente aos agentes serem solúveis em
11 lipídios, o que facilita a absorção pela pele, pelas membranas das mucosas orais, pela
12 conjuntiva, pelo TGI e respiratório (KAMANYIRE, 2004). A principal via de absorção
13 para a toxicidade aguda do MAL ocorre principalmente pela via oral (ESEN; UYSAL,
14 2018) através da ingestão de alimentos e água contaminadas (AKBEL et al., 2018;
15 SAPBAMRER; HONGSIBSONG, 2014).

16 Na exposição ocupacional, ela pode ocorrer principalmente através da via
17 dérmica (GENG et al., 2015; TCHOUNWOU et al., 2015), conjuntival (KAMANYIRE,
18 2004), e ainda pela via respiratória através da exposição principalmente dos
19 trabalhadores, que durante a pulverização do inseticida, podem entrar em contato com
20 o solo e plantas contaminados, ou mesmo com as formulações. Outra população
21 também exposta são as dos trabalhadores das fábricas de produção dos pesticidas,
22 e a poluição em geral nos casos de derramamentos acidentais (MACHERA et al., 2003;
23 OZSOY et al., 2016).

24 Aproximadamente metade do MAL e seus metabólitos são absorvidos nas
25 primeiras 8 horas, porém, possuem potencial de acumulação relativamente baixo e
26 são excretados 24 horas após o contato, principalmente pelo via renal, seguido pelo
27 pulmão e pela via intestinal (TCHOUNWOU et al., 2015). Estes metabólitos
28 excretados na urina podem ser utilizados como biomarcadores da exposição (CHEN
29 et al., 2013).

30

31

1 2.1.1 Toxicidade Dos OF

2 O mecanismo de ação e toxicidade do MAL e seu metabólito malaoxon se deve
3 através da ação de seus metabólitos na inibição de dois tipos de colinesterases: a
4 acetilcolinesterase (AChE), que é encontrada principalmente nas sinapses no sistema
5 nervoso central (SNC), parassimpático e em eritrócitos, e a butirilcolinesterase
6 (BuChE), encontrada no plasma, intestino, e em menor concentração em outros
7 tecidos (HSIAO et al., 1996; REID; CHILUKURI; DARVESH, 2013). A inibição das
8 colinesterases ocorre através de uma ligação covalente por meio de fosforilação do
9 grupo serina hidroxila, levando a inativação de enzima ocasionando acúmulo de
10 acetilcolina (ACh) nas fendas sinápticas.

11 Este excesso de ACh, causa superestimulação dos músculos e centros
12 nervosos do SNC, periférico ou autônomo através da ligação com os receptores
13 muscarínicos e nicotínicos (KAMANYIRE, 2004; KAUR; KAUR, 2018; SAADEH;
14 FARSAKH; AL-ALI, 1997) levando a ocorrência de uma gama de manifestações
15 colinérgicas (MILESON, 1998; SAPBAMRER; HONGSIBSONG, 2019).

16 Os efeitos das ligações nos receptores podem ser classificados em 3 fases ou
17 seja, produzem um efeito trifásico bem estabelecido no homem, devido ao aumento e
18 duração dos efeitos da ACh na fenda sináptica, e na intoxicação aguda (MILESON,
19 1998). A fase colinérgica inicial pode durar de 24 a 48 horas devido ao acúmulo de
20 ACh nas sinapses muscarínicas, nicotínicas e do SNC sendo este caso de emergência
21 médica, e que necessita frequentemente de tratamento em uma unidade de terapia
22 intensiva. A síndrome intermediária se instala em 2 a 4 dias após a exposição inicial
23 devido à disfunção pré e pós-sináptica na junção neuromuscular, levando a
24 insuficiência respiratória grave (SENANAYAKE; KARALLIEDDE, 1987).

25 A polineuropatia retardada, característica da fase 3 se instala em cerca de 7 a
26 21 dias após a exposição devido à fosforilação da esterase alvo da neuropatia, que
27 causa grave fraqueza motora simétrica dos músculos periféricos com um grau variável
28 de deficiência sensorial (SENANAYAKE, 1999; SENANAYAKE; KARALLIEDDE,
29 1987).

30 Os achados clínicos são clássicos no exame físico, dependendo da resposta
31 do receptor colinérgico estimulado (LOTT; JONES, 2020). O excesso de ACh nos

1 receptores muscarínicos leva ao aumento dos sintomas de secreções, salivação,
2 lacrimejamento e sudorese, broncoconstrição, bradicardia, aumento da motilidade
3 gastrointestinal, diarreia, cólicas e vômitos, no olho produzirá miose e visão
4 embaçada. Nos receptores nicotínicos podem causar fasciculações ou paralisia
5 muscular devido à ativação da junção neuromuscular, no SNC pode causar confusão,
6 dor de cabeça ou sonolência. Levando também ao aumento dos níveis séricos de
7 creatinina e lactato desidrogenase (KAMANYIRE, 2004; KAUR; KAUR, 2018;
8 SAADEH; FARSAKH; AL-ALI, 1997; SENANAYAKE, 1999). Casos mais graves
9 podem, causar depressão central, resultando em fala arrastada, convulsões, coma,
10 depressão respiratória o que pode até mesmo ocasionar em óbito (LOTT; JONES,
11 2020).

12 Após a exposição há relatos de maior frequência de infecções do trato
13 respiratório superior, principalmente em trabalhadores expostos ocupacionalmente, e
14 caracterizado por diminuição da atividade da colinesterase sanguínea. Há relatos
15 também de hiperamilasemia e pancreatite aguda após exposição oral ou dérmica,
16 relacionados ao quadro clínico grave e presença de choque. Também ocorreram
17 complicações cardíacas, como hipotensão/hipertensão e arritmias e até mesmo
18 parada cardíaca. Foram relatados também casos de diarreia profusa frequente. Ainda
19 nas pesquisas foram observados casos de teratogenicidade severa e até mesmo a
20 interrupção da gravidez ainda no primeiro trimestre (ATSDR, 2011; CDC, 2018; GAO
21 et al., 2018).

22 As intoxicações podem ser classificadas em agudas, quando ocorre o contato
23 por uma ou duas vezes durante uma semana (LU et al., 2011). A exposição é
24 denominada crônica por OF quando ocorre em um espaço de tempo superior a 10%
25 do tempo médio de vida da espécie (DELGADO et al., 2006; FORTUNATO et al.,
26 2006). Os efeitos danosos em decorrência da exposição ao MAL, abrangem os
27 diferentes sistemas do organismo (GUPTA; PAUL, 1974; STEVENS, 1974).

28 Diversas são as patologias relacionadas devido a exposição aos OF como o
29 MAL, podendo interferir na função ovariana (BHARDWAJ; SARAF, 2014), também
30 nas propriedades imunomodulatórias no baço e inflamação e indução de estresse
31 oxidativo no fígado (EL-BINI DHOUIB et al., 2015), além de ativar e desencadear
32 diversas respostas inflamatórias. Em camundongos onde o MAL estimulou a geração

1 de espécies reativas de oxigênio por macrófagos (RODGERS, 1997), potencializou a
2 fagocitose de macrófagos e a apresentação de antígenos (FLIPO et al., 1992).

3 No SNC, as exposições subcrônica, crônicas ou repetidas aos OF em níveis
4 que não estão associados a toxicidade aguda, podem resultar em uma variedade de
5 sintomas neurocomportamentais, com déficits cognitivos como deficiências
6 neurológicas ou neuropsicológicas (BADR, 2020; GLASS et al., 2018; NAUGHTON;
7 TERRY, 2018), como a causa da patogênese de doenças neurodegenerativas, como
8 a doença de Parkinson e de Alzheimer, que também estão associadas à exposição
9 aos OF (BELIN et al., 2012).

10 O MAL é classificado como o quarto componente que afeta diretamente o SNC
11 (BHARDWAJ et al., 2018). Em estudos com ratos expostos com o MAL, foi
12 demonstrado a degeneração neuronal no córtex e no hipocampo, associada a uma
13 diminuição significativa na densidade de neurônios viáveis em diferentes regiões do
14 cérebro (AHMED et al., 2017; F SÁNCHEZ-SANTED, 2016). Causando sintomas de
15 fraqueza muscular e fadiga, devido a toxicidade associada aos danos ao sistema
16 nervoso e ao cérebro (KARAMI-MOHAJERI et al., 2014; REZG et al., 2015).

17 A neurotoxicidade induzida por MAL além de causar a inibição da AChE, ainda
18 envolve outros mecanismos não colinérgicos adicionais, como estresse oxidativo,
19 neuro inflamação, disfunções no transporte axonal e pode favorecer a necrose e
20 apoptose (AHMED et al., 2017; F SÁNCHEZ-SANTED, 2016).

22 2.2 SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

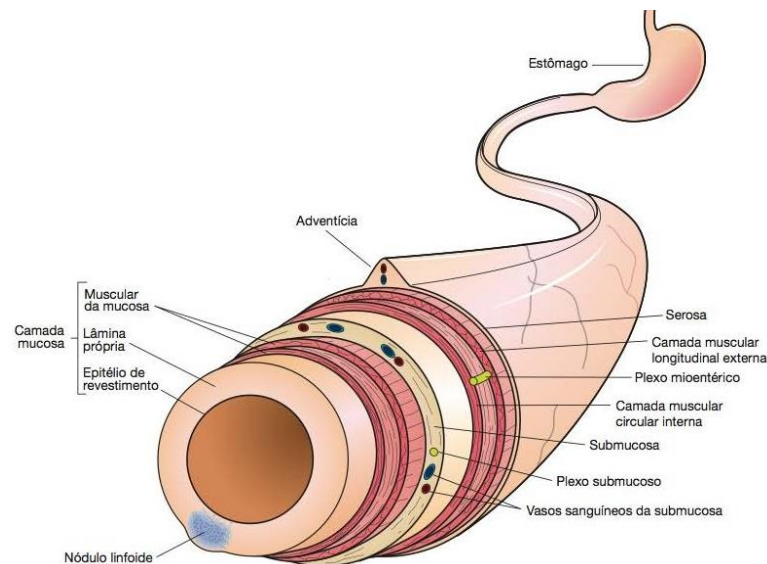
24 2.2.1 Estrutura Do Trato Digestório

25 O sistema digestório é composto pelo tubo digestório e por órgãos/glândulas
26 anexas como glândulas salivares, o pâncreas, o fígado e vesícula biliar. Todo o
27 sistema digestório funciona de forma coordenada, com a participação e função
28 específica de cada órgão, iniciando o processo de digestão ainda na cavidade oral,
29 passando pelo esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso (cólon) que

1 juntos tem a função de digestão e absorção de nutrientes para a manutenção da vida
 2 a partir dos alimentos ingeridos. O tubo digestório é um tubo muscular revestido por
 3 epitélio, que se estende desde a cavidade oral até o canal anal (ânus), pode ser
 4 chamado também de canal alimentar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; THOMPSON;
 5 DELAFOREST; BATTLE, 2018).

6 Os componentes do TGI possuem características estruturais comuns,
 7 formados por um tubo oco composto por um lúmen, circundado por uma parede
 8 formada por camadas distintas. Em contato com o lúmen está a camada mucosa, na
 9 sequência a submucosa, a muscular e, por fim, a camada serosa ou a adventícia
 10 (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

11



12

13 **Figura 1:** Representação esquemática do trato digestivo com as camadas da parede (JUNQUEIRA;
 14 CARNEIRO, 2013).

15 A camada mucosa consiste em um revestimento epitelial que é sustentado pela
 16 lâmina própria, uma camada de tecido conjuntivo frouxo, e a muscular da mucosa,
 17 que separa a camada mucosa da submucosa e geralmente consiste em duas
 18 subcamadas delgadas de células musculares lisas, uma circular interna e outra
 19 longitudinal externa. Nela encontramos pregas que aumentam a área de superfície de
 20 contato. A camada submucosa consiste em tecido conjuntivo denso não modelado
 21 (MICHAEL H. ROSS, 2011), onde podemos encontrar grandes vasos sanguíneos e
 22 linfáticos, e gânglios entéricos denominado plexo submucoso (PS) também chamado
 23 de plexo de Meissner. Na camada muscular são encontradas duas subcamadas de

1 músculo liso de acordo com a direção principal seguida pelas células musculares,
2 onde também se encontram entre as duas subcamadas musculares gânglios entéricos
3 que formam o plexo mioentérico (PM) ou plexo de Auerbach. A camada muscular
4 circular (interna) e longitudinal (externa) envolve as camadas mucosa e submucosa e
5 gera as forças peristálticas que movem o conteúdo na luz do intestino (Figura 1)
6 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; THOMPSON; DELAFOREST; BATTLE, 2018).

7 A superfície da mucosa intestinal é revestida por uma camada de células
8 epiteliais colunares, polarizadas e uma região subepitelial onde está a lâmina própria,
9 a qual é formada de tecido conjuntivo frouxo com algumas células musculares e é
10 delimitada pela muscular da mucosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; TURNER,
11 2009). No epitélio da mucosa intestinal podemos encontrar diferentes tipos celulares
12 que fazem parte da barreira intestinal contribuindo de diferentes formas para proteção
13 do organismo, e são classificados de acordo com à sua natureza e localização
14 anatômica (SALVO-ROMERO et al., 2015). Os principais tipos celulares do epitélio
15 intestinal são enterócitos, células caliciformes responsáveis por síntese de mucinas,
16 células enterocromafins que produzem hormônios e células tronco. Ainda podemos
17 encontrar outros tipos de células de defesa como os linfócitos intraepiteliais (QIN et
18 al., 2008). Diferentemente do intestino delgado, o epitélio colônico é caracterizado por
19 uma alta densidade de células caliciformes e ausência de células de Paneth
20 (BARKER, 2014).

21 No intestino grosso de uma maneira geral podemos destacar como sua
22 principal função, a absorção de 90% da água restante da digestão, transformando
23 assim o quimo semilíquido em fezes semissólidas, e produção de muco. (KOCH,
24 2003). Sendo então o revestimento epitelial interno organizado em várias criptas que
25 estão associadas a uma superfície luminal plana que facilita a absorção (BARKER,
26 2014).

27 Uma camada de gel hidratado formado por mucinas, secretada principalmente
28 pelas células caliciformes, e que possuem propriedades hidrofóbicas e surfactantes,
29 reveste o epitélio intestinal, dificultando a aderência de bactérias ao epitélio intestinal
30 (TURNER, 2009). A camada de muco aderido ao epitélio, um pouco mais denso,
31 chamada de glicocálice facilita a absorção de nutrientes, preserva a hidratação
32 epitelial e protege o revestimento epitelial, e tem papel na renovação e diferenciação
33 epitelial (AOKI; MORISHITA; TAKAYAMA, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

1 A secreção de muco tem como papel, a proteção das células epiteliais de
2 patógenos, bem como de ácidos, enzimas digestivas e da abrasão de partículas de
3 alimentos (KEMMERLY; KAUNITZ, 2014; SOENEN et al., 2016). O cloro e a água são
4 secretados para o lúmen intestinal através dos enterócitos, com a função de proteção
5 contra a colonização bacteriana, e de retardar a apresentação do antígeno por meio
6 de um efeito dilucional sobre o conteúdo intestinal (SALVO-ROMERO et al., 2015).

7 Na lâmina própria, estão os macrófagos, células dendríticas e linfócitos e às
8 vezes neutrófilos. Existe um tecido linfóide organizado como placas de Peyer, onde
9 podemos encontrar também as células M que também estão no epitélio, células
10 dendríticas e linfócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SALVO-ROMERO et al.,
11 2015).

12 A barreira da mucosa é influenciada diretamente pelos nervos eferentes vagais
13 e/ou simpáticos extrínsecos, ou nervos entéricos por meio de efeitos diretos via ACh
14 ou Peptídeo Vasoativo Intestinal (VIP) nas células epiteliais, expressão de proteínas
15 de zona de adesão ou por meio da interação com células imunes (por exemplo,
16 mastócitos ou células plasmáticas) (CAMILLERI et al., 2012).

17 Os órgãos do TGI, e até mesmo regiões específicas dentro de um órgão,
18 desempenham funções especializadas, que somadas resultam na assimilação
19 eficiente de nutrientes e da proteção do organismo, quanto a ação de agentes nocivos,
20 e em particular, as características únicas do epitélio de cada órgão, fornecem a base
21 para as funções regionais específicas dos órgãos essenciais para a digestão e
22 absorção de nutrientes (THOMPSON; DELAFOREST; BATTLE, 2018).

23

24 2.2.2 Estrutura Do Sistema Nervoso Entérico

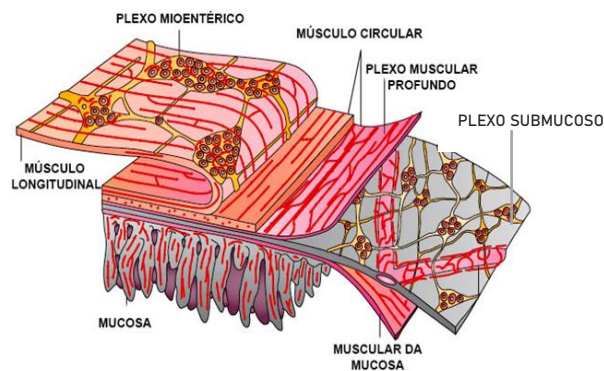
25 O TGI difere-se de outros órgãos por apresentar intrinsecamente em sua parede
26 um sistema nervoso próprio denominado sistema nervoso entérico (SNE), que é
27 responsável por coordenar o processo de digestão e absorção de nutrientes, de
28 passagem do conteúdo luminal ao longo do tubo digestório e pela regulação do fluxo
29 sanguíneo local (FURNESS, 2012; SASSELLI; PACHNIS; BURNS, 2012).

1 O que o torna único, é a capacidade de funcionar independentemente de
 2 estímulos neurais advindos do SNC, ou seja, quando ocorre um estímulo local, seja
 3 ele mecânico ou químico, a rede de neurônios presentes é capaz de gerar repostas
 4 neurogênicas autônomas (SPENCER; HU, 2020), regulando e controlando as funções
 5 do TGI por meio das vias simpáticas e parassimpáticas que também são reguladas
 6 pelo SNC (COSTANTINI et al., 2012).

7 O SNC faz a comunicação com o intestino através do eixo intestino-cérebro-
 8 intestino, principalmente por nervos que ligam o SNC ao SNE. O controle neural ocorre
 9 através da interação entre neurônios intrínsecos do SNE e neurônios extrínsecos do
 10 sistema nervoso autônomo parassimpático (vias vagais e pélvicas) e simpático (vias
 11 tronco-lombares). Ambos os neurônios sensoriais vagais e espinhais terminam em
 12 vários pontos dentro da parede intestinal, incluindo os músculos e o epitélio da
 13 mucosa, e desempenham um papel importante na transferência de informações do
 14 SNC para o SNE ou o contrário (BONAZ; BERNSTEIN, 2013; CALCAGNI; ELENKOV,
 15 2006; DE JONGE, 2013).

16 O SNE é composto principalmente por fibras nervosas e por dois plexos
 17 ganglionados com prolongamentos nervosos, que apresentam uma população
 18 heterogênea de corpos neuronais, com diferentes códigos químicos, projeções e
 19 funções. Os plexos ganglionados foram nomeados de acordo com sua localização
 20 dentro da parede intestinal. O primeiro deles encontra-se localizado dentro da camada
 21 submucosa e é chamado de plexo submucoso (PS) ou plexo de Meissner, já o plexo
 22 mioentérico (PM) ou plexo de Auerbach é aquele presente entre as camadas
 23 musculares circular e longitudinal (Figura 2) (FURNESS, 2012).

24



25

26 **Figura 2:** Organização do plexo mioentérico de humanos e mamíferos médios e grandes (FURNESS,
 27 2006).

1 Funcionalmente, o PM é responsável por coordenar a motilidade intestinal
2 promovendo a propulsão do conteúdo luminal, enquanto o PS irá promover o processo
3 de secreção, e absorção de água e sais minerais. Embora estas sejam funções
4 fisiológicas vitais para os seres vivos, ambos os plexos desempenham funções
5 importantes para a defesa do hospedeiro, tais como, alterações dos padrões de
6 motilidade e secreção frente a compostos tóxicos (FURNESS, 2006).

7 A camada mucosa também contém redes nervosas conhecidas como plexo
8 mucoso, que contém terminações nervosas que estão potencialmente em contato com
9 células apresentadoras de antígenos da mucosa, embora ainda não estão
10 determinadas tais associações (FURNESS, 2006, 2012).

11 Quando ocorrem alterações no lúmen intestinal o SNE é capaz de detectar as
12 mudanças locais e gerar uma resposta adequada através de um circuito neuronal
13 intrínseco (FUNG; VANDEN BERGHE, 2020). Os gânglios entéricos estão conectados
14 por segmentos interganglionares, onde podemos encontrar as populações de
15 neurônios e de células da glia entérica. O número de neurônios entéricos é muito
16 próximo ao número de neurônios da medula espinhal na mesma espécie (FURNESS,
17 2012).

18 Os neurônios entéricos são classificados de acordo com a função, morfologia,
19 características eletrofisiológicas e codificação química (FURNESS, 2006). A
20 classificação funcional identifica três tipos de neurônios: neurônios motores
21 (excitatórios, inibitórios, secretomotores e/ou vasodilatadores), interneurônios e
22 neurônios intrínsecos sensoriais (IPANs), os quais secretam diferentes
23 neurotransmissores (FURNESS, 2006; SARNA, 2010). Morfologicamente, a grande
24 maioria dos neurônios entéricos são de dois tipos: Dogiel tipo I monoaxonais com
25 dendritos lamelares e Dogiel tipo II que são multiaxonais com ou sem dendritos
26 (BREHMER; SCHRÖDL; NEUHUBER, 1999; FURNESS, 2006).

27 Com base em suas propriedades elétricas, os neurônios entéricos também
28 podem ser classificados como S (sináptico) tipo 1 e AH (pós-hiperpolarização) tipo II.
29 Ambos os tipos de neurônios geram potenciais pós-sinápticos excitatórios (EPSP)
30 lentos (sEPSPs) e EPSPs rápidos (fEPSPs). Cada EPSP rápido libera uma pequena
31 quantidade de neurotransmissor por um curto período de tempo, já os EPSP lentos
32 podem induzir uma longa série de potenciais de ação, resultando na liberação quase

1 contínua de neurotransmissores (SARNA, 2010). Os neurônios S são frequentemente
2 tônicos, e recebem entrada sináptica excitatória rápida e funcionam como
3 interneurônios e neurônios motores. Os neurônios AH são fásicos e têm um período
4 prolongado após a hiperpolarização, e servem a funções aferentes e interneuronais.
5 (WOOD, 1994; YUAN; BORNSTEIN; FURNESS, 1994).

6 A direção em que os neurônios se projetam está intrinsicamente relacionado
7 aos movimentos realizados pelo intestino. Por exemplo, os neurônios motores
8 excitatórios e motores inibitórios do plexo mioentérico projetam-se em direção ao
9 músculo circular e longitudinal do intestino provocando, desta forma, a contração ou
10 relaxamento, respectivamente. Essas funções estão relacionadas principalmente ao
11 tipo de neurotransmissor primário liberado, como o principal neurotransmissor de
12 neurônios motores excitatórios a ACh, e o óxido nítrico (ON) dos neurônios motores
13 inibitórios (LECCI, 2002; SANDERS et al., 2012).

14 Os neurônios do SNE também secretam além da ACh e o ON, um grande
15 número de outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo norepinefrina (NE),
16 adenosina trifosfato (ATP), VIP entre outros (FURNESS, 2006).

17 O ON tem a função de regular várias funções nos estados fisiológicos como
18 patológicos no TGI como também na maioria dos outros sistemas orgânicos. No TGI
19 contribui tanto para a manutenção da integridade e da circulação da mucosa, como a
20 regulação de secreções, no relaxamento da musculatura lisa ou ainda na inflamação
21 da mucosa (BÓDI; SZALAI; BAGYÁNSZKI, 2019; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012;
22 WALLACE, 2019).

23 A expressão/liberação de ACh e seus receptores não se limitam somente as
24 células do sistema nervoso, a enzima chave colina acetiltransferase (ChAT) é
25 virtualmente encontrada em todas as células humanas, em tecidos neuronais e não
26 neuronais incluindo células do sistema imunológico como os macrófagos e linfócitos
27 (GRANDO; KAWASHIMA; WESSLER, 2003). No contexto intestinal, diversos estudos
28 indicaram que uma variedade de tipos de células não neuronais têm a capacidade de
29 produzir ACh incluindo o epitélio, células imunes e fibroblastos (GRANDO;
30 KAWASHIMA; WESSLER, 2003; WESSLER et al., 2003).

31 A ACh pode se acoplar em dois subtipos distintos de receptores de ACh
32 (AChR), os receptores ACh nicotínicos (nAChRs) que são controlados por ligantes de

1 canais iônicos, e que consistem em doze subunidades distintas, nAChR α 2-10 e
2 nAChR β 2-4 (em camundongos) e os receptores ACh muscarínicos (mAChR1–5) que
3 são receptores acoplados à proteína G (GRANDO; KAWASHIMA; WESSLER, 2003;
4 KAWASHIMA et al., 1998). Dentro do SNC, os receptores nicotínicos localizados pós-
5 sinapticamente, permitem a transmissão sináptica rápida, enquanto os pré-localizados
6 modulam a liberação de neurotransmissores (MUSSINA; TOKTARKHANOVA;
7 FILCHAKOVA, 2021).

8 Os neurônios motores excitatórios contendo ChAT, na maioria, projetam-se
9 oralmente a partir do corpo celular, enquanto neurônios motores inibitórios com óxido
10 nítrico sintase neuronal (ONSn) se projetam em direção anal. A comunicação dos
11 neurônios motores é principalmente com as células musculares lisas que estão
12 localizadas no mesmo plano, já a comunicação oral e aboral ocorre principalmente
13 por meio de interneurônios que se projetam mais de 10 mm em cada direção e podem
14 retransmitir sinais por vários gânglios (PORTER et al., 1997). Os neurônios
15 mioentéricos nitrérgicos atuam como os principais agentes do reflexo inibitório
16 descendente do peristaltismo intestinal, e por isso, perda ou dano nesses neurônios
17 podem refletir diretamente no desenvolvimento de distúrbios da motilidade
18 gastrointestinal (BÓDI; SZALAI; BAGYÁNSZKI, 2019).

19 Os interneurônios no cólon são em grande parte Dogiel tipo I e são
20 responsáveis por receber e transmitir informações aos demais tipos neuronais
21 (FURNESS, 2006). Os que se projetam em direção oral são chamados de
22 interneurônios ascendentes, enquanto os que se projetam para a região anal são os
23 interneurônios descendentes. A ACh é o principal neurotransmissor dos
24 interneurônios e de acordo com sua classificação, eles podem apresentar como co-
25 transmissores ATP, ON, VIP, taquicininas, serotonina (5-HT), neuropeptídeo Y e
26 somatostatina (SOM). De forma geral, os interneurônios estão conectados a IPANs
27 locais, enquanto os ascendentes se projetam para neurônios motores excitatórios, os
28 descendentes se comunicam com os neurônios motores inibitórios (FUNG; VANDEN
29 BERGHE, 2020; FURNESS, 2012), estimulando a liberação de seus respectivos
30 neurotransmissores, ou ainda fazendo sinapses com outros interneurônios para
31 formar um sistema de retransmissão que projeta o sinal para distâncias mais longas
32 (SARNA, 2010).

1 Os neurônios IPANs se estendem por quase toda a circunferência do TGI
2 inervando principalmente o epitélio da mucosa intestinal. O corpo celular desses
3 neurônios está localizado nos gânglios submucosos e mioentéricos com terminações
4 axonais na mucosa. A maioria dos IPANs é multiaxonal Dogiel tipo II (SARNA, 2010).
5 Eles apresentam mecanorreceptores que percebem alterações de pressão, e
6 quimiorreceptores que captam mudanças na composição do conteúdo luminal
7 (FURNESS, 2006). Estes neurônios possuem projeções que se interconectam com os
8 demais neurônios entéricos, formando um sistema de comunicação eficaz que
9 possibilita que um estímulo percebido no lúmen seja repassado ao longo de todo o
10 tubo intestinal (SPENCER; HU, 2020).

11 No PS, os neurônios motores se estendem pela submucosa e regulam a
12 secreção de íons cloreto e o fluxo sanguíneo local. Eles são chamados de
13 secretomotores e/ou vasodilatadores, e seus principais neurotransmissores são a ACh
14 e o VIP (FURNESS, 2006; VANNER; MACNAUGHTON, 2004). Os reflexos de
15 vasodilatação são estimulados por alterações químicas ou mecânicas da mucosa e
16 são mediados pela liberação de ACh ou VIP pelos neurônios entéricos submucosos,
17 os quais ativam receptores presentes nas células endoteliais, culminando na liberação
18 de ON e consequente vasodilatação. Os reflexos de vasoconstrição no intestino são
19 mediados pela inervação extrínseca pertencente ao simpático (VANNER;
20 MACNAUGHTON, 2004).

21 Para a identificação de neurônios no PS alguns trabalhos têm utilizado a
22 proteína calretinina (Calr) de ligação de cálcio (BEUSCHER et al., 2014), sendo os
23 neurônios do PS reativos a esta proteína principalmente para a identificação de
24 neurônios submucosos colinérgicos e VIPérgicos, classificados em neurônios
25 fortemente reativos para Calr e neurônios fracamente reativos para Calr
26 respectivamente (MONGARDI FANTAGUZZI et al., 2009).

27 Os mesmos estímulos que desencadeiam os reflexos de vasodilatação são
28 responsáveis por induzir os reflexos secretomotores. Eles são mediados pela ativação
29 de neurônios secretomotores colinérgicos e VIPérgicos, e consequentemente da
30 liberação de ACh e VIP. Estes neurotransmissores irão ligar-se respectivamente aos
31 receptores M3 e o receptor de peptídeo intestinal vasoativo tipo 1 (VPAC1) de

1 enterócitos, desencadeando a secreção de cloreto em direção ao lúmen (VANNER;
2 MACNAUGHTON, 2004; XUE et al., 2007).

3 Além de neurônios, nos gânglios entéricos encontram-se células da glia
4 (GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2017). Inicialmente quando se falava em células glias,
5 sua função estava relacionada estritamente a nutrição, e suporte dos neurônios
6 entéricos, entretanto, estudos recentes têm demonstrado que estas células
7 apresentam importante papel na regulação da motilidade intestinal, das funções
8 secretora e absorviva do epitélio intestinal, e na defesa local do hospedeiro
9 (BOESMANS et al., 2015; NEUNLIST et al., 2014; VALÈS; TOUVRON; VAN
10 LANDEGHEM, 2018).

11 Os diferentes estímulos percebidos podem desencadear os reflexos de
12 motilidade intestinal, onde o TGI vai apresentar diferentes padrões contrateis que vão
13 depender da região intestinal estimulada e da natureza do estímulo. Pode-se observar
14 no intestino as contrações de segmentação, que misturam os conteúdos luminiais, e
15 estão relacionadas a absorção de nutrientes, e o peristaltismo um outro tipo de
16 contração que se propaga e impulsiona o conteúdo luminal aboralmente (FUNG;
17 VANDEN BERGHE, 2020). São variáveis em qualquer região do cólon a frequência,
18 amplitude e o tempo em todos os três tipos de contrações (SARNA, 2010).

19 Os movimentos peristálticos induzidos pelas camadas musculares do intestino
20 provocam a evacuação do conteúdo luminal e reduzem o tempo de retenção dos
21 rejeitos, diminuindo o tempo de contato com alguma substância potencialmente tóxica
22 ou ainda de substâncias patogênicas no lúmen intestinal (FURNESS, 2006).

23 Em relação as contrações de segmentação, os padrões de motilidade
24 envolvidos na mistura do conteúdo luminal permanecem ainda indefinidos. Já as
25 contrações propulsivas no intestino iniciam-se pela ativação de interneurônios
26 ascendentes que se conectam a neurônios motores excitatórios, provocando a
27 contração da região oral e propulsão do conteúdo luminal. Concomitantemente, ocorre
28 ativação dos interneurônios descendentes, que fazem sinapse com neurônios motores
29 inibitórios causando o relaxamento da região aboral do intestino (FUNG; VANDEN
30 BERGHE, 2020).

31 Ainda no intestino grosso, as contrações rítmicas propulsivas, são chamadas
32 de complexos motores migratórios colônicos (CMMCs) (FUNG; VANDEN BERGHE,

1 2020; FURNESS, 2006). Coordenando este padrão migratório encontram-se os
2 interneurônios colinérgicos, e atuando na inibição tônica, estão os neurônios motores
3 nitrérgicos. Na região proximal do intestino grosso, podem ser observados outros
4 padrões motores, como as ondas antiperistálticas, que promovem a mistura do
5 conteúdo luminal para a reabsorção de água e eletrólitos. Enquanto que na região
6 distal os padrões motores gerados têm como objetivo principal, a propulsão do
7 conteúdo luminal (LI et al., 2019).

8 A motilidade colônica efetiva envolve um padrão de sinais neuromusculares
9 excitatórios e inibitórios coordenados, e que surgem do circuito neural entérico do
10 intestino grosso. O circuito reflexo que medeia a motilidade propulsiva inclui fibras
11 nervosas ascendentes e descendentes, que levam à contração proximal e
12 relaxamento distal (BAYLISS; STARLING, 1899; FURNESS, 2012; MAWE, 2015). Por
13 intermédio dos neurônios secretomotores, o reflexo motor é iniciado pela ativação de
14 um neurônio aferente, por secreções enteroendócrinas e/ou por estiramento. Os
15 interneurônios que se projetam oralmente no intestino formam sinapses com
16 neurônios motores excitatórios induzindo a contração do músculo liso por meio da
17 liberação de ACh e taquicininas. Os interneurônios que se projetam aboralmente no
18 intestino promovem o relaxamento do músculo liso por meio da liberação de ON e
19 purinas. Este movimento coordenado, de contração e relaxamento sentido oral-
20 aboral, resultam em um gradiente de pressão, que impulsiona o conteúdo luminal na
21 direção aboral (FURNESS, 2006, 2012; MAWE, 2015).

22 A motilidade também depende da ativação e do acoplamento de receptores
23 muscarínicos em outros locais, além dos neurônios entéricos, as células intersticiais
24 de Cajal (ICCs) e o músculo liso. Os ciclos de ondas lentas de despolarização e
25 repolarização da membrana são originados em ICCs, e assim são transmitidos às
26 células musculares lisas, como um sincício, sendo a contração miogênica muito
27 importante, pois as alterações no processo contrátil vão ocorrer ao nível do músculo
28 liso. A despolarização que ocorre nas células musculares lisas é resultante da
29 ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, que resulta no influxo de Ca^{2+}
30 do espaço extracelular para o meio intracelular. E a estimulação simultânea que
31 ocorre do músculo liso através dos neurotransmissores excitatórios como a ACh,
32 promove mais despolarização e entrada ativa de Ca^{2+} nas cascatas de sinalização
33 intracelular, que resultam na liberação de mais Ca^{2+} dos estoques intracelulares. O

1 músculo liso expressa principalmente os receptores muscarínicos M2 e M3 (AKIHO,
2 2011).

3 Os mecanismos de excitação e inibição concorrentes para as células
4 musculares lisas é um mecanismo que varia aleatoriamente nas amplitudes das
5 contrações fásicas rítmicas colônicas (RPCs) para a mistura/rotação eficazes dos
6 conteúdos luminiais, variando também na distância de sua propagação (BORNSTEIN;
7 COSTA; GRIDER, 2004; SARNA, 2010).

8 O intestino é diariamente exposto a uma variedade de patógenos que podem
9 ser potencialmente ofensivos, como constituintes alimentares e por contaminantes
10 ambientais tóxicos, que desencadeiam uma série de respostas, com a função de
11 proteger das ameaças luminiais que ocorrem continuamente quase que diariamente.
12 A defesa ocorre através de vários mecanismos envolvidos como a barreira epitelial
13 intestinal, a vigilância imunológica por diversas populações de imunócitos intestinais
14 e através da motilidade intestinal (BEN-HORIN; CHOWERS, 2008).

15 Porém, em casos de desequilíbrio, podem ocorrer alterações nas funções,
16 como alterações no tempo de trânsito, que pode estar mais lento, e o excesso de água
17 será reabsorvido causando constipação, ou o inverso, com um tempo de trânsito mais
18 rápido que pode resultar em fezes amolecidas ou mesmo diarreia (KOCH, 2003).

19 Outro fator muito importante também na permeabilidade intestinal, é que muitas
20 vezes podem ocorrer alterações na permeabilidade no intestino delgado, e isso pode
21 ser um fator iniciador de desenvolvimento de doença no cólon. Foi demonstrado por
22 diversos modelos animais, onde alterações na permeabilidade intestinal ocasionadas
23 por uma série de fatores como a presença de inflamação ativa e o aumento da
24 presença de citocinas pró-inflamatórias, e também de espécies reativas de oxigênio
25 em muitas situações, precede o desenvolvimento de doença no cólon (ARRIETA et
26 al., 2009; ARRIETA; BISTRITZ; MEDDINGS, 2006; CAMILLERI et al., 2012; SU et al.,
27 2009).

28

29

30

31

32

1 3. OBJETIVOS

2

3 3.1 OBJETIVO GERAL

4 Avaliar o impacto da exposição contínua a duas doses de malation,
5 consideradas baixas de acordo com a Dose Letal 50 oral para ratos (1500-
6 2000mg/Kg), sobre a estrutura da parede e parâmetros de motilidade do cólon de
7 ratos.

8

9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 10 - Verificar a atividade da enzima butirilcolinesterase na parede do cólon de ratos
11 expostos continuamente às doses de 10 ou 50 mg/Kg de MAL.
- 12 - Descrever o fenótipo de pellets fecais de ratos expostos ao MAL.
- 13 - Avaliar os efeitos das doses de MAL sobre as características macroscópicas e
14 microscópicas do cólon de ratos.
- 15 - Verificar se a exposição a baixas doses de MAL causa alteração no tempo de trânsito
16 gastrointestinal de ratos.
- 17 - Avaliar os neurônios gerais, colinérgicos e nitrérgicos do plexo mioentérico e
18 neurônios gerais e que expressam calretinina do plexo submucoso em relação à sua
19 densidade populacional e morfometria do corpo celular.
- 20 - Analisar o padrão de motilidade colônica de ratos expostos ao MAL, considerando a
21 frequência, amplitude e duração de contrações gerais e, especificamente, de
22 contrações propulsivas orais e aborais, assim como contrações não propulsivas
23 simultâneas e isoladas.
- 24 - Averiguar a frequência, duração e direção dos Complexos Motores Migratórios
25 Colônicos (CMMCs) de ratos expostos ao MAL.

1 **4. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

2 Este artigo será submetido, como ARTIGO ORIGINAL, à revista **The Journal of**
3 **Physiology** (Fator de impacto: 4.547).

4

5 **EXPOSITION TO LOW DOSE OF MALATHION CAUSES MORPHO-**
6 **PHYSIOLOGICAL CHANGES IN THE COLON OF RATS**

7

8 A. C. E. Pupim¹, C. R. Basso¹, C. C. A. Machado¹, P. S. Watanabe¹, G. S. A.
9 Fernandes², R. P. Erthal², G. B. C. Sodré¹, F. A. Guarnier³, A. N. C. Simão⁴, A.
10 Blackshaw⁵, E. J. A. Araújo¹.

11 1. Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

12 2. Department of General Biology, State University of Londrina, Londrina, Paraná,
13 Brazil

14 3. Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina,
15 Paraná, Brazil

16 4. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of
17 Londrina, Paraná, Brazil

18 5. Wingate Institute for Neurogastroenterology, Queen Mary University of London,
19 London, United Kingdom.

20

21

22

23

24

25

26 Corresponding author

27 Prof. Eduardo José de Almeida Araújo

28 Departamento de Histologia, Universidade Estadual de Londrina

29 Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

30 Phone: +55 (43) 3371 4327

31 ejaaraujo@gmail.com

1 **Abstract:**

2 Malathion (MAL) is an organophosphate highly used as pesticide in the world to control
3 agricultural pests and disease vector mosquitoes. MAL causes death of insects by
4 inhibiting cholinesterase activity and for this reason can be quite toxic to mammals,
5 leading to cholinergic syndrome-related symptoms. Although the deleterious effects
6 after exposure to high doses are recognized, little is known about the long-term and
7 low-dose effects of this pesticide on the structure and motility of the colon. Thus, this
8 study evaluated the effects of long-term exposure to low levels of MAL on the colonic
9 structure and physiology of rats. MAL treatments (10 and 50 mg/Kg) reduced the
10 butyrylcholinesterase activity, and consequent caused enlargement of faecal pellets,
11 atrophy of muscle layers and several changes in neurons of both myenteric and
12 submucosal plexi. Considering colonic contraction, MAL (50 mg/Kg) increased the
13 number retrograde colonic migratory motor complexes. In conclusion, the long-term
14 exposure to low doses of MAL affects colonic morphophysiology, which highlights the
15 need to intensify control and care in the use of this pesticide.

16 **Key words:** Chronic exposure, organophosphorus pesticide, toxicity, large intestine,
17 enteric nervous system.

18

19 **Introduction:**

20

21 Malathion (MAL) is an organophosphate (OP) widely used in the world to control
22 agricultural pests (Maroni *et al.*, 2000; Colosio *et al.*, 2003; Aktar *et al.*, 2009; EPA,
23 2011) and disease vector mosquitoes (WHO *et al.*, 2009; WHO, 2016). Several studies
24 show that short-term exposure to high doses of MAL causes severe intoxication and
25 the development of various diseases (Selmi *et al.*, 2018), so its use should follow the
26 recommendations of the World Health Organization (FAO, 2003; WHO, 2016). Despite
27 the precautions, some authors highlights that low doses of OP are being consumed
28 involuntarily and almost daily by the human population, but the long-term effects of this
29 exposure are poorly understood (Aktar *et al.*, 2009; Gerunova *et al.*, 2020).

30 The insecticide action of MAL involves the inhibition of the activity of
31 cholinesterases, which catalyzes the hydrolysis of acetylcholine (ACh) where it is
32 secreted, leading to a ACh accumulation in synapses and then an increase in the

1 propagation of electrical impulses causing a state of overstimulation (Kamanyire, 2004;
2 Braga & Valle, 2007; EPA, 2009; NAC/AEGL Committee, 2009; Sarabia *et al.*, 2009;
3 Kaur & Kaur, 2018). Consequently, ACh remains bound to its receptors for a longer
4 time arising the typical signs and symptoms of a cholinergic reaction, such as
5 increased secretions, bronchoconstriction, bradycardia, vomiting and increased
6 intestinal motility (Milesen, 1998; Lott & Jones, 2020). The treatment for acute
7 exposure to high doses of MAL involves administration of activated charcoal and
8 atropine (TOMIMARU *et al.*, 1996; Eddleston, 2019). There are few studies that
9 describe changes caused by long-term exposure to low doses of OP, which may be
10 related to a variety of clinical conditions, including cancer (Calaf & Roy, 2008; Anjitha
11 *et al.*, 2020), reproductive health problems (Erthal *et al.*, 2020b, 2020a) and
12 neurological disorders (Zaganas *et al.*, 2013; Glass *et al.*, 2018; Naughton & Terry,
13 2018). This is probably due to mechanisms that involve inflammation (El-Bini Dhouib
14 *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2017), oxidative stress (Fortunato *et al.*, 2006; Coban *et al.*,
15 2015) and subsequent cell death by necrosis and apoptosis (Franco *et al.*, 2009;
16 Parrón *et al.*, 2011).

17 The intestine is the main organ of the gastrointestinal tract (GIT) that is exposed
18 to ingested toxic agents, and this is due to its extensive contact surface with the luminal
19 content (Zucco, 1993; Junqueira & Carneiro, 2017; Thompson *et al.*, 2018). On this
20 way, it is known that food and water are the main route of contamination by pesticides.
21 Thus, depending on the amount (dose), exposure time and physicochemical
22 characteristics of a toxic agent, the intestinal wall structures adapts in order to ensure
23 its role (Takahashi *et al.*, 2018; Gillois *et al.*, 2018). Most of the studies that evaluated
24 the toxicity of pesticides focused on the small intestine (Rady, 2009; Sharma *et al.*,
25 2011; Vismaya & Rajini, 2014), probably due to its importance to absorb nutrients for
26 the whole organism. Unfortunately, the relevance of large bowel functions is not always
27 recognized.

28 In addition to absorbing vitamins, short-chain fatty acids (resulting from the
29 digestion of insoluble fibers by the intestinal microbiota), forming and eliminating feces,
30 the functioning of the large intestine is crucial for the body's water balance (Koch,
31 2003). The absorption of water and electrolytes needs to be precisely regulated and it
32 depends on several factors, including the integrity of the epithelial barrier, adequate
33 blood flow, and an adjusted functioning of submucosal (SP) and myenteric (MP) plexus

1 (Furness, 2006; Sasselli *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2018). SP neurons are directly
2 related to the control of fluid flow in the mucosa (Furness, 2006), while MP neurons
3 control the intestinal wall motility (Furness, 2012). Both nervous plexi are part of the
4 third component of the autonomic nervous system, called the enteric nervous system
5 (ENS). Therefore, all structures that are part of the colonic wall can be modified by the
6 presence of toxic agents in the colon.

7 Therefore, the objective of this study was to evaluate the impact of long-term
8 and low dose MAL exposure on the wall structure and parameters of colon motility of
9 rats.

10

11 **Methods:**

12

13 **Ethical approval:**

14 The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on the Use of
15 Animals of the Universidade Estadual de Londrina (protocol CEUA/UEL
16 12305.2016.65 and OF.CIRC. CEUA/UEL – nº 137/2016).

17

18 **Animals:**

19 Male Wistar Rats (*Rattus norvegicus*) aged 21 days postnatal (DPN), from the Central
20 Animal Facility of the Universidade Estadual de Londrina (UEL), were kept in the
21 sectorial animal facility of the Laboratory of Toxicology and Metabolic Dysfunction of
22 Reproduction at UEL under temperature control ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) and light/dark cycle of 12/12
23 h throughout experimental period. These animals were acclimated for 4 days before
24 the beginning of the experiments and during the entire experimental period received
25 water and rodent chow (Nuvilab) *ad libitum*. During the three days prior to the beginning
26 of the experiment, the rats were treated with 2.5mL/day of Ivermectin (Ivomec®)
27 subcutaneously to eliminate possible verminosis.

28

29

1 **Experimental groups:**

2 The rats were randomly distributed into three experimental groups: Control, MAL 10mg
3 (M10) and MAL 50mg (M50). Groups M10 and M50 received daily, by gavage, 300µL
4 of MAL 440 EW (diethyl-dimethoxythiophosphorylthio; CAS no. 121-75-5; Cheminova,
5 obtained from Dominus Quimica – Jandaia do Sul – Pr - Brazil) at doses of 10 mg/ kg
6 body weight (B.W) or 50 mg/kg B.W diluted in 0.9% saline solution. Exposure occurred
7 for 40 days at the age of 25-65 DPN, which represents the juvenile and peripubertal
8 periods for rats (Ojeda *et al.*, 1980). These doses correspond to 0.5% and 2.5%,
9 respectively, of the oral LD50 for male rats (oral LD50 = 1500-2000 mg/kg) (EPA, 2000;
10 ATSDR, 2003). The control group received, in parallel, only 0.9% saline solution by the
11 same route and period. The animals were weighed every three days to calculate the
12 MAL dilution. The experiment was carried out in two stages: in the first (n= 5-15/group),
13 the collected material was aimed to histopathological analysis of the colonic wall and
14 ENS; in the second (n= 10-17/group), functional analysis was performed:
15 gastrointestinal transit, faecal pellets phenotype and intestinal motility.

16

17 **Faecal Pellet Phenotype:**

18 During the last week of the experiment, the rats were separated in individual cages for
19 about 12h (overnight) and then regrouped again in collective cages (daytime). For each
20 animal, the total number (nb) of faecal pellets produced per day was counted and
21 weighed (Aktar *et al.*, 2018). Then, all pellets from the same rat were heated in a drying
22 oven for 24 h at 60°C and weighed again. The difference between the gross mass and
23 the dried mass was considered as the amount of water present in the faecal pellets,
24 and the average was calculated to obtain values per pellet. From these, 10 pellets were
25 randomly separated to measure their length and thickness using a pachymeter. For
26 these analyses, n=10/rats were used for the control and M50 groups and n=11 for M10.

27

28 **Gastrointestinal Transit Time:**

29 Two days before euthanasia, the animals received by gavage 0.250mL of non-
30 absorbable dye (3% Red-Carmine dye and 0.5% methylcellulose – Farmacia Campo)
31 and were separated in individual cages with food and water *ad libitum*. Gastrointestinal

1 transit time (h) was obtained considering the difference between the start and end time
2 of the test (elimination of the first red faecal pellet) (Nagakura *et al.*, 1996). The
3 maximum time a waited for the elimination of the pellet was 10h. Control: n=16 and
4 groups M10 and M50: n=17.

5

6 **Euthanasia and material collection:**

7 After the experimental period (40 days), the rats used for the collection of macroscopic,
8 histological and structural analysis of the ENS were anesthetized intraperitoneally with
9 a combination of ketamine 75mg/kg B.W (Sedomin® 10%, Avellaneda, Argentina) and
10 xylazine 10 mg/kg B.W (Anasedan®, Paulinia, Brazil) and then submitted to
11 euthanasia by cardiac puncture. However, the rats used for functional analyses were
12 euthanized by CO₂ overdose (Leary & Johnson, 2020). The total colon was collected,
13 washed with 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 to remove the faecal
14 content, weighed, and then the length and proximal and distal bowel circumferences
15 were measured in order to calculate the total area of the colon.

16

17 **Butyrylcholinesterase (BuChE) analysis:**

18 A colonic fragment (1 cm) from each rat were immediately frozen in liquid nitrogen and
19 kept at -80°C. When thawed, they were weighed, macerated and the homogenates
20 were processed to determine the activity of BuChE/mg of proteins, following the kit
21 manufacturer's protocol (Pseudocholinesterase – Flex® reagent cartridge - Dimension
22 – Siemens). The enzyme concentration was normalized by the total protein
23 concentration using the Bradford method (Bradford, 1976). For these analyses, n= 5
24 for the control and M50 groups and n= 6 for M10 were used.

25

26 **Histopathological analysis:**

27 A colonic fragment (1 cm) from each rat was weighed to check for edema (n=14 for
28 control/M10 and n=15 for M50). Afterwards, the same 1cm fragment was opened at
29 the mesocolic edge, stuck in cork fixated in 4% paraformaldehyde buffered for 3h (n=
30 5/group). These fragments were embedded in paraffin after dehydration steps with

1 increasing grades of ethyl alcohol and diaphanization with xylol. Semi-serial cross
2 sections of 5 μ m (4 sections/animal) were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) or
3 with histochemical techniques for evidencing glycoconjugates. From each HE-stained
4 section, seven images were captured by a high-resolution camera (Moticam 2500, 5.0
5 M pixel, USB 2.0) connected to an Axiophot Zeiss Axiophotluz microscope. To
6 measure mucosal layer thickness, crypt depth and submucosal thickness, images
7 were captured using the 10x objective. For the total, circular, and longitudinal muscle
8 layers, the images were captured using the 20x objective. Three measurements/image
9 were performed for each parameter using the Image-Pro Plus software version
10 4.5.0.29. (n=5ratsx4cutsx7imagesx3measures). In addition, the nb of nucleus of the
11 circular and longitudinal muscle layers was counted in the images captured using the
12 63x objective (n= total sum of nucleus in 5 imagesx4slices) (n=5/group) and projected
13 to 1mm². Goblet cells producing neutral mucins, sialomucins and sulfomucins were
14 counted using sections stained with periodic acid Schiff (PAS), Alcian Blue pH 2.5 (AB
15 pH2.5) and Alcian Blue pH 1.0 (AB pH1.0) respectively. The nb of goblet cells present
16 in 10 crypts/section was counted using the 40x objective microscope (n=5x4 sections).

17

18 **Analysis of the submucosal and myenteric plexus:**

19 The amount left of the colon was destined for making whole-mount preparations aiming
20 at the structural evaluation of the ENS (Machado *et al.*, 2021). This part of the colon
21 was filled with 4% buffered paraformaldehyde, tying the ends up like a bladder, and
22 immersed in the same fixative solution for 3 h at room temperature. Fragments (1cm)
23 were microdissected to make whole-mount preparations containing the MP or SP,
24 which were submitted to the immunofluorescence technique for neuronal evidencing.
25 After washing with PBS 0.1M pH 7.4, they were submitted to antigen recovery using
26 sodium citrate pH 6.0 solution and progressive increase in temperature until reaching
27 92-95°C. Then, washing again with PBS solution to be incubated in blocking solution
28 for 1h, containing PBS + Triton X-100 (0.5%) + bovine serum albumin (BSA) (3%) +
29 donkey serum (10%). Then, they were incubated for 48h in a solution containing the
30 primary antibody diluted in PBS + Triton X-100 (0.5%) + BSA (2%) + donkey serum
31 (5%). The whole-mount preparations were washed with PBS and then incubated for
32 2h in a solution containing the secondary antibody diluted in PBS + Triton X-100 (0.5%)
33 + BSA (2%) + donkey serum (5%), protected from light. Finally, they were washed

1 again with PBS and mounted between slide and coverslip using anti-FADE reagent
2 with DAPI. The antibodies used are shown in table 1. In the MP of each rat, the total
3 nb of immunoreactive (IR) neurons for the Hu protein (HuC/D⁺) was counted for the
4 evaluation of the total population; neuronal nitric oxide synthase (nNOS⁺) to evaluate
5 the nitrergic subpopulation and choline acetyltransferase (ChAT⁺) to assess the
6 cholinergic subpopulation. This nb was obtained in 32 images and then projected to
7 1cm². In the SP, the total nb of neurons was counted, in 30 ganglia, considering IR for
8 HuC/D⁺ and calretinin (Calr⁺), and from Calr⁺ neurons, strongly and weakly IR were
9 distinguished for identification of cholinergic and VIPergic neurons, respectively, as
10 demonstrated by Mongardi Fantaguzzi *et al.*, 2009. Both analyses were performed in
11 both proximal (PC) and distal (DC) portion of the colon. In addition, the area of 100 MP
12 IR neurons cell bodies was measured. To SP, the area of 100 cell bodies of IR neurons
13 was measured for HuC/D⁺ and of 50 cell bodies of strongly and weakly labelled
14 neurons for Calr⁺. Quantification and determination of cell body area (μm^2) were
15 performed using Image Pro-Plus image analysis software version 4.5.0.29. Results
16 were expressed as nb of neurons in 30 ganglia (SP) and nb/cm² (MP). In addition, we
17 evaluated the proportion of neuronal subpopulations (nNOS⁺, ChAT⁺ and Calr⁺
18 strongly and weakly) in relation to the total number of HuC/D⁺ neurons. All images were
19 obtained by an AxioCam high-resolution camera (Carl Zeiss, Jena, Germany)
20 connected to an Axioscop Plus microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), using the
21 AxioVisionRel 4.1 software using a 20X objective. To the IR HuC/D⁺ neurons the n
22 used was 12/group. To nNOS⁺, ChAT⁺ and Calr⁺ n= 6/group.

23

24 **Intestinal Manometry:**

25 After euthanasia, the colon was immediately collected, washed with Krebs solution at
26 33-36°C containing a carbogenic mixture (95% O² and 5% CO²) and kept in an organ
27 bath with a constant flow of the same Krebs solution with control temperature (33-
28 36°C). A rodent-adapted intraluminal catheter with four sensors 1.5cm apart was
29 introduced into the colonic lumen. The 4 sensors were positioned in the regions:
30 proximal (PC), middle proximal (MPC), middle distal (MDC) and distal colon (DC). A
31 conventional intestinal manometer detected intraluminal pressure variations in the
32 catheter and transmitted it to a microcomputer to record the data. After an adaptation
33 period (30min) and application of 100 $\mu\text{mol/L}$ of the nitric oxide synthase inhibitor: N-

1 omega-nitro-L-arginine (NOLA-Sigma), all intraluminal pressures were recorded for 30
2 minutes using the Spike software version 9.0 (Machado *et al.*, 2021). Intraluminal
3 pressure patterns were considered to correspond to patterns of colonic contractions
4 (Quan *et al.*, 2017), therefore, data analysis and results indicate contractions. The
5 amplitude (mmHg) and duration of the contractions (s) were analysed, thus obtaining
6 the area under the curve (AUC) (mmHg.s) of each contraction. Amplitude and duration
7 of contractions were also evaluated by frequency distribution into classes (histogram).
8 The duration(s) of quiescence intervals between contractions was analysed. The
9 frequency (nb/time) was calculated by counting the total number of contractions in 30
10 minutes, distinguishing propulsive contractions in the oral-aboral (anterograde) and
11 aboral-oral (retrograde) directions, and simultaneous non-propulsive contractions
12 (when they occurred with a difference of less than 2s in more than one sensor) or
13 isolated (when it occurred in only 1 sensor). Colonic migratory motor complexes
14 (CMMCs) were identified, quantified in number and duration, distinguishing the
15 direction (aboral or oral). For these analyses, n=10 for the control and M50 and n=11
16 for the M10 were used.

17

18 **Evaluation and statistical analysis of results:**

19 The collected data were initially analysed for the presence of outliers by the ROUT
20 method (Q=1%) and then evaluated for their types of distribution. Each group exposed
21 to MAL was compared to the control group. If the distribution was normal, the
22 comparison was performed using *Student's t-test* for independent samples; when the
23 distribution was free, the groups were compared using the *Mann-Whitney statistical*
24 *test*. Statistical differences were considered when $P < 0.05$. The statistical program
25 used was GraphPad Prism 7.04.

1 Results

2

3 **MAL inhibits the BuChE enzyme activity and causes changes in the faecal pellet** 4 **phenotype**

5 Exposure to MAL in both the M10 and M50 groups reduced about 40% of the activity
6 of the BuChE enzyme in the colon (Fig. 1A). A shorter gastrointestinal transit time was
7 observed in rats exposed to the highest dose – 50 mg/Kg (Fig. 1B). There was no
8 change in water consumption (Fig. 1C). However, exposure to MAL caused significant
9 changes in the phenotype of faecal pellets (Fig. 1D-F), such as an increase in nb (Fig.
10 1D) in both groups; in the amount of mass and water only in the M50 (Fig. 1E); and its
11 length and thickness (Fig. 1F) in both evaluated groups.

12

13 **Exposure to MAL causes microscopic structural changes in the colon**

14 Exposure to low doses of MAL did not cause macroscopic structural changes (Fig. 2A-
15 C) or edema in the colon tissues (Fig. 2D). On the other hand, microscopically (Fig.
16 2E), there was a slight atrophy of the mucosa at M10 and moderate hypertrophy in the
17 animals exposed to the higher dose, in which an increase in the depth of the crypts
18 was also observed. The submucosal and muscular layers of both groups were
19 atrophied, and the nb of intestinal muscle cell nucleus was in greater quantity (Fig. 2F).
20 A reduction in the nb of goblet cells producing acid mucins stained with AB pH 2.5 was
21 observed in M10 and M50 animals (Fig. 2G).

22

23 **MAL caused partial loss of neurons and altered the cell body area of enteric** 24 **neurons**

25 In the SP of proximal colon, there was no change in nb of IR neurons to HuC/D⁺ and
26 Calr⁺ (Fig. 3A-C). On the other hand, neuronal cell bodies were hypertrophied at M10
27 and atrophied at M50 considering the total population (HuC/D IR⁺) and Calr strongly
28 and weakly IR neurons (Fig. 3C). A similar result was observed in the SP of the distal
29 colon (Fig. 3D-F), where no changes were either observed in the nb of IR neurons,
30 however, their cell bodies were hypertrophied in both groups (Fig. 3F). In the MP of

1 the proximal colon (Fig. 3G-I), the nb of HuC/D⁺, ChAT⁺ and nNOS⁺ IR neurons was
2 also not changed, but the proportion of ChAT⁺ neurons in relation to the total nb of
3 HuC/D⁺ neurons was reduced in M50 (Fig. 3H). Atrophy was observed only in M10
4 both in the total population and in the cholinergic and nitrenergic subpopulations (Fig. 3I).
5 In the MP of the distal colon (Fig. 3J-L), there was a reduction in the nb of to HuC/D IR
6 neurons in both groups M10 and M50, as well as of nNOS IR neurons in the group
7 exposed to the lowest dose (M10), but no numerical change was observed in the ChAT
8 IR neuronal population (Fig. 3J). The proportion of cholinergic and nitrenergic neurons in
9 relation to the total nb of neurons was not altered (Fig. 3K). Similarly, to proximal colon,
10 there was atrophy of HuC/D⁺ and nNOS⁺ neurons only in M10 (Fig. 3L), and
11 hypertrophy of ChAT⁺ neurons in M50.

12

13 **Low doses of MAL trigger changes in colon motility pattern, leading to intestinal** 14 **dysmotility**

15 Considering the general contractions of rats from the M10 group, within the evaluation
16 period (30 min), the area under the curve (AUC) was reduced in the proximal and
17 increased in the distal region of the colon (Fig. 4A). Regarding the amplitude (strength)
18 of these contractions, it was observed an increased in almost the entire length of the
19 colon (Fig. 4B). The duration of contractions increased only in MDC (Fig. 4C). The
20 interval time between contractions, i.e., when the colon remained quiescent, was
21 longer from MPC to the distal region (Fig. 4D). Considering the total nb of the
22 contraction peaks, no change was observed regardless of the colon region assessed
23 (Fig. 4E-H). In the distribution of the frequency of contractions, we observed an
24 increase in the nb of contractions over 50mmHg of the PC; reduction of 50-75mmHg
25 contractions in MPC and increase of contractions over 75mmHg; lower nb of 25-
26 50mmHg contractions in MDC and no changes in DC. In addition, an increase in the
27 nb of contractions greater than 20s in MDC was observed (Fig. 4G).

28 Considering the general contractions of rats from the M50 group, AUC was reduced in
29 PC and increased in the distal region of the colon (Fig. 4A). Amplitude was reduced in
30 PC and increased in MDC (Fig. 4B). The contractions were shorter in PC and longer
31 in DC (Fig. 4C). In relation to the intervals between contractions, they were shorter in
32 the entire length of the colon (Fig. 4D). The total nb of the peaks of contractions did

1 not change, regardless of the colon region evaluated (Fig. 4E-H). In the distribution of
2 the frequency, we observed a reduction in the nb of 25-50mmHg contractions in PE;
3 an increase in contractions over 75mmHg in PMP; and reduction of 25-50mmHg
4 contractions in PMD (Fig. 4E-H). Regarding the frequency distribution for duration of
5 contractions, no changes were observed (Fig. 4G).

6 When propulsive contractions in the oral-aboral direction were evaluated, it was
7 observed that they were at a low frequency throughout the entire length of the colon in
8 the M50 group (Fig. 5A) and was not altered in the M10. In relation to the AUC, it was
9 increased in almost the entire length of the colon of M10 rats, and only in MDC of M50
10 rats (Fig. 5B). The amplitude of these contractions was greater in PC and MDC in M10,
11 and only in MDC in M50 (Fig. 5C). These contractions were longer in the PC and
12 shorter in the DC of the colon of the M10 rats, while it was increased in the entire
13 medial region of the M50 rats (Fig. 5D).

14 Considering the propulsive contractions in a retrograde direction, the frequency was
15 increased only in the colonic medial region of M50 rats (Fig. 5E). AUC was reduced in
16 MPC and increased in MDC of M10 rats, whereas it was increased in PC and reduced
17 in MPC of M50 rats (Fig. 5F). The amplitude of these contractions was increased in
18 PMD of M10 rats and reduced in PMP of M50 rats (Fig. 5G). The duration was reduced
19 in the MPC and DC of the M10 rats, while there was no change in any of the regions
20 of the M50 rats (Fig. 5H).

21 The "simultaneous" non-propulsive contractions, which occurred at the same time in
22 more than one region, presented the most altered parameters due to MAL exposure,
23 except the frequency which was only increased in MPC of the M50 rats (Fig. 5I). The
24 AUC of these contractions was increased on the entire colonic length of the M10 and
25 M50, except in the PC (Fig. 5J). In both MAL groups, the amplitude of these
26 contractions was increased on the entire length of the colon (Fig. 5K). Besides,
27 contractions were longer on almost the entire length of the colon, except in the DC, of
28 the M10 rats, while they were longer only in the DC of M50 rats (Fig. 5L).

29 Finally, when the "isolated" type non-propulsive contractions were evaluated, i.e.,
30 those that occurred in a single region, the frequency was reduced in the colonic distal
31 region of the M10 rats, as well as in PC and DC of M50 rats (Fig. 5M). AUC was lower
32 in MPC in both MAL groups and increased in MDC only in M50 (Fig. 5N). The amplitude

1 of these contractions was reduced in MPC in both MAL groups (Fig. 5O), and they
2 were shorter in MPC of the M10 and in PC of the M10, while they were longer in DC
3 of M50 (Fig. 5P).

4 These MAL exposure-induced changes in colon motility patterns impaired the
5 frequency, duration and direction of CMMCs. The nb of CMMCs was not altered in
6 M10, however they were less frequent in the oral-aboral (anterograde) direction and
7 more frequently in the aboral-oral (retrogressive) direction in M50 (Fig. 6A). The
8 duration of CMMCs has not changed, except when they were evaluated separately by
9 direction. In this case, the anterograde CMMCs lasted longer in M50 (Fig. 6B). The
10 interval time between consecutive CMMCs was greater only in M10 (Fig. 6C).

11

12 **Discussion**

13 The present study demonstrated evidence that long-term and low-dose MAL
14 exposure causes significant morphophysiological changes in the colon of rats. MAL
15 inhibited the activity of the enzyme BuChE resulting in changes in the phenotype of
16 faecal pellets and intestinal motility patterns, probably due to structural alterations in
17 colonic layers and enteric neurons.

18 OP are consumed involuntarily all over the world (EPA, 2009; Aktar *et al.*,
19 2009), although in low quantities, mainly from the consumption of water and vegetables
20 contaminated with pesticides where spraying occurs to control pests in order to
21 improve agricultural production (Maroni *et al.*, 2000; Colosio *et al.*, 2003). In addition,
22 individuals can still be continuously exposed to OP, even at low doses, when they live
23 where these chemical compounds are sprayed to control urban pests, such as the
24 mosquito vector of dengue, Zika and Chikungunya (WHO *et al.*, 2009).

25 The oral route is, among others, the main way of exposure and the intestine is
26 the main place of contact with toxic agents, mainly due to its extensive area of contact
27 with the environment (Vismaya & Rajini, 2014). Direct and/or indirect oral exposure
28 can cause the appearance of various effects on the structure and function of the GIT
29 organs (Gillois *et al.*, 2018). On the other hand, the literature is scarce regarding
30 studies that evaluated the impact of exposure to low doses of OP for the large intestine.

1 It is known that the expression of human acetylcholinesterase (AChE) and
2 BuChE genes are markedly different, with higher AChE levels in brain and skeletal
3 muscle, while BuChE levels are higher in other organs such as the liver, the colon, the
4 uterus and the lung, acting in the detoxification of ingested or inhaled poisons
5 (Lockridge & Schopfer, 2006; Lockridge *et al.*, 2016). BuChE is used as a sensitive
6 exposure biomarker, with the ability to eliminate subclinical doses of nervous agents
7 and toxics such as MAL (Lockridge *et al.*, 2016). Considering that MAL makes
8 irreversible bonds that inactivate cholinesterases (Marrs, 1993; Taylor *et al.*, 1995;
9 Tchounwou *et al.*, 2015; Voorhees *et al.*, 2019) and that AChE and BuChE act on
10 cholinergic synapses catalysing ACh hydrolysis (Manoharan *et al.*, 2007; Colovic *et*
11 *al.*, 2013), our results showed that the reduction in the activity of the BuChE enzyme,
12 in both M10 and M50 groups, indicates that the low doses of MAL used in the study
13 (10 and 50 mg/Kg) were sufficient to cause toxicity to the colonic tissues.

14 Whereas the large intestine is primarily responsible for water and electrolyte
15 absorption, production and absorption of vitamins, and the formation and propulsion of
16 feces (Azzouz & Sharma, 2020), long-term MAL exposure can cause colonic
17 absorption and motility disorders that can directly reflect on the constitution, formation
18 and elimination of feces. In this sense, it was observed that both MAL doses evaluated
19 in this study caused an increase in the number and size of faecal pellets. Besides, the
20 highest dose evaluated (50 mg/Kg) caused the elimination of feces with a greater
21 amount of mass and less dehydration, which was preliminarily considered because of
22 a probable increase in the transit velocity in the colon deduced from the shorter
23 gastrointestinal transit time presented by M50 rats. This result may have been due to
24 a possible accumulation of ACh in synapsis due to inhibition of BuChE. Similar to our
25 results, (Vismaya & Rajini, 2014) demonstrated that the increase in ACh concentration
26 caused by AChE inhibition due to the use of 0.45 to 1.8 mg/kg B.W monocrotophos,
27 an OP, administered orally for 30 days, also reduced intestinal transit time.

28 Before discussing the results of the evaluated motility parameters in this study,
29 it is important to note that MAL exposure caused changes in the structure of the colon
30 wall. The mucosa layer was slightly atrophied in M10 rats and hypertrophied in M50
31 rats, which exhibited deeper intestinal crypts. This indicates that the low-dose MAL
32 exposure was enough to induce a reducing in the contact surface of the colonic wall
33 with the intestinal lumen, which is extremely important for protection of the animal since

1 MAL is an easily absorbable compound (Videira *et al.*, 2001). Intestinal mucosal
2 atrophy is an extremely common response pattern when animals are orally challenged
3 with toxic substances (Rady, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Darwiche *et al.*, 2017). On the
4 other hand, exposure to the highest dose of MAL (50 mg/kg) induced a different pattern
5 of response, characterized by an intensification of the cell turnover process in the
6 intestinal epithelium, which is indicated by the deepening of the intestinal crypts. This
7 result indicates that a greater number of new epithelial cells were generated in order
8 to replace those were intoxicated with MAL (Aoki *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2018),
9 i.e. MAL changed the balance of epithelial proliferation and differentiation. It is known
10 that this process should be tight regulated, since limited epithelial turnover can reduce
11 the absorption capacity and the opposite can lead to the development of tumours
12 (Schneider *et al.*, 2019).

13 Goblet cells also are very sensitive to toxic environment, thus it is important to
14 analyse how they were at the end of the long-term and low-dose MAL exposure. We
15 found a depletion of sialomucin producing goblet cells in both groups of rats exposed
16 to MAL. Goblet cells are responsible for synthesizing and secreting mucins, which form
17 a mucous viscoelastic gel layer on the epithelial lining of the GIT (Salvo Romero *et al.*,
18 2015), and particularly the acid mucins (sialomucins and sulfomucins) contribute to the
19 fluidity of this gel (Specian & Oliver, 1991; Gaudier & Hoebler, 2006; Birchenough *et al.*,
20 2015). Therefore, our result suggested that this mucus layer was denser, possibly
21 to create a more effective intestinal barrier not only to minimize the absorption of MAL
22 but also to prevent that other harmful chemical or biological agents cause more
23 damage to the intestinal epithelium.

24 Considering the inner layers, long-term and low dose MAL exposure caused
25 atrophy in the submucosal and external muscle layers. This atrophy could be result
26 from a reduction in the number of cells and/or in the area occupied by these. As the
27 increase in the number of nuclei in the muscle layer was also observed in M10 and
28 M50, we suggest that the muscle atrophy occurred due to a reduction in cytoplasmic
29 mass, which consequently led us see more cells in the same microscopic area
30 compared to the control group. This loss of cytoplasmic mass may have resulted from
31 an adaptive process face a lower ATP availability, since rats exposed to MAL have
32 impaired energy production in muscle mitochondria (Karami-Mohajeri *et al.*, 2014).

1 Generally, OP acute exposures can cause less production of free radicals and
2 trigger cell preservation stimuli (Karami-Mohajeri *et al.*, 2014), while chronic exposures
3 cause intense production of free radicals and, ultimately, cell death through autophagic
4 and apoptotic pathways (El-Bini Dhouib *et al.*, 2015; Ghasemi-Niri *et al.*, 2016). On the
5 other hand, the inhibition of the AChE enzyme activity can make the free radical
6 producing cells less sensitive to apoptosis inducers (Zhang & Greenberg, 2012), which
7 contributes to greater cell survival. Our study demonstrated preservation in the number
8 of cells and loss of cytoplasmic mass in the muscle layer of rats subchronically exposed
9 to MAL. Despite the long-term exposure, the low doses of MAL may not have been
10 enough to trigger cell death processes during the chronicity of intoxication, which
11 probably included the activation of the cellular autophagy process to eliminate potential
12 pro stimuli apoptotic and removal of damaged organelles. In other words, MAL
13 exposure affected cell homeostasis, however, we still cannot say whether the cells
14 would be moving towards a cell death process. Another hypothesis could also be that
15 due to ACh build-up, which could activate muscarinic and/or nicotinic receptors in the
16 intestine to trigger increase epithelial differentiation and proliferation from progenitor
17 stem cells (Takahashi *et al.*, 2018).

18 Given the similarity of the results regarding the reduced activity of BuChE and
19 the atrophy of the submucosal and muscular layers in both group of rats exposed to
20 MAL, we could hypothesize that the absorbed amount of this OP by them was similar.
21 However, when the enteric neurons and the motility parameters are considered, it is
22 evident that the doses of 10 and 50 mg/kg promoted different effects.

23 About half of enteric neurons use ACh as a neurotransmitter (Harrington *et al.*,
24 2010) and, therefore, exposure to molecules that affect the production and/or
25 hydrolysis of ACh has the potential to cause serious impacts on the functioning of the
26 ENS. As MAL has a high affinity for cholinesterases (Marrs, 1993) and causes a
27 reduction in its activity (El-Bini Dhouib *et al.*, 2015; Badr, 2020), it is common to
28 observe a strong cholinergic reaction in individuals acutely exposed to high doses of
29 this OP (Tchounwou *et al.*, 2015; Badr, 2020). In addition to ACh, another very
30 important neurotransmitter in intestinal function is nitric oxide (NO), found mainly in
31 intrinsic inhibitory motor neurons acting in descending relaxation (Furness, 2000;
32 Sarna, 2010). The loss or damage of nitrergic or cholinergic neurons (Bódi *et al.*, 2019;
33 Machado *et al.*, 2021) can contribute to the development of intestinal motility disorders.

1 In this study, the number of SP neurons has not changed but the proportion of
2 cholinergic myenteric neurons in relation to the total population was reduced in the
3 proximal colon of the rats exposed to 50 mg/kg of MAL. General myenteric neuronal
4 loss was observed in the distal colon of the rats from both MAL exposure groups.
5 Considering that the exposure time was the same for both groups, this result suggests
6 that there is no dose-dependent pattern of response, or that perhaps a minimal dose
7 of MAL could cause the phenotypic shift of myenteric neurons, probably as a
8 mechanism of feedback on the reduction of cholinergic signalling for compensation
9 caused by the accumulation of ACh due to the MAL action. Seeing that cholinergic
10 myenteric neurons can act as interneurons or excitatory motor neurons (Furness,
11 2007), changes in ChAT expression could impact the coordination, strength and
12 duration of colonic contractions.

13 In addition, it was observed that the enteric neurons underwent different
14 morphological adaptations in the rats exposed to both doses of MAL which were
15 translated into atrophy or hypertrophy. The neuronal cell body area can increase or
16 decrease as a consequence of edema (Correa *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2012) and
17 also due to changes in the amount of cytoplasmic organelles, in the expression of
18 molecules the cytoskeleton (Carbone *et al.*, 2016) and in the speed of traffic of
19 organelles between cell body and neurites, among others. All these alterations have
20 already been described in neurons of the central nervous system of rats exposed to
21 different doses of MAL (Abdel-Rahman *et al.*, 2004; Campaña *et al.*, 2008; Abdel-
22 Salam *et al.*, 2018).

23 Considering that MAL is capable of inhibiting the electron transport chain in the
24 inner mitochondrial membrane, as well as inhibiting the activity of the ATP synthase
25 enzyme (Karami-Mohajeri *et al.*, 2014), it is suggested that there is less availability of
26 cellular ATP during exposure to MAL. Considering also that neurons are cells that
27 demand large amounts of ATP to perform their functions (Furness, 2006, 2012), it is
28 possible to consider that the less availability of ATP may have been the main factor
29 that triggered the changes in the area of the cell body of enteric neurons from rats
30 exposed to MAL. For example, the lack of ATP may have compromised the proper
31 functioning of Na⁺/K⁺ pumps and, thus, have impaired the control of intracellular
32 osmolarity, leading to greater water intake and, consequently, an increase in the cell
33 body area. Another possibility of interpretation is that the lasting lower availability of

1 ATP may have activated autophagy mechanisms so that the cell could adapt its
2 structure and, consequently, its energy demand to the new reality. Also in the case of
3 nitrenergic neurons, they generally go through two stages when they are undergoing a
4 process of degeneration, with reduced axonal expression of neuronal nitric oxide
5 synthase (nNOS), which may still be reversible, and in the second phase (irreversible)
6 which may progress for loss through apoptotic processes (Bódi *et al.*, 2019).
7 Therefore, atrophy could be considered as the result of a long adaptive process that
8 enteric neurons suffered in face of constant exposure to MAL. Ultrastructure and
9 electrophysiology studies with these neurons may help to elucidate the causes and
10 consequences of changes in the cell body area of these cells.

11 Another important factor that should be taken into account is the fact that
12 secretomotor neurons that release ACh neurotransmitters and/or intestinal vasoactive
13 peptide (VIP) are secretomotor neurons in the SP (Li *et al.*, 2016), and when there is
14 an increase in the population of neurons IR ChAt and VIP, and consequently, increased
15 release of neurotransmitters, an increase in intestinal secretion can be observed and
16 aggravate diarrheal processes. We observed that in SP there was hypertrophy of the
17 cell bodies of neurons strongly and weakly IR to calretinin, which could be considered
18 cholinergic and VIPergic populations, respectively, as indicated by Mongardi
19 Fantaguzzi *et al.*, 2009. If this hypertrophy indicates increased secretion of these
20 neurotransmitters, it is suggested that this phenomenon may have influenced the
21 control of fluid flow and, therefore, may have contributed to the lesser dehydration of
22 faecal pellets observed in animals from group M50.

23 The intestinal motility function is regulated by the interaction of enteric neurons
24 and smooth muscle, where smooth muscle cells generate slow waves in response to
25 the chemical signal released by myenteric neurons (ACh and NO), resulting in smooth
26 muscle contraction by excitation-contraction and excitation-inhibition couplings,
27 respectively according to the stimulus and released neurotransmitter (Sarna, 2010;
28 Winston *et al.*, 2013). The two doses of MAL evaluated in this study promoted atrophy
29 of the muscle layer, accompanied by different neuronal adaptive responses, and the
30 effects on colonic motility were also distinct. As previously mentioned, we used low-
31 dose MAL exposure considering its oral LD50 for male rats (EPA, 2000) and, even so,
32 they were enough to change the structure and functioning of the neuromuscular
33 system of the colonic wall as we explain below.

1 In rats exposed to 10 mg/Kg, the frequency of contractions was not altered
2 regardless of their type and colon region, but they were less frequent in the oral-aboral
3 direction (anterograde) and more frequent in the opposite direction, especially in the
4 medial region of the colon, in rats from the M50 group. This change in the number of
5 contractions reflected on the frequency of CMMCs, which were drastically reduced in
6 the anterograde direction and increased in the retrograde direction in these same rats.

7 CMMCs promote luminal content propulsion and, physiologically, they are
8 normally more frequent in the anterograde direction so that colonic content progresses
9 to the anal direction (Heredia *et al.*, 2009). The force resulting from the combination of
10 anterograde and retrograde contractions contributes to the speed at which the luminal
11 content passes through the entire colon until be expelled, which consequently implies
12 the frequency of elimination and consistency of faecal pellets (Wood, 2008; Li *et al.*,
13 2019). In *ex vivo* manometric analysis of whole colons, the luminal content traffic
14 velocity can be perceived by the duration of CMMCs, since the distance travelled by
15 the CMMC between the catheter sensors is always the same. Therefore, our results
16 demonstrate that 10 mg/kg of MAL does not affect the speed of colonic transit, since it
17 does not change the number and duration of CMMCs and, therefore, does not change
18 the water quantity in the faecal pellets of the M10 rats. On the other hand, 50 mg/kg of
19 MAL caused a reduction in the transit velocity within the intestinal colon since the
20 frequency of anterograde CMMCs decreased and their duration increased. Thus, it
21 would be expected that the faecal pellets eliminated by the M50 rats would be more
22 dehydrated, since they remained longer period of time submitted to the process of
23 water absorption in the colon. Intriguingly, our results revealed the opposite: faecal
24 pellets were 29.8% less dehydrated, indicating that the 50 mg/kg of MAL interfered
25 with one or more mechanisms of fluid flow between the lumen and colon wall.

26 Food arrives in the colon as fluid, where most of the water and electrolytes are
27 absorbed to form and reduce faecal mass (Sarna, 2010). The process of water
28 absorption in the colon is essential for the body's water balance (Phillips & Devroede,
29 1979; Milla, 2009) and, for this, its main purpose is to transport as much water as
30 possible from the lumen into the intestinal wall, even if the osmolarity of the luminal
31 content increases progressively during the formation of faeces (Camilleri & Linden,
32 2016; Camilleri *et al.*, 2017). Failures or disturbances on this process can contribute to
33 excessive water loss (diarrhoea) or constipation (Koch, 2003; Escudero-Hernández *et*

1 *al.*, 2020). The movement of fluid results from the flow of ions through the intestinal
2 epithelium, which can drive the movement of water to enter (secretion) or exit
3 (absorption) the lumen. Electrolyte transport involves multiple mechanisms and is
4 performed by a set of proteins located, in a highly specific way, in the apical and/or
5 basolateral plasma membrane of enterocytes, as reviewed by Rao (2019). We
6 highlight here the ion channels coupled or not with ATPases. The movement of water
7 between the lumen and the colon wall is mainly driven by the electrogenic flow of Na⁺
8 and Cl⁻ ions, throughout their entire length, and K⁺ ions, specifically in the distal colon
9 (Venkatasubramanian *et al.*, 2010; Frizzell & Hanrahan, 2012). It is important to note
10 that the flow of these ions is directly or indirectly dependent on the availability of ATP.
11 Considering that MAL can damage mitochondria and, thus, cause less production of
12 ATP (Delgado *et al.*, 2006), it is suggested that this lower availability of energy may
13 have contributed to misadjust the delicate electrochemical balance between the lumen
14 and the epithelium colonic, which contributed to less dehydration of the faeces of the
15 M50 rats. Furthermore, studies consider that, in the colon, the surface epithelium in
16 contact with the lumen is more absorptive, while the crypt epithelium is more secretory
17 (Field, 2003; Rao *et al.*, 2012; Karami-Mohajeri *et al.*, 2014; Cid *et al.*, 2018).
18 Interestingly, these structures were amplified in the M50 rats and were not altered in
19 the M10, which may also have contributed to the fact that the faecal pellets of the M50
20 rats were less dehydrated, which was not observed in the M10 rats.

21 The colonic motility process starts mainly with stimuli due to the presence of
22 food or other substance in the lumen through the activation of chemoreceptors and
23 mechanoreceptors that activate neuronal circuits of the ENS (Sarna, 2010; Furness *et al.*,
24 2014). Consequently, enteric motor neurons release excitatory and inhibitory
25 neurotransmitters in response to afferent signals from gut wall sensory
26 receptors. Smooth muscle cells respond by generating slow waves and initiate
27 excitation-contraction and excitation-inhibition cycles in response to excitatory and
28 inhibitory neurotransmitters (Sarna, 2010). Colonic contractions are important not only
29 to propel the luminal content but also to carry out mixing movements, which increase
30 the physical interaction between the luminal content and the intestinal epithelium,
31 which favours the absorption of water, electrolytes and vitamins (Lammert *et al.*, 2014;
32 Li *et al.*, 2019).

1 Among the parameters evaluated, we highlight the temporal characteristics of
2 contractions such as frequency, amplitude and duration, as well as the spatial ones
3 that include the direction, distance and velocity of propagation, which together will
4 determine their effectiveness in mixing/rotation and propulsion of faecal material (Haba
5 & Sarna, 1993; Sarna, 1993, 2010). In addition to frequency, amplitude and duration
6 of propulsive and non-propulsive contractions directly influence the intensity of the
7 force that will be applied to the luminal content and the combination of these two
8 parameters can be perceived by the AUC values (Gourcerol *et al.*, 2009). In this sense,
9 it is noteworthy that increased AUC values were observed in both groups exposed to
10 MAL for simultaneous contractions in practically the entire length of the colon. In M10
11 this increase was the result of stronger (amplitude) and longer contractions, while in
12 the M50 this increase was only the result of stronger contractions. The physiological
13 role of simultaneous contractions is not well understood, but they have been related to
14 delaying colonic transit and favouring mixing movements (Rao *et al.*, 2001), although
15 recent studies have shown that simultaneous pressure waves in colonic manometry
16 performed in humans may be associated with gas expulsion and internal anal sphincter
17 relaxation (Chen *et al.*, 2017).

18 Long-term and low dose of MAL exposure causes dose-dependent changes in
19 rat colonic morphophysiology. The lowest dose evaluated (10 mg/Kg) did not change
20 the gastrointestinal transit time, even so it caused several changes in the colonic.
21 Generalized atrophy of the colonic wall indicates a protective process of the organism
22 to try to reduce its contact with MAL, however it was not effective enough to prevent
23 loss of general myenteric and nitrergic neurons and morphological adaptations. These
24 changes triggered adjustment in the colon motility pattern, since contractions that
25 occurred simultaneously were stronger and longer and a longer period of relaxation
26 between contractions were observed, without implying a significant change in the
27 profile of CMMCs.

28 The 50 mg/kg dose, on the other hand, showed a greater exacerbation of the
29 effects, which were noticeable as the reduction in gastrointestinal transit time that led
30 to an increase in the process of elimination of faecal pellets, which still contained more
31 mass and more water, demonstrating that there were changes in the faecal pellet
32 formation process. In addition, the aggression led to a process of mucosal hypertrophy
33 and increased depth of intestinal crypts, atrophy of the other layers of the colon, and

1 partial loss of the general population of enteric neurons in MP. The reduction in the
2 frequency of anterograde CMMCs and the increase in the frequency of retrograde
3 CMMCs, which could indicate a delay in colonic transit, demonstrate that the lower
4 dehydration of the faecal pellets was probably due, among other factors, to an
5 impairment of fluid flow between the lumen and colonic mucosa.

6 Therefore, we can conclude that long-term and low dose of MAL exposure can
7 pose risks to the health of humans and animals, especially for colonic physiology. It is
8 recommended that further studies be carried out to determine the mechanisms that
9 may be involved in the changes observed in the colon and ENS. In the absence of less
10 toxic alternatives, the use of OP is still necessary for the eradication of agricultural
11 pests and those that threaten public health. Although there is a collective benefit, it is
12 imperative that there is government control so that accidental, occupational and
13 environmental contamination can be reduced.

14 Competing interests:

15 The authors declare no conflict of interest.

16 Author contributions:

17 Conception or design of the work - ACEP, CRB, PSW, GSAF, RPE, EJAA.
18 Acquisition of data - ACEP, CRB, CCAM, RPE, GBCS, FAG, ANCS. Analysis and
19 interpretation of data- ACEP, CRB, FAG, EJAA. Drafting of the manuscript – ACEP,
20 EJAA. Critical revision of the manuscript for important intellectual content – ACEP,
21 EJAA. – Statistical analysis – ACEP. Administrative, technical or material support-
22 ACEP, CRB, CCAM, PSW, GSAF, RPE, GBCS, FAG, ANCS, AB, EJAA. Study
23 supervision - GSAF, EJAA. All authors have read and approved the final version of this
24 manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that
25 questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately
26 investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship,
27 and all those who qualify for authorship are listed.

1 **References**

- 2 Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SH, Khan W, El-Masry
3 EM & Abou-Donia MB (2004). Neurological deficits induced by malathion, DEET,
4 and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A*
5 **67**, 331–356.
- 6 Abdel-Salam OE, Sleem A, Youness E & Morsy F (2018). Preventive effects of
7 cannabis on neurotoxic and hepatotoxic activities of malathion in rat. *Asian Pac*
8 *J Trop Med* **11**, 272.
- 9 Ahmed D, Abdel Rahman RH, Salama M, El Zalabany LM & El Harouny MA (2017).
10 Malathion Neurotoxic Effects on Dopaminergic System in Mice: Role of
11 Inflammation. *J Biomed Sci*; DOI: 10.4172/2254-609X.100074.
- 12 Aktar MW, Sengupta D & Chowdhury A (2009). Impact of pesticides use in
13 agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* **2**, 1–12.
- 14 Aktar R, Peiris M, Fikree A, Cibert-Goton V, Walmsley M, Tough IR, Watanabe P,
15 Araujo EJA, Mohammed SD, Delalande JM, Bulmer DC, Scott SM, Cox HM,
16 Voermans NC, Aziz Q & Blackshaw LA (2018). The extracellular matrix
17 glycoprotein tenascin-X regulates peripheral sensory and motor neurones. *J*
18 *Physiol* **596**, 4237–4251.
- 19 Anjitha R, Antony A, Shilpa O, Anupama KP, Mallikarjunaiah S & Gurushankara HP
20 (2020). Malathion induced cancer-linked gene expression in human
21 lymphocytes. *Environ Res* **182**, 109131.
- 22 Aoki Y, Morishita M & Takayama K (2005). Role of the mucous/glycocalyx layers in
23 insulin permeation across the rat ileal membrane. *Int J Pharm* **297**, 98–109.
- 24 ATSDR (2003). Toxicological Profile for Malathion. *US Dep Heal Hum Serv Agency*
25 *Toxic Subst Dis Regist Atlanta, UAS*.
- 26 Azzouz LL & Sharma S (2020). *Physiology, Large Intestine*. StatPearls Publishing.
27 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939634> [Accessed February
28 8, 2021].
- 29 Badr AM (2020). Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic
30 effects in mammals and potential treatments. *Environ Sci Pollut Res* **27**, 26036–

- 1 26057.
- 2 Birchenough GMH, Johansson ME V, Gustafsson JK, Bergström JH & Hansson GC
3 (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal*
4 *Immunol* **8**, 712–719.
- 5 Bódi N, Szalai Z & Bagyánszki M (2019). Nitroergic Enteric Neurons in Health and
6 Disease—Focus on Animal Models. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/IJMS20082003.
- 7 Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
8 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*
9 **72**, 248–254.
- 10 Braga IA & Valle D (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e
11 resistência. *Epidemiol e Serviços Saúde* **16**, 279–293.
- 12 Calaf GM & Roy D (2008). Cancer genes induced by malathion and parathion in the
13 presence of estrogen in breast cells. *Int J Mol Med* **21**, 261–268.
- 14 Camilleri M & Linden DR (2016). Measurement of Gastrointestinal and Colonic Motor
15 Functions in Humans and Animals. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **2**, 412–428.
- 16 Camilleri M, Sellin JH & Barrett KE (2017). Pathophysiology, Evaluation, and
17 Management of Chronic Watery Diarrhea. *Gastroenterology* **152**, 515-532.e2.
- 18 Campaña AD, Sanchez F, Gamboa C, Gómez-Villalobos MDJ, De La Cruz F,
19 Zamudio S & Flores G (2008). Dendritic morphology on neurons from prefrontal
20 cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice
21 exposed to repeated low dose of malathion. *Synapse* **62**, 283–290.
- 22 Carbone SE, Jovanovska V, Brookes SJH & Nurgali K (2016). Electrophysiological
23 and morphological changes in colonic myenteric neurons from chemotherapy-
24 treated patients: a pilot study. *Neurogastroenterol Motil* **28**, 975–984.
- 25 Chen J-H, Yu Y, Yang Z, Yu W-Z, Chen WL, Yu H, Kim MJ-M, Huang M, Tan S, Luo
26 H, Chen J, Chen JDZ & Huizinga JD (2017). Intraluminal pressure patterns in the
27 human colon assessed by high-resolution manometry. *Sci Rep* **7**, 41436.
- 28 Cid LP, Jentsch TJ & Sepúlveda F V. (2018). Reply from L. P. Cid, T. J. Jentsch and
29 F. V. Sepúlveda: intestinal electrolyte and fluid secretion - a model in trouble? *J*

- 1 *Physiol* **596**, 2465–2466.
- 2 Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH & Hazman O (2015). Boron attenuates
3 malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats.
4 *Drug Chem Toxicol* **38**, 391–399.
- 5 Colosio C, Tiramani M & Maroni M (2003). Neurobehavioral effects of pesticides:
6 state of the art. *Neurotoxicology* **24**, 577–591.
- 7 Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM & Vasic VM (2013).
8 Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr*
9 *Neuropharmacol* **11**, 315–335.
- 10 Correa OP, Mari RB, Toledo EL, Guimarães JP, Pereira, Germano RM, Faria HG,
11 Souza RR & Stabille (2011). *Effects of the ingestion of 2,4*
12 *Dichlorophenoxyacetic acid on jejunal myenteric neurons in rats.*
- 13 Darwiche W, Delanaud S, Dupont S, Ghamlouch H, Ramadan W, Joumaa W, Bach V
14 & Gay-Quéheillard J (2017). Impact of prenatal and postnatal exposure to the
15 pesticide chlorpyrifos on the contraction of rat ileal muscle strips: involvement of
16 an inducible nitric oxide synthase-dependent pathway. *Neurogastroenterol Motil*
17 **29**, e12918.
- 18 Delgado EHB, Streck EL, Quevedo JL & Dal-Pizzol F (2006). Mitochondrial
19 respiratory dysfunction and oxidative stress after chronic malathion exposure.
20 *Neurochem Res* **31**, 1021–1025.
- 21 Eddleston M (2019). Novel Clinical Toxicology and Pharmacology of
22 Organophosphorus Insecticide Self-Poisoning. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **59**,
23 341–360.
- 24 El-Bini Dhouib I, Lasram MM, Annabi A, Gharbi N & El-Fazaa S (2015). A
25 comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat
26 liver and spleen. *Pestic Biochem Physiol* **124**, 21–28.
- 27 EPA (2009). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion. *EPA 738-R-06-*
28 *030213*. Available at:
29 [https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/malathion-red-](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/malathion-red-revised.pdf)
30 [revised.pdf](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/malathion-red-revised.pdf) [Accessed October 15, 2016].

- 1 EPA USEPA (2000). PROPOSED PLAN. NORTHWEST PIPE AND CASING/HALL
2 PROCESS COMPANY SITE.
- 3 EPA USEPA (2011). Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market
4 Estimates. *US Environ Prot Agency* 1–41.
- 5 Erthal R, Siervo G, Staurengo-Ferrari L, Fattori V, Pescim R, Verri W & Fernandes G
6 (2020a). Impairment of postnatal epididymal development and immune
7 microenvironment following administration of low doses of malathion during
8 juvenile and peripubertal periods of rats. *Hum Exp Toxicol* **39**, 1487–1496.
- 9 Erthal RP, Staurengo-Ferrari L, Fattori V, Luiz KG, Cunha FQ, Pescim RR, Cecchini
10 R, Verri WA, Guarnier FA & Alves Fernandes GS (2020b). Exposure to low
11 doses of malathion during juvenile and peripubertal periods impairs testicular
12 and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and testosterone. *Reprod*
13 *Toxicol* **96**, 17–26.
- 14 Escudero-Hernández C, Münch A, Østvik A-E, Granlund A van B & Koch S (2020).
15 The Water Channel Aquaporin 8 is a Critical Regulator of Intestinal Fluid
16 Homeostasis in Collagenous Colitis. *J Crohns Colitis* **14**, 962–973.
- 17 FAO (2003). *Food Insecurity in the World*. Rome - Italy. Available at:
18 <http://www.fao.org/3/j0083e/j0083e00.pdf> [Accessed February 3, 2021].
- 19 Field M (2003). Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin*
20 *Invest* **111**, 931–943.
- 21 Fortunato JJ, Feier G, Vitali AM, Petronilho FC, Dal-Pizzol F & Quevedo J (2006).
22 Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res* **31**,
23 671–678.
- 24 Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM & Panayiotidis MI (2009).
25 Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutat*
26 *Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* **674**, 3–22.
- 27 Frizzell RA & Hanrahan JW (2012). Physiology of epithelial chloride and fluid
28 secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med*; DOI: 10.1101/cshperspect.a009563.
- 29 Furness JB (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv*
30 *Syst* **81**, 87–96.

- 1 Furness JB (2006). *The Enteric Nervous System*, 1st edn.ed. Alison Brown. Wiley-
2 Blackwell, Nova York. Available at: <http://www.blackwellpublishing.com>.
- 3 Furness JB (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev*
4 *Gastroenterol Hepatol* **9**, 286–294.
- 5 Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR & Cho HJ (2014). The enteric nervous system
6 and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Adv Exp*
7 *Med Biol* **817**, 39–71.
- 8 Gaudier E & Hoebler C (2006). Physiological role of mucins in the colonic barrier
9 integrity. *Gastroenterol Clin Biol* **30**, 965–974.
- 10 Gerunova LK, Bardina EG & Sechkina I V. (2020). Morphofunctional changes in the
11 organs of excretion and detoxification with pesticides prolonged low-dose
12 exposure. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, p.
13 072051. IOP Publishing Ltd. Available at:
14 <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/548/7/072051> [Accessed
15 December 28, 2020].
- 16 Ghasemi-Niri SF, Maqbool F, Baeeri M, Gholami M & Abdollahi M (2016).
17 Phosalone-induced inflammation and oxidative stress in the colon: Evaluation
18 and treatment. *World J Gastroenterol* **22**, 4999–5011.
- 19 Gillois K, Lévêque M, Théodorou V, Robert H & Mercier-Bonin M (2018). Mucus: An
20 Underestimated Gut Target for Environmental Pollutants and Food Additives.
21 *Microorganisms* **6**, 53.
- 22 Glass T, Dalvie MA, Holtman Z, Vorster AA, Ramesar RS & London L (2018). DNA
23 variants and organophosphate neurotoxicity among emerging farmers in the
24 Western Cape of South Africa. *Am J Ind Med* **61**, 11–20.
- 25 Gourcerol G, Wang L, Adelson DW, Larauche M, Taché Y & Million M (2009).
26 Cholinergic giant migrating contractions in conscious mouse colon assessed by
27 using a novel noninvasive solid-state manometry method: modulation by
28 stressors. *Am J Physiol Liver Physiol* **296**, G992–G1002.
- 29 Haba T & Sarna SK (1993). Regulation of gastroduodenal emptying of solids by
30 gastropyloroduodenal contractions. <https://doi.org/10.1152/ajpgi19932642G261>;

- 1 DOI: 10.1152/AJPGI.1993.264.2.G261.
- 2 Harrington AM, Hutson JM & Southwell BR (2010). Cholinergic neurotransmission
3 and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem*
4 *Cytochem* **44**, 173–202.
- 5 Heredia DJ, Dickson EJ, Bayguinov PO, Hennig GW & Smith TK (2009). Localized
6 Release of Serotonin (5-Hydroxytryptamine) by a Fecal Pellet Regulates
7 Migrating Motor Complexes in Murine Colon. *Gastroenterology* **136**, 1328–1338.
- 8 Junqueira LC & Carneiro J (2017). *Histologia Básica Texto & Atlas*, 13^a. Editora
9 Guanabara Koogan Ltda, Rio de Janeiro - RJ.
- 10 Kamanyire R (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup*
11 *Med (Chic Ill)* **54**, 69–75.
- 12 Karami-Mohajeri S, Hadian M, Fouladdel S, Azizi E, Ghahramani M, Hosseini R &
13 Abdollahi M (2014). Mechanisms of muscular electrophysiological and
14 mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an
15 organophosphorus pesticide. *Hum Exp Toxicol* **33**, 251–263.
- 16 Kaur K & Kaur R (2018). Occupational pesticide exposure, impaired DNA repair, and
17 diseases. *Indian J Occup Environ Med* **22**, 74.
- 18 Koch TR (2003). *Colonic Diseases*ed. Catanese T. © Springer Science+Business
19 Media New York 2003, Totowa, New Jersey.
- 20 Lammert E, Editors MZ & Physiology O (2014). *Metabolism of Human Diseases*ed.
21 Lammert E & Zeeb M. Springer Vienna, Vienna. Available at:
22 <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-0715-7>.
- 23 Leary S & Johnson CL (2020). *AVMA GUIDELINES FOR THE EUTHANASIA OF*
24 *ANIMALS: 2020 EDITION AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020*
25 *Edition* Members of the Panel on Euthanasia AVMA Staff Consultants*.
- 26 Li S, Fei G, Fang X, Yang X, Sun X, Qian J, Wood JD & Ke M (2016). Changes in
27 enteric neurons of small intestine in a rat model of irritable bowel syndrome with
28 diarrhea. *J Neurogastroenterol Motil* **22**, 310–320.
- 29 Li Z, Hao MM, Van den Haute C, Baekelandt V, Boesmans W & Vanden Berghe P

- 1 (2019). Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility
2 patterns in the mouse large intestine. *Elife* **8**, 1–27.
- 3 Lockridge O, Norgren RB, Johnson RC & Blake TA (2016). Naturally Occurring
4 Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and
5 Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors.
6 *Chem Res Toxicol* **29**, 1381–1392. Available at: /pmc/articles/PMC5030680/
7 [Accessed July 8, 2021].
- 8 Lockridge O & Schopfer LM (2006). Biomarkers of Organophosphate Exposure. In
9 *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*, pp. 703–711.
10 Elsevier. Available at:
11 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120885237500491> [Accessed
12 December 18, 2020].
- 13 Lopes CRP, Ferreira PEB, Zanoni JN, Alves AMP, Alves ÉPB & Buttow NC (2012).
14 Neuroprotective Effect of Quercetin on the Duodenum Enteric Nervous System
15 of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Dig Dis Sci* **57**, 3106–3115.
- 16 Lott EL & Jones EB (2020). *Cholinergic Toxicity*. StatPearls Publishing. Available at:
17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539783/> [Accessed January 19, 2021].
- 18 Machado CCA, Watanabe P da S, Mendes JD de L, Pupim ACE, Ortigoza SM,
19 Bergoc HG, Nino B de SL, Góis MB, Garcia JL, Blackshaw LA, Sant’Ana D de
20 MG & Araújo EJ de A (2021). *Toxoplasma gondii* infection impairs the colonic
21 motility of rats due to loss of myenteric neurons. *Neurogastroenterol Motil*; DOI:
22 10.1111/nmo.13967.
- 23 Manoharan I, Boopathy R, Darvesh S & Lockridge O (2007). A medical health report
24 on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India.
25 *Clin Chim Acta* **378**, 128–135.
- 26 Maroni M, Colosio C, Ferioli A & Fait A (2000). Introduction. *Toxicology* **143**, 5–118.
- 27 Marrs TC (1993). Organophosphate poisoning. *Pharmacol Ther* **58**, 51–66.
- 28 Mileson B (1998). Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of
29 Organophosphorus Pesticides,. *Toxicol Sci* **41**, 8–20.
- 30 Milla PJ (2009). Advances in Understanding Colonic Function. *J Pediatr*

- 1 *Gastroenterol Nutr* **48**, S43–S45.
- 2 Mongardi Fantaguzzi C, Thacker M, Chiocchetti R & Furness JB (2009). Identification
3 of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. *Cell Tissue Res*
4 **336**, 179–189.
- 5 NAC/AEGL Committee NAC for AEGL (2009). *Malathion Interim AEGL Document*.
- 6 Nagakura Y, Naitoh Y, Kamato T, Yamano M & Miyata K (1996). Compounds
7 possessing 5-HT₃ receptor antagonistic activity inhibit intestinal propulsion in
8 mice. *Eur J Pharmacol* **311**, 67–72.
- 9 Naughton SX & Terry A V. (2018). Neurotoxicity in acute and repeated
10 organophosphate exposure. *Toxicology* **408**, 101–112.
- 11 Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP & White SS (1980). Recent advances in the
12 endocrinology of puberty. *Endocr Rev* **1**, 228–257.
- 13 Parrón T, Requena M, Hernández AF & Alarcón R (2011). Association between
14 environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol*
15 *Appl Pharmacol* **256**, 379–385.
- 16 Phillips SF & Devroede GJ (1979). Functions of the large intestine. *Int Rev Physiol*
17 **19**, 263–290.
- 18 Quan X, Yang Z, Xue M, Chen J-H & Huizinga JD (2017). Relationships between
19 motor patterns and intraluminal pressure in the 3-taeniated proximal colon of the
20 rabbit. *Sci Rep* **7**, 42293.
- 21 Rady MI (2009). Effects of exposure to diazinon on the lung and small intestine of
22 guinea pig, histological and some histochemical changes. *Brazilian Arch Biol*
23 *Technol* **52**, 317–326.
- 24 Rao MC (2019). Physiology of electrolyte transport in the gut: Implications for
25 disease. *Compr Physiol* **9**, 947–1023.
- 26 Rao MC, Sarathy J & Ao M (2012). Intestinal Water and Electrolyte Transport in
27 Health and Disease. *Colloq Ser Integr Syst Physiol From Mol to Funct* **4**, 1–105.
- 28 Rao SSC, Sadeghi P, Beaty J, Kavlock R & Ackerson K (2001). Ambulatory 24-h
29 colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Liver Physiol* **280**, G629–

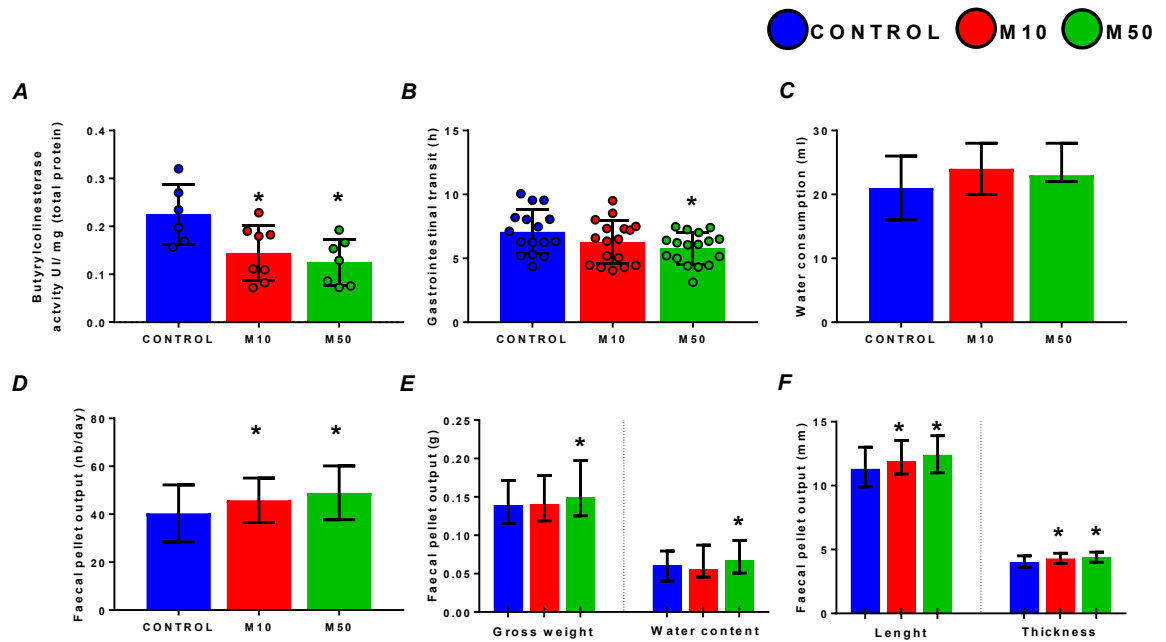
- 1 G639.
- 2 Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M & Vicario
3 M (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease.
4 *Rev Española Enfermedades Dig* **108**, 686–696.
- 5 Sarabia L, Maurer I & Bustos-Obregón E (2009). Melatonin prevents damage elicited
6 by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol*
7 *Environ Saf* **72**, 663–668.
- 8 Sarna SK (1993). Colonic Motor Activity. *Surg Clin North Am* **73**, 1201–1223.
- 9 Sarna SK (2010). *Colonic Motility - From Bench Side to Bedside*. Morgan & Claypool
10 Life Sciences. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53477/>
11 [Accessed July 16, 2021].
- 12 Sasselli V, Pachnis V & Burns AJ (2012). The enteric nervous system. *Dev Biol* **366**,
13 64–73.
- 14 Schneider S, Wright CM & Heuckeroth RO (2019). Unexpected Roles for the Second
15 Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. *Annu*
16 *Rev Physiol* **81**, 235–259.
- 17 Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H & Marzouki L (2018). Malathion, an
18 organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular
19 disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. *Toxicol Reports* **5**, 189–
20 195.
- 21 Sharma S, Kaur K & Dhalla AS (2011). Toxicological Effects of Methyl Parathion and
22 Protection Afforded by Ascorbic Acid in Small Intestine of Swiss Albino Mice: A
23 Histological and Histometric Study. *J Life Sci* **3**, 121–126.
- 24 Specian RD & Oliver MG (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *Am J*
25 *Physiol Physiol* **260**, C183–C193.
- 26 Takahashi T, Shiraishi A & Murata J (2018). The coordinated activities of nAChR and
27 Wnt signaling regulate intestinal stem cell function in mice. *Int J Mol Sci* **19**, 738.
- 28 Taylor P, Radic Z, Hosea NA, Camp S, Marchot P & Berman HA (1995). Structural
29 bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol Lett*

- 1 **82–83**, 453–458.
- 2 Tchounwou PB, Patlolla AK, Yedjou CG & Moore PD (2015). Environmental
3 Exposure and Health Effects Associated with Malathion Toxicity. In *Toxicity and*
4 *Hazard of Agrochemicals*. InTech. Available at:
5 [http://www.intechopen.com/books/toxicity-and-hazard-of-](http://www.intechopen.com/books/toxicity-and-hazard-of-agrochemicals/environmental-exposure-and-health-effects-associated-with-malathion-toxicity)
6 [agrochemicals/environmental-exposure-and-health-effects-associated-with-](http://www.intechopen.com/books/toxicity-and-hazard-of-agrochemicals/environmental-exposure-and-health-effects-associated-with-malathion-toxicity)
7 malathion-toxicity [Accessed November 2, 2016].
- 8 Thompson CA, DeLaForest A & Battle MA (2018). Patterning the gastrointestinal
9 epithelium to confer regional-specific functions. *Dev Biol* **435**, 97–108.
- 10 TOMIMARU A, ARIMORI K, INOTSUME N & NAKANO M (1996). Effect of Activated
11 Charcoal and Atropine on Absorption and/or Exsorption of Organophosphorus
12 Compounds in Rats. *J Pharm Pharmacol* **48**, 351–356.
- 13 Venkatasubramanian J, Rao MC & Sellin JH (2010). Intestinal Electrolyte Absorption
14 and Secretion. In *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*,
15 pp. 1675-1694.e3. Elsevier. Available at: [https://www.elsevier.com/books-and-](https://www.elsevier.com/books-and-journals/deleted-doi)
16 journals/deleted-doi [Accessed February 9, 2021].
- 17 Videira RA, Antunes-Madeira MC, Lopes VICF & Madeira VMC (2001). Changes
18 induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid
19 physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochim Biophys Acta -*
20 *Biomembr* **1511**, 360–368.
- 21 Vismaya & Rajini PS (2014). Oral exposure to the organophosphorus insecticide,
22 Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol* **71**,
23 236–243.
- 24 Voorhees JR, Remy MT, Erickson CM, Dutca LM, Brat DJ & Pieper AA (2019).
25 Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates
26 deficits in a rat model of Alzheimer's disease. *npj Aging Mech Dis* **5**, 3.
- 27 WHO WHO (2016). *USE OF MALATHION FOR VECTOR CONTROL REPORT OF A*
28 *WHO MEETING GENEVA*. GENEVA. Available at:
29 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/207475/9789241510578_eng.pdf
30 f [Accessed February 7, 2021].

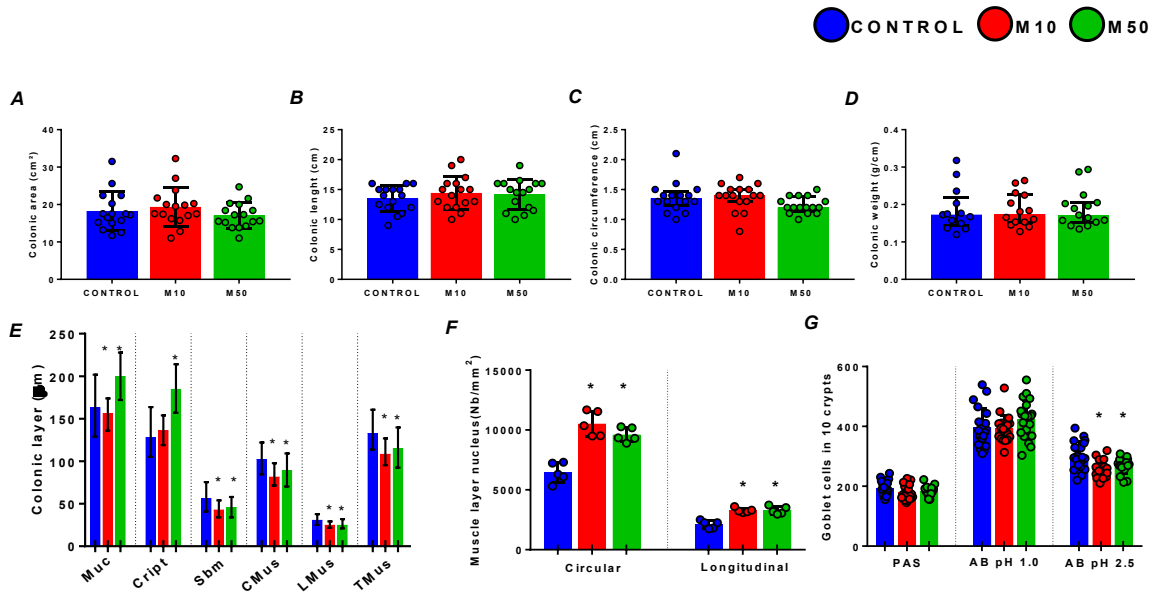
- 1 WHO WHO, FOR SP & TDR TITD (2009). *Dengue Guidelines for Diagnosis,*
2 *Treatment, Prevention and Control.* World Health Organization. Available at:
3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762963> [Accessed October 15, 2016].
- 4 Winston JH, Li Q & Sarna SK (2013). Paradoxical regulation of ChAT and nNOS
5 expression in animal models of Crohn's colitis and ulcerative colitis. *Am J*
6 *Physiol - Gastrointest Liver Physiol*; DOI: 10.1152/AJPGI.00052.2013.
- 7 Wood JD (2008). Enteric nervous system: Reflexes, pattern generators and motility.
8 *Curr Opin Gastroenterol* **24**, 149–158.
- 9 Zaganas I, Kapetanaki S, Mastorodemos V, Kanavouras K, Colosio C, Wilks MF &
10 Tsatsakis AM (2013). Linking pesticide exposure and dementia: What is the
11 evidence? *Toxicology* **307**, 3–11.
- 12 Zhang X-J & Greenberg DS (2012). Acetylcholinesterase Involvement in Apoptosis.
13 *Front Mol Neurosci* **5**, 1–15.
- 14 Zucco F (1993). Freshly isolated cells and cell lines from the intestine as an in vitro
15 model for toxicological studies. *Toxicol Vitr* **7**, 397–402.

Table 1 - Antibodies used in the immunofluorescence technique

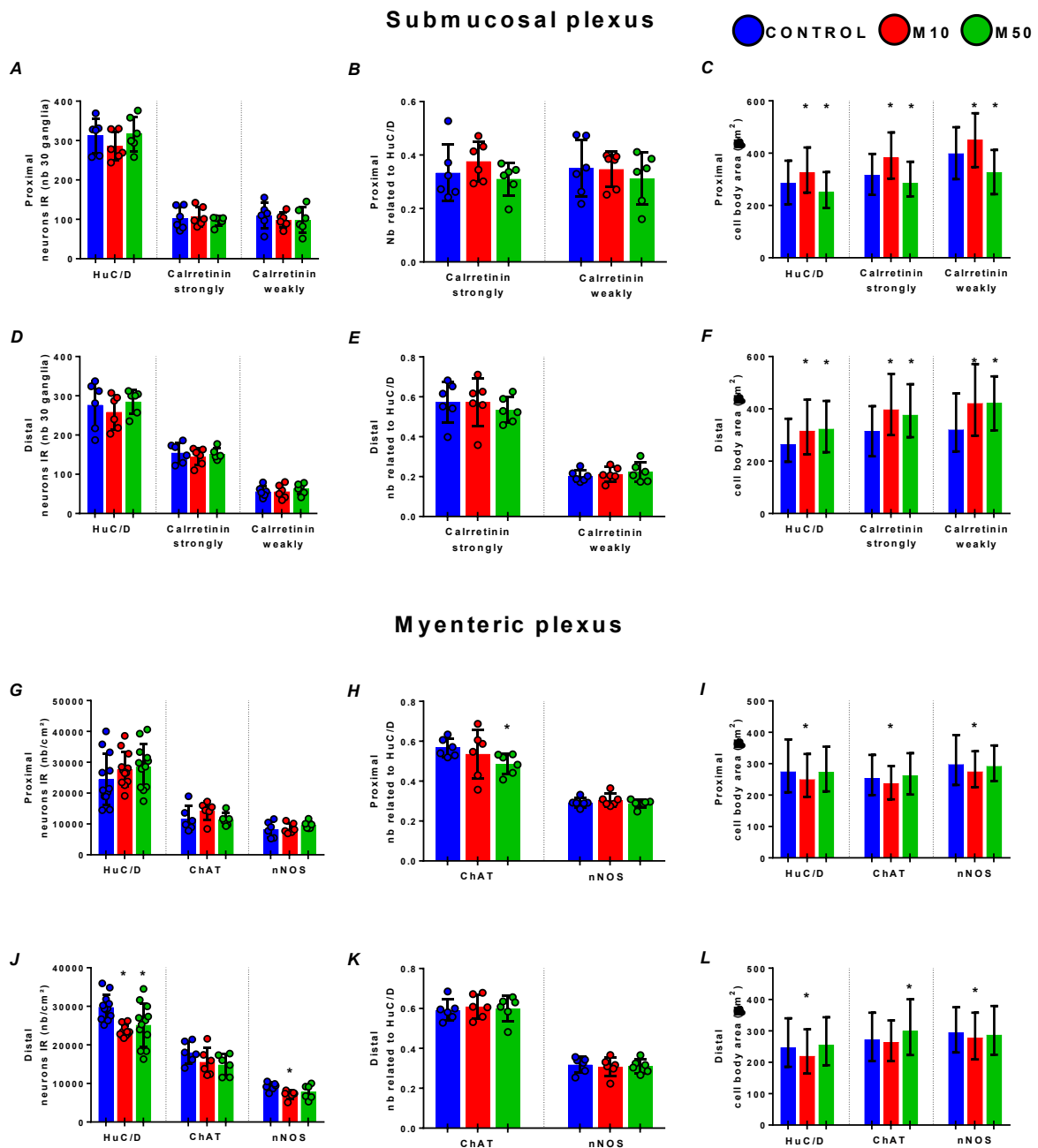
Primary					
	Specie	Code	Dilution	Mark	Plexus (P)
Anti-HuC/D	mouse	A21271	1:500	Thermo Fisher Scientific	Submucosal (SP) Myenteric (MP)
Anti-nNOS	rabbit	SC8309	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	MP
Anti-ChAT	goat	AB144P	1:100	EMD Millipore Corporation	MP
Anti-calretinin	goat	AB1550	1:1200	Merck Millipore	SP
Secondary					
Alexa Fluor (AF) 488 Donkey AF 568	anti-mouse	A21202	1:500	Molecular Probes	SP/MP
Donkey AF 568	anti-rabbit	A10042	1:500	Invitrogen	MP
Donkey AF 568	anti-goat	A11057	1:500	Invitrogen	SP/MP



1 Figure 1: Action of MAL on colonic physiology: (A) Action of MAL on BuChE enzyme activity: M10 ($P=$
2 0.029)* M50 ($P= 0.0079$)* ($n= 6-8$). (B) Gastrointestinal transit time (h): M10 ($P= 0.189$) M50 ($P= 0.020$)*
3 ($n=16-17$ /group). (C) Water consumption (ml): M10 ($P= 0.221$) M50 ($P= 0.079$) ($n= 5-7$ animals $\times 7$ days).
4 (D) Number of faecal pellets eliminated/day: M10 ($P= 0.002$)* M50 ($P= <0.0001$)* ($n= 10-11$ rats
5 $\times 7$ days/group). (E) Gross weight of faecal pellets (unit/g): M10 ($P= 0.357$) M50 ($P= < 0.023$)*. (E) Amount
6 of water present in the faecal pellets (unit/g) M10 ($P= 0.519$) M50 ($P= 0.017$)* ($n= 10-11$
7 rats $\times 7$ days/group) (F) Length and thickness of the faecal pellets (mm): M10/M50 ($P= < 0.0001$)* ($n =10-$
8 11 rats $\times 7$ days $\times 10$ pellets/group). (A-B, D) *Student's t test*, data shown as the mean \pm SD, (C, E-F)
9 *Mann-Whitney test*, data shown as the median with interquartile range. Control: blue, M10: red, M50:
10 green.

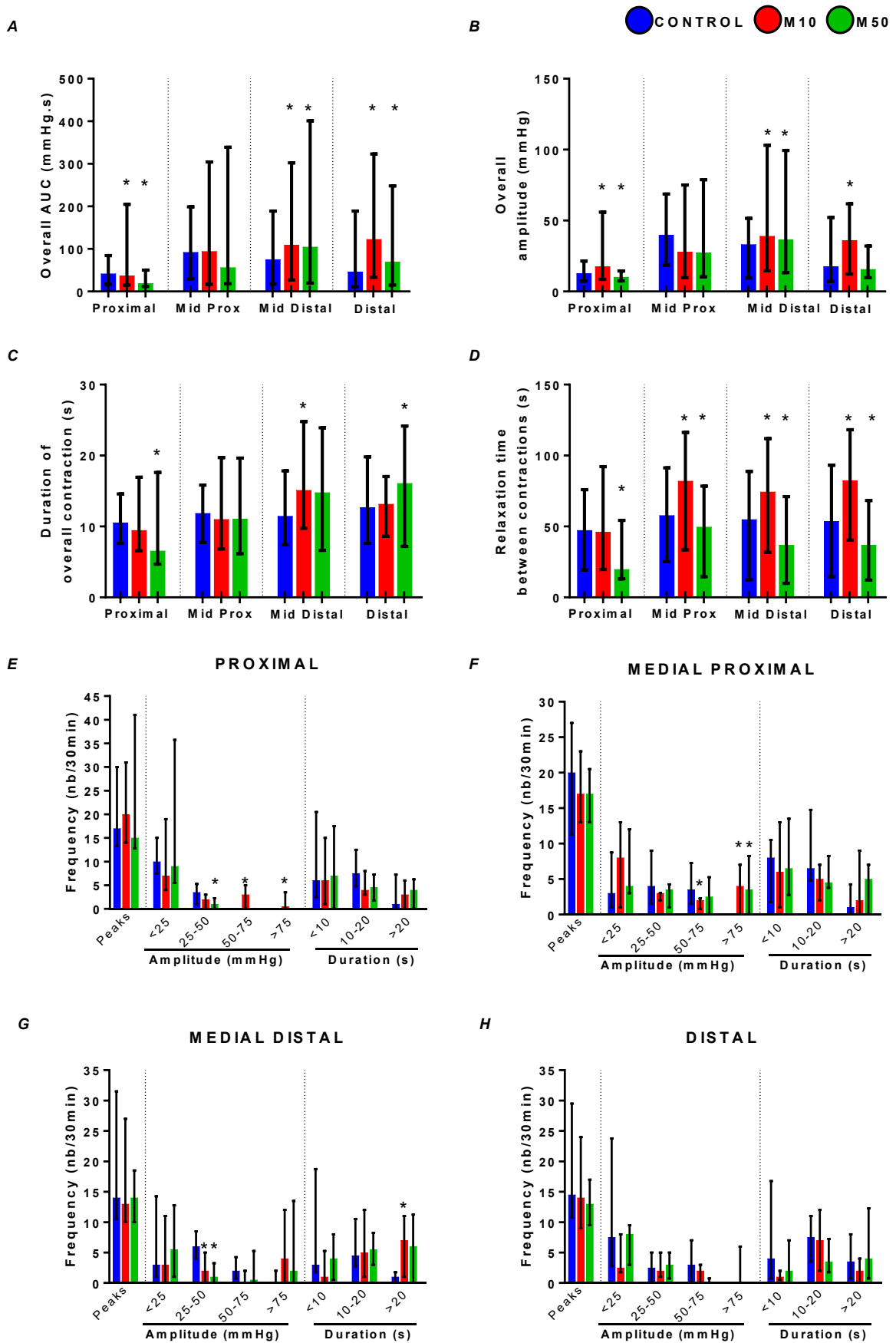


1 Figure 2: Macroscopic and histological colonic analyses. (A) Total area (cm²): M10 ($P= 0.546$) M50 ($P= 0.444$).
 2 (B) Length (cm): M10 ($P= 0.299$) M50 ($P= 0.427$). (C) Diameter of circumference (cm): M10 ($P= 0.430$) M50
 3 ($P= 0.082$). (D) Weight (g/cm): M10 ($P= 0.867$) M50 ($P= 0.820$) ($n= 14-16$ rats/group). (E) Colon layers μm :
 4 Muc: M10 ($P= 0.001$)* M50 ($P= <0.0001$)*; Crypt: M10 ($P= 0.063$) M50 ($P= <0.0001$)*; Sbm: M10/M50 ($P=$
 5 <0.0001)*; CMus: M10/M50 ($P= <0.0001$)*; LMus: M10/M50 ($P= <0.0001$)*; TMus: M10/M50 ($P= <0.0001$)*
 6 ($n= 5$ rats \times 4 slices \times 7 images \times 3 measurements/group). (F) Muscle layer nucleus (Nb/mm²): circular M10/M50
 7 ($P= 0.0001$)*, longitudinal M10 ($P= 0.0001$)* M50 ($P= 0.0004$)* ($n= 5$ rats \times 4 slices \times 5 images/group). (G)
 8 Goblet cells: PAS⁺ M10 ($P= 0.099$) M50 ($P= 0.222$); AB pH 1.0⁺ M10 ($P= 0.864$) M50 ($P= 0.193$); AB pH 2.5⁺
 9 M10 ($P= 0.0005$)* M50 ($P= 0.005$)* ($n= 5$ rats \times 4 sections \times 10 crypts/group). (A-B, F-G) *Student's t test*, data
 10 shown as the mean \pm SD. (C-E) *Mann-Whitney test*, data shown as the median with interquartile range. Mucosa
 11 (Muc), Crypt Depth (Crypt), Submucosal Layer (Sbm) Circular Muscle (CMus), Longitudinal Muscle (LMus),
 12 Total Muscle (TMus). Control: blue - M10: red - M50: green.



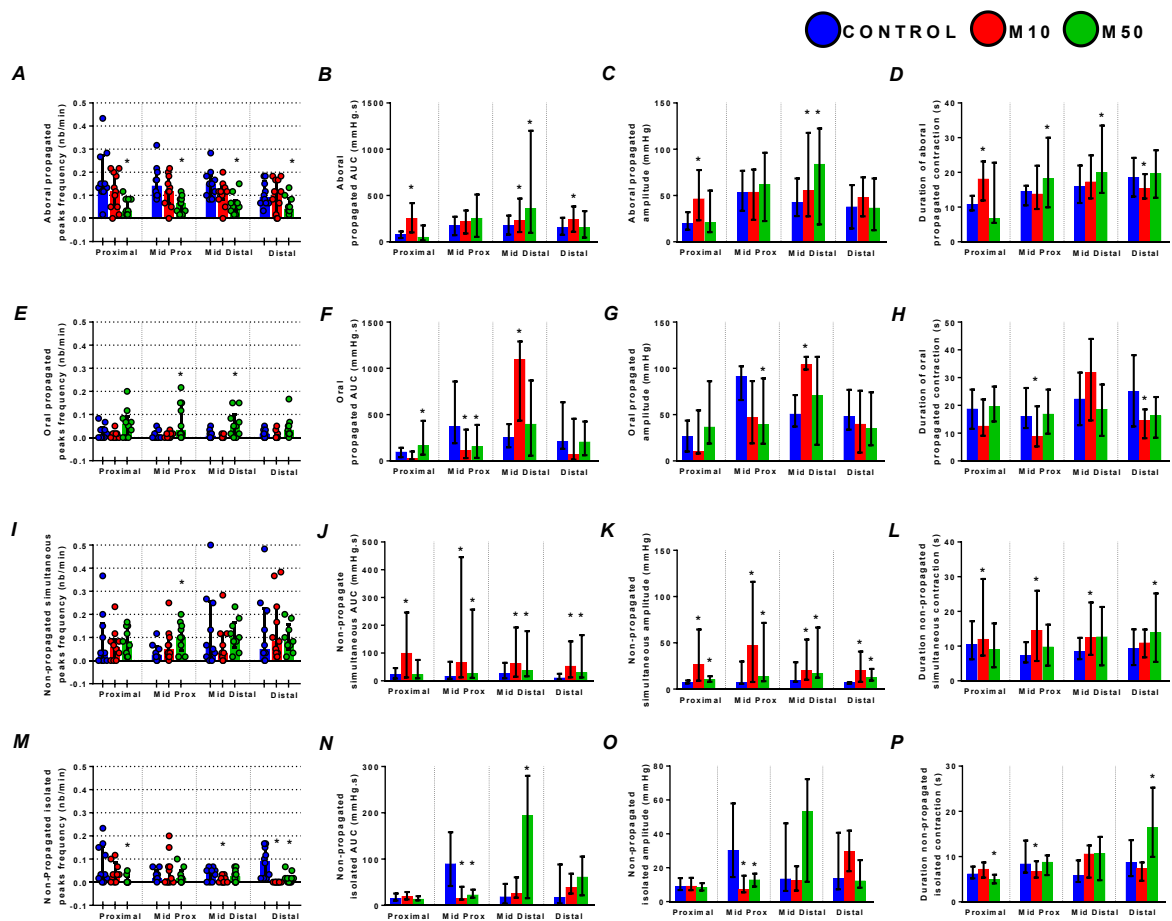
1 Figure 3: Neurons of the enteric nervous system (ENS) in the submucosal (SP) and myenteric (MP) plexus. (A-F)
 2 SP and (G-L) MP. (A-C) SP Proximal colon: (A) Neurons number (nb): Anti-HuC/D⁺: M10 ($P=0.270$) M50 ($P=$
 3 0.846); anti-calretinin (Calr⁺) strongly⁺: M10 ($P=0.783$) M50 ($P=0.627$); anti-Calr⁺ weakly⁺: M10 ($P=0.478$) M50
 4 ($P=0.574$). (B) Ratio anti-HuC/D⁺ to anti-Calr⁺ strongly⁺: M10 ($P=0.432$) M50 ($P=0.656$); anti-HuC/D⁺ to anti-Calr⁺
 5 weakly⁺: M10 ($P=0.929$) M50 ($P=0.519$) ($n=6$ rats/group). (C) Cell body area (μm^2): Anti-HuC/D⁺: M10/M50 ($P=$
 6 <0.0001)* ($n=6$ rats x 100 neurons/group); anti-Calr⁺ strongly⁺: M10 ($P= <0.0001$)* M50 ($P=0.012$)*, anti-Calr⁺
 7 weakly⁺: M10 ($P=0.0002$)* M50 ($P= <0.0001$)* ($n=6$ rats x 50 neurons /group). (D-F) SP Distal colon: (D) nb: Anti-
 8 HuC/D⁺: M10 ($P=0.570$) M50 ($P=0.772$); anti-Calr⁺ strongly⁺: M10 ($P=0.491$) M50 ($P=0.766$); anti-Calr⁺ weakly⁺:
 9 M10 ($P= >0.999$) M50 ($P=0.385$). (E) Ratio anti-HuC/D⁺ to anti-Calr⁺ strongly⁺: M10 ($P=0.639$) M50 ($P=0.427$) ($n=6$ rats/group). (F) Cell body area (μm^2): Anti-
 10 HuC/D⁺: M10/M50 ($P= <0.0001$)* ($n=6$ rats x 100 neurons/group); anti-Calr⁺ strongly⁺: M10/M50 ($P= <0.0001$)*,
 11 anti-Calr⁺ weakly⁺: M10/M50 ($P= <0.0001$)* ($n=6$ rats x 50 neurons/group). (G-I) MP Proximal colon: (G) nb: anti-
 12 HuC/D⁺ M10 ($P=0.263$) M50 ($P=0.194$); anti-ChAT⁺ M10 ($P=0.247$) M50 ($P=0.871$), anti-nNOS⁺ M10 ($P=0.817$)
 13 M50 ($P=0.288$) ($n=6-12$ rats/group). (H) Ratio anti-HuC/D to anti-ChAT⁺: M10 ($P=0.5683$) M50 ($P=0.017$)*; Anti-
 14 HuC/D to anti-nNOS⁺: M10 ($P=0.446$) M50 ($P=0.695$) ($n=6$ /group). (I) Cell body area (μm^2): anti-HuC/D⁺: M10 ($P=$
 15 <0.0001)* M50 ($P=0.297$), anti-ChAT⁺: M10 ($P=0.0001$)* M50 ($P=0.272$), anti-nNOS⁺: M10 ($P= <0.0001$)* M50
 16 ($P=0.407$) ($n=6-12$ rats x 100neurons/group). (J-L) MP Distal colon: (J) nb: anti-HuC/D⁺ M10 ($P= <0.0001$)* M50
 17 ($P= <0.0001$)* M50 ($P=0.297$), anti-ChAT⁺: M10 ($P=0.0001$)* M50 ($P=0.272$), anti-nNOS⁺: M10 ($P= <0.0001$)* M50

1 ($P= 0.021$)*; anti-ChAT⁺ M10 ($P= 0.215$) M50 ($P= 0.075$), anti-nNOS⁺ M10 ($P= 0.006$)* M50 ($P= 0.144$) (n=6-12
2 rats/group). (K) Ratio: anti-HuC/D to anti-ChAT⁺: M10 ($P= 0.595$) M50 ($P= 0.811$); anti-HuC/D to anti-nNOS⁺: M10
3 ($P= 0.689$) M50 ($P= 0.734$) (n=6/group). (L) Cell body area (μm^2): anti-HuC/D+: M10 ($P= <0.0001$)* M50 ($P= 0.148$),
4 anti-ChAT⁺: M10 ($P= 0.190$) M50 ($P= 0.0001$)*, anti-nNOS⁺: M10 ($P= 0.012$)* M50 ($P= 0.647$) (n=6-12 rats x 100
5 neurons/group). (A-B, D-E, G-H, J-K) Student's t test, data shown as the mean \pm SD. (C, F, I, L) Mann-Whitney
6 test, data shown as the median with interquartile range. Control: blue, M10: red, M50: green.



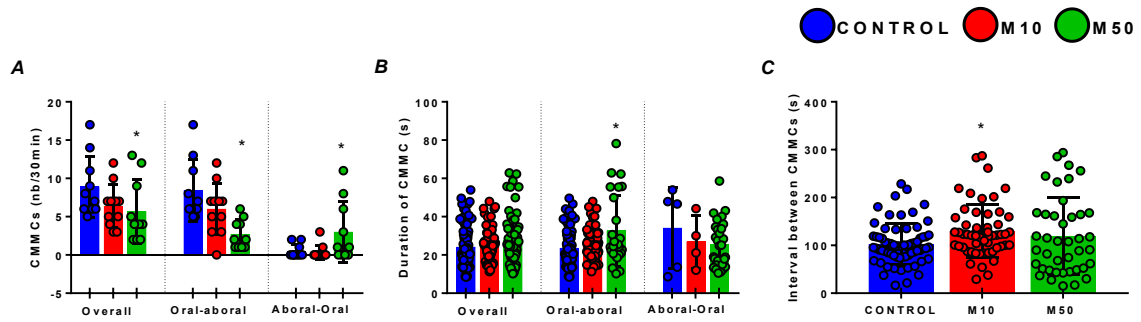
1 Figure 4: Analysis of general colonic intestinal motility in the proximal, medial proximal, medial distal and distal
 2 colon. (A) Area (mmHg.s): CP M10 ($P= 0.037$)* M50 ($P= 0.0002$)*, MPC M10 ($P= 0.258$) M50 ($P= 0.655$), MDC
 3 M10 ($P= 0.004$)* M50 ($P= 0.003$)* and DC M10 ($P= <0.0001$)* M50 ($P= 0.044$)*. (B) Amplitude (mmHg): PC M10

1 ($P= <0.0001$)* M50 ($P= 0.003$)*, MPC M10 ($P= 0.375$) M50 ($P= 0.390$), MDC M10 ($P= 0.0001$)* M50 ($P= <0.0001$)*,
 2 DC M10 ($P= 0.0005$)* M50 ($P= 0.736$). (C) Duration(s) contractions: PC M10 ($P= 0.486$) M50 ($P= 0.0003$)*, MPC
 3 M10 ($P= 0.926$) M50 ($P= 0.779$), MDC M10 ($P= 0.0001$)* M50 ($P= 0.091$), DC M10 ($P= 0.776$) M50 ($P= 0.043$)*.
 4 (D) Relaxation time(s) between contractions: PC M10 ($P= 0.093$) M50 ($P= <0.0001$)*, MPC M10 ($P= 0.008$)* M50
 5 ($P= 0.021$)*, MDC M10 ($P= 0.001$)* M50 ($P= 0.033$)*, DC M10 ($P= <0.0001$)* M50 ($P= 0.005$)*. (E-H) Histogram:
 6 number of peaks/30 min, number of animals/amplitude ranges (mmHg) and number of animals/contraction time
 7 ranges (s). (E) PC: Peaks: M10 ($P= 0.930$) M50 ($P= 0.780$); Amplitude of contractions (mmHg) <25: M10 ($P= 0.490$)
 8 M50 ($P= 0.857$), 25-50: M10 ($P= 0.431$) M50 ($P= 0.024$)*, 50-75: M10 ($P= 0.001$) * M50 ($P= >0.999$), >75: M10 ($P=$
 9 0.032)* M50 ($P= >0.999$); Duration of contractions (s): <10: M10 ($P= 0.986$) M50 ($P= 0.922$), 10-20: M10 ($P= 0.177$)
 10 M50 ($P= 0.092$), >20: M10 ($P= 0.532$) M50 ($P= 0.548$). (F) Medial PC: Peaks: M10 ($P= 0.691$) M50 ($P= 0.535$);
 11 Amplitude of contractions (mmHg): <25: M10 ($P= 0.433$) M50 ($P= 0.451$), 25-50: M10 ($P= 0.139$) M50 ($P= 0.486$),
 12 50-75: M10 ($P= 0.045$) * M50 ($P= 0.376$), >75: M10 ($P= 0.006$)* M50 ($P= 0.028$)*. Duration of contractions (s): <10:
 13 M10 ($P= 0.876$) M50 ($P= 0.926$), 10-20: M10 ($P= 0.100$) M50 ($P= 0.156$), >20: M10 ($P= 0.449$) M50 ($P= 0.420$). (G)
 14 Medial DC: Peaks: M10 ($P= 0.769$) M50 ($P= 0.617$); Amplitude of contractions (mmHg): <25: M10 ($P= 0.473$) M50
 15 ($P= 0.864$), 25-50: M10 ($P= 0.029$)* M50 ($P= 0.001$)*, 50-75: M10 ($P= 0.058$) M50 ($P= 0.581$), >75: M10 ($P= 0.102$)
 16 M50 ($P= 0.245$); Duration of contractions (s): <10: M10 ($P= 0.075$) M50 ($P= 0.643$), 10-20: M10 ($P= 0.498$) M50
 17 ($P= 0.866$), >20: M10 ($P= 0.040$)* M50 ($P= 0.099$). (H) DC: Peaks: M10 ($P= 0.544$) M50 ($P= 0.249$); Amplitude of
 18 contractions (mmHg): <25: M10 ($P= 0.157$) M50 ($P= 0.561$), 25-50: M10 ($P= 0.719$) M50 ($P= 0.752$), 50-75: M10
 19 ($P= 0.582$) M50 ($P= 0.052$), >75: M10 ($P= 0.092$) M50 ($P= >0.999$); Duration of contractions (s): <10: M10 ($P=$
 20 0.210) M50 ($P= 0.403$), 10-20: M10 ($P= 0.821$) M50 ($P= 0.082$), >20: M10 ($P= 0.237$) M50 ($P= 0.697$) (n=10-11
 21 rats/group). *Mann-Whitney test*, data shown as the median with interquartile range. Proximal (CP), Medial Proximal
 22 (MPC), Medial Distal (MDC) and Distal (DC) colon. Control: blue - M10: red - M50: green.



1 Figure 5: Analysis of frequency (nb/min), area (mmHg.s), amplitude (mmHg) and duration (s) of colonic contractions
 2 according to the classification of types of contraction (aboral propulsive, oral propulsive, simultaneous non-
 3 non-propulsive and not propulsive alone). (A) Aboral propulsive peaks: PC: M10 ($P=0.228$) M50 ($P=0.001$)*, MPC:
 4 M10 ($P=0.567$) M50 ($P=0.0007$)*, MDC: M10 ($P=0.163$) M50 ($P=0.0007$)*, DC: M10 ($P=0.957$) M50 ($P=0.025$)*.
 5 (B) Area (mmHg.s) aboral propulsive contraction: PC: M10 ($P<0.0001$)* M50 ($P=0.547$), MPC: M10 ($P=0.160$)
 6 M50 ($P=0.118$), MDC: M10 ($P=0.023$)* M50 ($P=0.002$)*, DC: M10 ($P=0.023$)* M50 ($P=0.924$). (C) Amplitude
 7 (mmHg) aboral propulsive contraction: PC: M10 ($P<0.0001$)* M50 ($P=0.535$). MPC: M10 ($P=0.254$) M50 ($P=$
 8 0.907), MDC: M10 ($P=0.028$)* M50 ($P=0.034$)*, DC: M10 ($P=0.188$) M50 ($P=0.732$). (D) Duration(s) of the aboral
 9 propulsive contraction: PC: M10 ($P<0.0001$)* M50 ($P=0.182$), MPC: M10 ($P=0.657$) M50 ($P=0.019$)*, MDC: M10
 10 ($P=0.083$)* M50 ($P=0.011$), DC: M10 ($P=0.018$) M50 ($P=0.799$). (E) Oral Propulsive Peaks: PC: M10 ($P=0.457$)
 11 M50 ($P=0.151$), MPC: M10 ($P=0.795$) M50 ($P=0.030$)*, MDC: M10 ($P=0.223$) M50 ($P=0.036$)*, DC: M10 ($P=$
 12 0.324) M50 ($P=0.094$). (F) Area (mmHg.s) oral propulsive contraction: PC: M10 ($P=0.083$) M50 ($P=0.036$)*, MPC:
 13 M10 ($P=0.011$)* M50 ($P=0.015$)*, MDC: M10 ($P=0.034$)* M50 ($P=0.620$), DC: M10 ($P=0.161$) M50 ($P=0.239$).
 14 (G) Amplitude (mmHg) oral propulsive contraction: PC: M10 ($P=0.535$) M50 ($P=0.066$), MPC: M10 ($P=0.080$) M50
 15 ($P=0.004$)*, MDC: M10 ($P=0.005$)* M50 ($P=0.588$), DC: M10 ($P=0.481$) M50 ($P=0.253$). (H) Duration (s) oral
 16 Propulsive contraction: PC: M10 ($P=0.093$) M50 ($P=0.730$), MPC: M10 ($P=0.027$)* M50 ($P=0.643$), MDC: M10
 17 ($P=0.351$) M50 ($P=0.299$), DC: M10 ($P=0.035$)* M50 ($P=0.050$). (I) Simultaneous non-Propulsive peaks: PC: M10
 18 ($P=0.953$) M50 ($P=0.432$), MPC: M10 ($P=0.328$) M50 ($P=0.028$)*, MDC: M10 ($P=0.586$) M50 ($P=0.645$), DC
 19 M10 ($P=0.691$) M50 ($P=0.763$). (J) Area (mmHg.s) simultaneous non-Propulsive contraction: PC: M10 ($P=$
 20 0.0001)* M50 ($P=0.358$), MPC: M10 ($P=0.001$)* M50 ($P=0.029$)*, MDC: M10 ($P=0.002$)* M50 ($P=0.013$)*, DC:
 21 M10/M50 ($P<0.0001$)*. (K) Amplitude (mmHg) simultaneous non-propulsive contraction: PC: M10/M50 ($P=$
 22 <0.0001)*, MPC: M10/M50 ($P<0.0001$)*, MDC: M10/M50 ($P<0.0001$)*, DC: M10/M50 ($P<0.0001$)*. (L)
 23 Duration(s) simultaneous non-propulsive contraction: PC: M10 ($P=0.040$)* M50 ($P=0.208$), MPC: M10 ($P=0.0009$)*
 24 M50 ($P=0.215$), MDC: M10 ($P=0.001$)* M50 ($P=0.171$), DC: M10 ($P=0.137$) M50 ($P=0.004$)*. (M) Isolated non-
 25 propulsive peaks: PC: M10 ($P=0.499$) M50 ($P=0.030$)*, MPC: M10 ($P=0.831$) M50 ($P=0.531$), MDC: M10 ($P=$
 26 0.023)* M50 ($P=0.488$), DC: M10 ($P<0.0001$)* M50 ($P=0.003$)*; (N) Area (mmHg.s) Isolated non-propulsive
 27 contraction: PC: M10 ($P=0.283$) M50 ($P=0.208$), MPC: M10/M50 ($P<0.0001$)*, MDC: M10 ($P=0.302$) M50 ($P=$
 28 0.010)*, DC: M10 ($P=0.364$) M50 ($P=0.078$). (O) Amplitude (mmHg) isolated non-propulsive contraction: PC: M10
 29 ($P=0.626$) M50 ($P=0.111$), MPC: M10 ($P<0.0001$)* M50 ($P=0.0003$)*, MDC: M10 ($P=0.272$) M50 ($P=0.072$),
 30 DC: M10 ($P=0.263$) M50 ($P=0.581$). (P) Duration(s) isolated non-propulsive contraction: PC: M10 ($P=0.392$) M50
 31 ($P=0.0001$)*, MPC: M10 ($P=0.037$)* M50 ($P=0.744$), MDC: M10 ($P=0.052$) M50 ($P=0.071$), DC: M10 ($P=0.256$)

- 1 M50 ($P= 0.004$)*, (n=10-11 rats/group). Nb (number) *Mann-Whitney test*, data shown as the median with
- 2 interquartile range. Proximal (CP), Medial Proximal (MPC), Medial Distal (MDC) and Distal (DC) colon. Control:
- 3 blue, M10: red, M50: green.



1 Figure 6: Colonic migratory motor complexes (CMMCs). (A) Frequency CMMCs: General: M10 ($P=0.143$) M50 ($P=$
2 0.040)*; Oral-Aboral: M10 ($P=0.439$) M50 ($P=0.0003$)*; Aboral-Oral: M10 ($P=>0.999$) M50 ($P=0.028$)*. (B) Duration
3 of CMMCs: General: M10 ($P=0.124$) M50 ($P=0.238$); Oral-Aboral: M10 ($P=0.085$) M50 ($P=0.039$)*; Aboral-Oral:
4 M10 ($P=0.555$) M50 ($P=0.448$). (C) Interval between CMMCs: M10 ($P=0.001$)* M50 ($P=0.781$).)* (n=10-11
5 rats/group). Nb (number) *Mann-Whitney test*, data shown as the median with interquartile range. Control: blue, M10:
6 red, M50: green.

1 **5- CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 Considerando a hipótese de que a exposição contínua a baixas doses de MAL
4 poderia causar alterações sobre a estrutura da parede e parâmetros de motilidade do
5 cólon de ratos, conclui-se que essa exposição:

- 6 1. Causou modificações na morfofisiologia do cólon de ratos de maneira dose
7 dependente;
- 8 2. Reduziu a atividade da enzima BuChE na parede do cólon dos ratos expostos
9 de ambos os grupos;
- 10 3. Alterou o fenótipo de pellets fecais de ratos expostos de ambos os grupos;
- 11 4. Não alterou características macroscópicas, mas alterou as características da
12 estrutura microscópica do cólon dos ratos de ambos os grupos;
- 13 5. Reduziu o tempo de trânsito gastrointestinal em ratos expostos a 50 mg/Kg;
- 14 6. Causou redução de neurônios no plexo mioentérico e alterações morfológicas
15 dos neurônios totais e subpopulações;
- 16 7. Alterou o padrão de contrações colônicas;
- 17 8. Alterou a frequência, a duração e a direção dos Complexos Motores Migratórios
18 Colônicos.

19 Em M10 (10mg/Kg), que foi a menor dose avaliada, não observamos alteração
20 no tempo de trânsito gastrointestinal, mas ainda assim foi capaz de provocar
21 alterações com aumento no número e tamanho dos pellets fecais. Microscopicamente,
22 causou atrofia generalizada da parede colônica, e ainda promoveu redução da
23 população dos neurônios entéricos gerais e nitrérgicos no PM, e alterações
24 morfométricas no corpo celular. Em relação a motilidade colônica, ocorreram
25 alterações no padrão das contrações. Quando ocorriam simultaneamente, as
26 contrações exerciam maior pressão e duravam mais tempo, com aumento no intervalo
27 de tempo entre as contrações, porém sem alterar o perfil de CMMCs.

28 Na maior dose avaliada (50 mg/Kg), as alterações foram maiores, com redução
29 do tempo de trânsito gastrointestinal, que conseqüentemente levou ao aumento no
30 número, da massa, tamanho e quantidade de água nos pellets fecais.
31 Microscopicamente, houve aumento da profundidade de criptas intestinais e atrofia
32 das demais camadas do cólon. Esta dose ainda causou perda de neurônios entéricos,

1 e o excesso de ACh pode ter sinalizado para um *feedback* negativo levando a atrofia
2 do pericário dos neurônios do plexo submucoso, e menor relação da população
3 colinérgica. Houve a redução na frequência de CMMCs anterógrados com aumento
4 na frequência de CMMCs retrógrados, indicando retardo no trânsito colônico. Este fato
5 pode estar relacionado com um possível comprometimento do fluxo de fluidos entre o
6 lúmen e a mucosa e pelas alterações observadas da mucosa e na produção de
7 mucinas que favoreceram para estas alterações de motilidade e alterações na
8 composição e liberação dos pellets fecais.

9 Diante das conclusões obtidas, recomenda-se futuros estudos que avaliem a
10 relação ATP/AD em cada camada, avaliação de atividade de ATPases no epitélio
11 intestinal, fluxo de íons (Cl⁻) através do epitélio intestinal utilizando sistema de Ussing,
12 avaliação de moléculas que indiquem a presença de estresse oxidativo. Além disso,
13 a investigação de possíveis alterações nos receptores de ACh na parede colônica
14 talvez possa contribuir para compreender os mecanismos envolvidos na intoxicação
15 oral com baixas doses de MAL sobretudo em exposições recorrentes, o que pode
16 oferecer riscos para a saúde de humanos e animais. Lembrando que ainda se faz
17 necessária a utilização de tais compostos para a erradicação de pragas agrícolas e
18 em casos de saúde pública, este pode ter seu benefício coletivo, mas devem ser
19 tomadas medidas que possam diminuir as contaminações acidentais, ocupacionais e
20 do meio ambiente.

1 REFERÊNCIAS REFERENTES À INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

- 2 ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical science**
3 **monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v.
4 10, n. 6, p. RA141-7, jun. 2004.
- 5 AHMED, D. et al. Malathion Neurotoxic Effects on Dopaminergic System in Mice:
6 Role of Inflammation. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 06, n. 04, 2017.
- 7 AKBEL, E. et al. The subchronic exposure to malathion, an organophosphate
8 pesticide, causes lipid peroxidation, oxidative stress, and tissue damage in rats: the
9 protective role of resveratrol. **Toxicology Research**, v. 7, n. 3, p. 503–512, 2018.
- 10 AKIHO, H. Cytokine-induced alterations of gastrointestinal motility in gastrointestinal
11 disorders. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 2, n. 5, p. 72,
12 2011.
- 13 AKTAR, M. W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Impact of pesticides use in
14 agriculture: their benefits and hazards. **Interdisciplinary toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1–
15 12, mar. 2009.
- 16 ALP, H. et al. Effects of sulforophane and curcumin on oxidative stress created by
17 acute malathion toxicity in rats. **European review for medical and**
18 **pharmacological sciences**, v. 16 Suppl 3, n. SUPPL. 3, p. 144–8, jul. 2012.
- 19 ANTON, P. M. et al. Chronic ingestion of a potential food contaminant induces
20 gastrointestinal inflammation in rats: role of nitric oxide and mast cells. **Digestive**
21 **diseases and sciences**, v. 45, n. 9, p. 1842–9, set. 2000.
- 22 AOKI, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K. Role of the mucous/glycocalyx layers in
23 insulin permeation across the rat ileal membrane. **International journal of**
24 **pharmaceutics**, v. 297, n. 1–2, p. 98–109, 13 jun. 2005.
- 25 ARRIETA, M. C. et al. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the
26 IL10 gene-deficient mouse. **Gut**, v. 58, n. 1, p. 41–8, jan. 2009.
- 27 ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alterations in intestinal
28 permeability. **Gut**, v. 55, n. 10, p. 1512–20, out. 2006.
- 29 ATSDR. **ATSDR - Substâncias Tóxicas - Malathion**. Disponível em:
30 <<https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=92>>. Acesso em: 3
31 fev. 2021.
- 32 BADR, A. M. Organophosphate toxicity: updates of malathion potential toxic effects
33 in mammals and potential treatments. **Environmental Science and Pollution**
34 **Research**, v. 27, n. 21, p. 26036–26057, 13 jul. 2020.
- 35 BAIOMY, A. A. et al. Protective effect of ginger and zinc chloride mixture on the liver
36 and kidney alterations induced by malathion toxicity. **International Journal of**
37 **Immunopathology and Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 122–128, 1 mar. 2015.
- 38 BARKER, N. **Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial**
39 **homeostasis and regeneration** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, jan.
40 2014.
- 41 BAYLISS, W. M.; STARLING, E. H. The movements and innervation of the small

- 1 intestine. **The Journal of physiology**, v. 24, n. 2, p. 99–143, 11 maio 1899.
- 2 BELIN, A. C. et al. Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism
3 in Parkinson's disease. **Neuroscience letters**, v. 522, n. 1, p. 30–5, 26 jul. 2012.
- 4 BEN-HORIN, S.; CHOWERS, Y. Neuroimmunology of the gut: physiology, pathology,
5 and pharmacology. **Current opinion in pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 490–5, 1 ago.
6 2008.
- 7 BEUSCHER, N. et al. What neurons hide behind calretinin immunoreactivity in the
8 human gut? **Histochemistry and cell biology**, v. 141, n. 4, p. 393–405, abr. 2014.
- 9 BHARDWAJ, J. K. et al. N-Acetyl-cysteine mediated inhibition of spermatogonial cells
10 apoptosis against malathion exposure in testicular tissue. **Journal of Biochemical
11 and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 4, p. e22046, 1 abr. 2018.
- 12 BHARDWAJ, J. K.; SARAF, P. Malathion-induced granulosa cell apoptosis in caprine
13 antral follicles: an ultrastructural and flow cytometric analysis. **Microscopy and
14 microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America,
15 Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, v. 20, n. 6, p.
16 1861–8, 30 dez. 2014.
- 17 BŁASIAK, J. et al. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus
18 insecticide malathion and its two analogues. **Mutation research**, v. 445, n. 2, p.
19 275–83, 30 set. 1999.
- 20 BŁASIAK, J.; STAŃKOWSKA, D. Genotoxicity of Malaoxon: Induction of Oxidized
21 and Methylated Bases and Protective Effect of α -Tocopherol. **Pesticide
22 Biochemistry and Physiology**, v. 71, n. 2, p. 88–96, out. 2001.
- 23 BÓDI, N.; SZALAI, Z.; BAGYÁNSZKI, M. Nitroergic Enteric Neurons in Health and
24 Disease—Focus on Animal Models. **International Journal of Molecular Sciences**,
25 v. 20, n. 8, 2 abr. 2019.
- 26 BOESMANS, W. et al. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the
27 mammalian enteric nervous system. **Glia**, v. 63, n. 2, p. 229–41, fev. 2015.
- 28 BOLOGNESI, C. **Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring
29 studies** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* Elsevier, , 1 jun. 2003.
- 30 BONAZ, B. L.; BERNSTEIN, C. N. Brain-gut interactions in inflammatory bowel
31 disease. **Gastroenterology**, v. 144, n. 1, p. 36–49, jan. 2013.
- 32 BONILLA, E. et al. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early
33 oogenesis in mice in vitro. **Environmental toxicology**, v. 23, n. 2, p. 240–5, abr.
34 2008.
- 35 BORNSTEIN, J. C.; COSTA, M.; GRIDER, J. R. **Enteric motor and interneuronal
36 circuits controlling motility**. *Neurogastroenterology and Motility*. **Anais...**abr. 2004
- 37 BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e
38 resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 4, p. 279–293, dez.
39 2007.
- 40 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.
41 **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue
42 (Série A. Normas e Manuais Técnicos.)**. BRASÍLIA - DF: MINISTÉRIO DA SAÚDE,

- 1 2009.
- 2 BREHMER, A.; SCHRÖDL, F.; NEUHUBER, W. **Morphological classifications of**
3 **enteric neurons - 100 years after Dogiel***Anatomy and Embryology*, 1999.
- 4 BRODEUR, J.; DUBOIS, K. P. Studies on factors influencing the acute toxicity of
5 malathion and malaoxon in rats. **Canadian journal of physiology and**
6 **pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 621–31, jul. 1967.
- 7 BURATTI, F. M. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of
8 different cytochrome p450 isoforms. **Drug metabolism and disposition: the**
9 **biological fate of chemicals**, v. 33, n. 3, p. 295–302, mar. 2005.
- 10 BURATTI, F. M.; TESTAI, E. Malathion detoxification by human hepatic
11 carboxylesterases and its inhibition by isomalathion and other pesticides. **Journal of**
12 **biochemical and molecular toxicology**, v. 19, n. 6, p. 406–14, 1 jan. 2005.
- 13 CALCAGNI, E.; ELENKOV, I. Stress system activity, innate and T helper cytokines,
14 and susceptibility to immune-related diseases. **Annals of the New York Academy**
15 **of Sciences**, v. 1069, p. 62–76, jun. 2006.
- 16 CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease.
17 **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European**
18 **Gastrointestinal Motility Society**, v. 24, n. 6, p. 503–12, jun. 2012.
- 19 CDC. **RTECS: WM8400000 - Ácido succínico, mercapto-, éster dietílico, S-éster**
20 **com O, O-dimetilfosforoditioato - O Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias**
21 **Químicas | CDC / NIOSH**. Disponível em: <[https://www.cdc.gov/niosh-](https://www.cdc.gov/niosh-rtecs/WM802C80.html)
22 [rtecs/WM802C80.html](https://www.cdc.gov/niosh-rtecs/WM802C80.html)>. Acesso em: 3 fev. 2021.
- 23 CHAMBERS, J. E.; MEEK, E. C.; CHAMBERS, H. W. The Metabolism of
24 Organophosphorus Insecticides. In: **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**.
25 [s.l.] Elsevier, 2010. p. 1399–1407.
- 26 CHEN, L. et al. Absorption and excretion of organophosphorous insecticide
27 biomarkers of malathion in the rat: implications for overestimation bias and exposure
28 misclassification from environmental biomonitoring. **Regulatory toxicology and**
29 **pharmacology : RTP**, v. 65, n. 3, p. 287–93, abr. 2013.
- 30 CHOI, P. T. et al. The use of glycopyrrolate in a case of intermediate syndrome
31 following acute organophosphate poisoning. **Canadian journal of anaesthesia =**
32 **Journal canadien d'anesthésie**, v. 45, n. 4, p. 337–40, abr. 1998.
- 33 CHOWDHURY, J. S. et al. Effect of a single oral dose of malathion on D-glucose and
34 glycine uptake and on brush border enzymes in rat intestine. **Toxicology letters**, v.
35 6, n. 6, p. 411–5, out. 1980.
- 36 COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; MARONI, M. Neurobehavioral effects of pesticides:
37 state of the art. **Neurotoxicology**, v. 24, n. 4–5, p. 577–91, ago. 2003.
- 38 CONHECIMENTO, R. D. O.; AMBIENTE, E. M. Agência Embrapa de Informação
39 Tecnológica - Uso de lodo de esgoto. p. 1–2, 2014.
- 40 COSTANTINI, T. W. et al. Targeting α -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric
41 nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn
42 injury. **The American journal of pathology**, v. 181, n. 2, p. 478–86, 1 ago. 2012.

- 1 DE JONGE, W. J. The Gut's Little Brain in Control of Intestinal Immunity. **ISRN**
2 **Gastroenterology**, v. 2013, p. 1–17, 4 abr. 2013.
- 3 DELGADO, E. H. B. et al. Mitochondrial respiratory dysfunction and oxidative stress
4 after chronic malathion exposure. **Neurochemical research**, v. 31, n. 8, p. 1021–5,
5 ago. 2006.
- 6 DIVE, A. et al. Unusual manifestations after malathion poisoning. **Human &**
7 **experimental toxicology**, v. 13, n. 4, p. 271–4, abr. 1994.
- 8 EL-BINI DHOUB, I. et al. A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and
9 malathion in Wistar rat liver and spleen. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.
10 124, p. 21–28, 2015.
- 11 EPA. **Reregistration Eligibility Decision (RED) for Malathion**. Disponível em:
12 <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/malathion-red-revised.pdf>>.
13 Acesso em: 15 out. 2016.
- 14 EPA, U. S. E. P. A. PROPOSED PLAN. NORTHWEST PIPE AND CASING/HALL
15 PROCESS COMPANY SITE. 2000.
- 16 EPA, U. S. E. P. A. Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market
17 Estimates. **U.S. Environmental Protection Agency**, p. 1–41, 2011.
- 18 ESEN, M.; UYSAL, M. Protective effects of intravenous lipid emulsion on malathion-
19 induced hepatotoxicity. **Bratislavske lekarske listy**, v. 119, n. 6, p. 373–378, 2018.
- 20 F SÁNCHEZ-SANTED, M. C. E. H. H. Organophosphate pesticide exposure and
21 neurodegeneration. **Cortex**, v. 74, p. 417–426, 2016.
- 22 FAO. **Food Insecurity in the World**. Rome - Italy: [s.n.]. Disponível em:
23 <<http://www.fao.org/3/j0083e/j0083e00.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2021.
- 24 FLIPO, D. et al. Combined effects of selected insecticides on humoral immune
25 response in mice. **International journal of immunopharmacology**, v. 14, n. 5, p.
26 747–52, jul. 1992.
- 27 FONTOURA, N. G. **Efeito do Novaluron -um inibidor da síntese de quitina –**
28 **sobre Aedes aegypti em laboratório e simulado de campo**. [s.l.] INSTITUTO
29 OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ, 2008.
- 30 FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function.
31 **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, abr. 2012.
- 32 FORTUNATO, J. J. et al. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions.
33 **Neurochemical research**, v. 31, n. 5, p. 671–8, maio 2006.
- 34 FUKUTO, T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate
35 insecticides. **Environmental health perspectives**, v. 87, p. 245–54, jul. 1990.
- 36 FUNG, C.; VANDEN BERGHE, P. Functional circuits and signal processing in the
37 enteric nervous system. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 77, n. 22,
38 p. 4505–4522, nov. 2020.
- 39 FURNESS, J. B. **The Enteric Nervous System**. 1. ed. Nova York: Wiley-Blackwell,
40 2006.

- 1 FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature**
2 **reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 6 mar. 2012.
- 3 FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation:
4 Integrated local and central control. **Advances in Experimental Medicine and**
5 **Biology**, v. 817, p. 39–71, 2014.
- 6 GAO, B. et al. The organophosphate malathion disturbs gut microbiome development
7 and the quorum-Sensing system. **Toxicology Letters**, v. 283, p. 52–57, 1 fev. 2018.
- 8 GENG, X. et al. Malathion-induced testicular toxicity is associated with
9 spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in
10 male Wistar rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p.
11 659–67, 1 mar. 2015.
- 12 GLASS, T. et al. DNA variants and organophosphate neurotoxicity among emerging
13 farmers in the Western Cape of South Africa. **American Journal of Industrial**
14 **Medicine**, v. 61, n. 1, p. 11–20, 1 jan. 2018.
- 15 GRANDO, S. A.; KAWASHIMA, K.; WESSLER, I. Introduction: the non-neuronal
16 cholinergic system in humans. **Life sciences**, v. 72, n. 18–19, p. 2009–12, 28 mar.
17 2003.
- 18 GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **The**
19 **Journal of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 557–570, 15 jan. 2017.
- 20 GUBLER, D. J. The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current
21 status and prospects for the future. **Annals of the Academy of Medicine,**
22 **Singapore**, v. 27, n. 2, p. 227–34, mar. 1998.
- 23 GUPTA, P. K.; PAUL, B. S. Effect of malathion on oxygen consumption and blood
24 cholinesterase of the hen. **Archives of environmental health**, v. 29, n. 3, p. 167–9,
25 set. 1974.
- 26 GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. ed. [s.l.] Guanabara
27 Koogan, 1997.
- 28 HAZARIKA, A. et al. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in
29 male rats: a biochemical interaction study. **Toxicology**, v. 185, n. 1–2, p. 1–8, 14
30 mar. 2003.
- 31 HSIAO, C. T. et al. Acute pancreatitis following organophosphate intoxication.
32 **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 34, n. 3, p. 343–7, 1996.
- 33 ISTÚRIZ, R. E.; GUBLER, D. J.; BREA DEL CASTILLO, J. Dengue and dengue
34 hemorrhagic fever in Latin America and the Caribbean. **Infectious disease clinics**
35 **of North America**, v. 14, n. 1, p. 121–40, ix, mar. 2000.
- 36 IUPAC. “[Malathion]”. **IUPAC Standards Online. De Gruyter, 2016**. Disponível
37 em:
38 <[https://www.degruyter.com/document/database/IUPAC/entry/iupac.compound.4004/](https://www.degruyter.com/document/database/IUPAC/entry/iupac.compound.4004/html)
39 [html](https://www.degruyter.com/document/database/IUPAC/entry/iupac.compound.4004/html)>. Acesso em: 3 fev. 2021.
- 40 JEYARATNAM, J.; MARONI, M. Chapter 3 Organophosphorous compounds.
41 **Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 15–27, 17 jun. 1994.
- 42 JOKANOVIĆ, M. Biotransformation of organophosphorus compounds. **Toxicology**,

- 1 v. 166, n. 3, p. 139–60, 25 set. 2001.
- 2 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 12. ed. Rio
3 de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2013.
- 4 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto & Atlas**. 13^a ed. Rio de
5 Janeiro - RJ: Editora Guanabara Koogan Ltda, 2017.
- 6 KALENDER, S. et al. Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins
7 C and E. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 633–638, fev. 2010.
- 8 KAMANYIRE, R. Organophosphate toxicity and occupational exposure.
9 **Occupational Medicine**, v. 54, n. 2, p. 69–75, 1 mar. 2004.
- 10 KARALLIEDDE, L. D.; EDWARDS, P.; MARRS, T. C. Variables influencing the toxic
11 response to organophosphates in humans. **Food and chemical toxicology : an
12 international journal published for the British Industrial Biological Research
13 Association**, v. 41, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2003.
- 14 KARAMI-MOHAJERI, S. et al. Mechanisms of muscular electrophysiological and
15 mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus
16 pesticide. **Human & Experimental Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 251–263, 17 mar.
17 2014.
- 18 KAUR, K.; KAUR, R. Occupational pesticide exposure, impaired DNA repair, and
19 diseases. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 22, n.
20 2, p. 74, 1 maio 2018.
- 21 KAWASHIMA, K. et al. Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype
22 mRNA expression in T-lymphocytes. **Life Sciences**, v. 62, n. 17–18, p. 1701–1705,
23 27 mar. 1998.
- 24 KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current
25 Opinion in Gastroenterology**, v. 30, n. 6, p. 583–588, nov. 2014.
- 26 KOCH, T. R. **Colonic Diseases**. Totowa, New Jersey: © Springer Science+Business
27 Media New York 2003, 2003.
- 28 LASRAM, M. M. et al. Metabolic disorders of acute exposure to malathion in adult
29 Wistar rats. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 2–3, p. 1052–1055, abr.
30 2009.
- 31 LECCI, A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Current
32 Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 630–641, 1 dez. 2002.
- 33 LI, Z. et al. Regional complexity in enteric neuron wiring reflects diversity of motility
34 patterns in the mouse large intestine. **eLife**, v. 8, p. 1–27, 12 fev. 2019.
- 35 LOTT, E. L.; JONES, E. B. **Cholinergic Toxicity**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2020.
- 36 LU, X. et al. Reactive oxygen species cause endothelial dysfunction in chronic flow
37 overload. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 110, n. 2, p.
38 520–7, 1 fev. 2011.
- 39 MACHERA, K. et al. Determination of Potential Dermal and Inhalation Operator
40 Exposure to Malathion in Greenhouses with the Whole Body Dosimetry Method. **The
41 Annals of Occupational Hygiene**, v. 47, n. 1, p. 61–70, 1 jan. 2003.

- 1 MARONI, M. et al. Introduction. **Toxicology**, v. 143, n. 1, p. 5–118, 7 fev. 2000.
- 2 MAWE, G. M. Colitis-induced neuroplasticity disrupts motility in the inflamed and
3 post-inflamed colon. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 3, p. 949–55,
4 2 mar. 2015.
- 5 MICHAEL H. ROSS, W. P. **Histology: a text and atlas: with correlated cell and**
6 **molecular biology**. 6th ed ed. Philadelphpa, PA: Lippincott Williams & Wilkins, a
7 Wolters Kluwer business, 2011.
- 8 MILESON, B. Common Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus
9 Pesticides,. **Toxicological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 8–20, 1 jan. 1998.
- 10 MONGARDI FANTAGUZZI, C. et al. Identification of neuron types in the submucosal
11 ganglia of the mouse ileum. **Cell and Tissue Research**, v. 336, n. 2, p. 179–189, 27
12 maio 2009.
- 13 MUSSINA, K.; TOKTARKHANOVA, D.; FILCHAKOVA, O. Nicotinic Acetylcholine
14 Receptors of PC12 Cells. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 17–
15 29, 1 jan. 2021.
- 16 NAIN, S. et al. Immunotoxicity and disease resistance in Japanese quail (*Coturnix*
17 *coturnix japonica*) exposed to malathion. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 892–900, 30
18 jun. 2011.
- 19 NAUGHTON, S. X.; TERRY, A. V. Neurotoxicity in acute and repeated
20 organophosphate exposure. **Toxicology**, v. 408, p. 101–112, 1 set. 2018.
- 21 NEUNLIST, M. et al. Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions.
22 **Gastroenterology**, v. 147, n. 6, p. 1230–1237, dez. 2014.
- 23 OPAS, O. P.-A. D. S.; OMS, O. M. D. S. **MANUAL DE VIGILÂNCIA DA SAÚDE DE**
24 **POPULAÇÕES EXPOSTAS A AGROTOXICOS Brasília, 1996 OPAS/OMS**
25 **Representação do Brasil.** [s.l: s.n.].
- 26 OZSOY, A. Z. et al. Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on
27 malathion-induced ovarian toxicity in female rats. **European review for medical and**
28 **pharmacological sciences**, v. 20, n. 11, p. 2425–34, 2016.
- 29 PORTER, A. J. et al. The neurochemical coding and projections of circular muscle
30 motor neurons in the human colon. **Gastroenterology**, v. 113, n. 6, p. 1916–1923,
31 1997.
- 32 QIN, X. et al. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier
33 function. **Shock**, v. 29, n. 3, p. 372–376, mar. 2008.
- 34 REID, G. A.; CHILUKURI, N.; DARVESH, S. Butyrylcholinesterase and the
35 cholinergic system. **Neuroscience**, v. 234, p. 53–68, 27 mar. 2013.
- 36 REZG, R. et al. Protective effects of caffeic acid against hypothalamic neuropeptides
37 alterations induced by malathion in rat. **Environmental science and pollution**
38 **research international**, v. 22, n. 8, p. 6198–207, 1 abr. 2015.
- 39 RIVETT, K.; POTGIETER, P. D. Diaphragmatic paralysis after organophosphate
40 poisoning. A case report. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse**
41 **tydskrif vir geneeskunde**, v. 72, n. 12, p. 881–2, 19 dez. 1987.

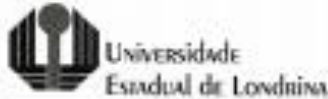
- 1 RODGERS, K. Effect of Administration of Malathion for 14 Days on Macrophage
2 Function and Mast Cell Degranulation,. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.
3 37, n. 1, p. 95–99, maio 1997.
- 4 SAADEH, A. M.; FARSAKH, N. A.; AL-ALI, M. K. Cardiac manifestations of acute
5 carbamate and organophosphate poisoning. **Heart**, v. 77, n. 5, p. 461–464, 1 maio
6 1997.
- 7 SALVO-ROMERO, E. et al. **The intestinal barrier function and its involvement in**
8 **digestive disease****Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**ARAN
9 Ediciones S.A., , 1 nov. 2015. Disponível em:
10 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26541659/>>. Acesso em: 4 fev. 2021
- 11 SANDERS, K. M. et al. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth
12 muscle biology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 11, p.
13 633–645, 11 nov. 2012.
- 14 SAPBAMRER, R.; HONGSIBSONG, S. Organophosphorus pesticide residues in
15 vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao Lake of
16 Northern Thailand. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v.
17 67, n. 1, p. 60–7, 8 jul. 2014.
- 18 SAPBAMRER, R.; HONGSIBSONG, S. Effects of prenatal and postnatal exposure to
19 organophosphate pesticides on child neurodevelopment in different age groups: a
20 systematic review. **Environmental science and pollution research international**,
21 v. 26, n. 18, p. 18267–18290, 1 jun. 2019.
- 22 SARABIA, L.; MAURER, I.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Melatonin prevents damage
23 elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA.
24 **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 2, p. 663–8, fev. 2009.
- 25 SARNA, S. K. **Colonic Motility - From Bench Side to Bedside**. [s.l.] Morgan &
26 Claypool Life Sciences, 2010.
- 27 SASSELLI, V.; PACHNIS, V.; BURNS, A. J. The enteric nervous system.
28 **Developmental Biology**, v. 366, n. 1, p. 64–73, 1 jun. 2012.
- 29 SELMI, S. et al. Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic,
30 histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice.
31 **Toxicology Reports**, v. 5, p. 189–195, 1 jan. 2018.
- 32 SELMI, S.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. Oxidative stress and cholinesterase inhibition
33 in plasma, erythrocyte and brain of rats' pups following lactational exposure to
34 malathion. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 34, n. 3, p. 753–760,
35 1 nov. 2012.
- 36 SENANAYAKE, N. Organophosphorus Insecticide Poisoning. **EJIFCC**, v. 11, n. 2, p.
37 30–35, jul. 1999.
- 38 SENANAYAKE, N.; KARALLIEDDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus
39 insecticides. An intermediate syndrome. **The New England journal of medicine**, v.
40 316, n. 13, p. 761–3, 26 mar. 1987.
- 41 SOENEN, S. et al. The ageing gastrointestinal tract. **Current Opinion in Clinical**
42 **Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 1, p. 12–18, 1 jan. 2016.

- 1 SPENCER, N. J.; HU, H. Enteric nervous system: sensory transduction, neural
2 circuits and gastrointestinal motility. **Nature Reviews Gastroenterology &**
3 **Hepatology**, v. 17, n. 6, p. 338–351, 9 jun. 2020.
- 4 STEVENS, J. T. The role of binding in inhibition of hepatic microsomal metabolism by
5 parathion and malathion. **Life sciences**, v. 14, n. 11, p. 2215–29, 1 jun. 1974.
- 6 SU, L. et al. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation
7 and contributes to development of experimental colitis. **Gastroenterology**, v. 136, n.
8 2, p. 551–63, fev. 2009.
- 9 SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE); MS (MINISTÉRIOS DA SAÚDE).
10 **Boletim Epidemiológico 51 - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas**
11 **transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika), semanas**
12 **epidemiológicas 1 a 50, 2020**. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf)
13 [br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/dezembro/28/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf)>. Acesso em:
14 12 mar. 2021.
- 15 SVS, S. D. V. E. S. **Surto de dengue eletrônico EPIDEMIOLÓGICO continua na**
16 **página 2 Secretaria de Vigilância em Saúde INVESTIGAÇÃO DE SURTO DE**
17 **DENGUE EM MUNICÍPIO DO ESTADO DO TOCANTINS E AVALIAÇÃO DE**
18 **CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS DA POPULAÇÃO EM RELAÇÃO À**
19 **DENGUE DURANTE**. [s.l: s.n.]. Disponível em:
20 <[http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/16/Ano07-n01-surto-](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/16/Ano07-n01-surto-dengue-conh-atit-prat-to-completo.pdf)
21 [dengue-conh-atit-prat-to-completo.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/16/Ano07-n01-surto-dengue-conh-atit-prat-to-completo.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2021.
- 22 TCHOUNWOU, P. B. et al. Environmental Exposure and Health Effects Associated
23 with Malathion Toxicity. In: **Toxicity and Hazard of Agrochemicals**. [s.l.] InTech,
24 2015.
- 25 THOMPSON, C. A.; DELAFOREST, A.; BATTLE, M. A. Patterning the
26 gastrointestinal epithelium to confer regional-specific functions. **Developmental**
27 **Biology**, v. 435, n. 2, p. 97–108, 15 mar. 2018.
- 28 TURNER, J. R. **Intestinal mucosal barrier function in health and disease** **Nature**
29 **Reviews Immunology**, nov. 2009.
- 30 VALÈS, S.; TOUVRON, M.; VAN LANDEGHEM, L. Enteric glia: Diversity or
31 plasticity? **Brain research**, v. 1693, n. Pt B, p. 140–145, 2018.
- 32 VANNER, S.; MACNAUGHTON, W. K. Submucosal secretomotor and vasodilator
33 reflexes. **Neurogastroenterology and motility : the official journal of the**
34 **European Gastrointestinal Motility Society**, v. 16 Suppl 1, n. SUPPL. 1, p. 39–43,
35 abr. 2004.
- 36 VIDEIRA, R. A. et al. Changes induced by malathion, methylparathion and parathion
37 on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity.
38 **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1511, n. 2, p. 360–368,
39 2 abr. 2001.
- 40 WALLACE, J. L. Nitric oxide in the gastrointestinal tract: opportunities for drug
41 development. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 147–154, 1 jan.
42 2019.
- 43 WESSLER, I. et al. The non-neuronal cholinergic system in humans: expression,

- 1 function and pathophysiology. **Life sciences**, v. 72, n. 18–19, p. 2055–61, 28 mar.
2 2003.
- 3 WHO, W. H. O.; FOR, S. P.; TDR, T. I. T. D. **Dengue Guidelines for Diagnosis,**
4 **Treatment, Prevention and Control.** [s.l.] World Health Organization, 2009.
- 5 WOOD, J. D. Application of classification schemes to the enteric nervous system.
6 **Journal of the autonomic nervous system**, v. 48, n. 1, p. 17–29, jun. 1994.
- 7 XUE, J. et al. Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal
8 surface. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 133, n. 1, p. 55–63, 30 abr.
9 2007.
- 10 YUAN, S. Y.; BORNSTEIN, J. C.; FURNESS, J. B. Investigation of the role of 5-HT3
11 and 5-HT4 receptors in ascending and descending reflexes to the circular muscle of
12 guinea-pig small intestine. **British journal of pharmacology**, v. 112, n. 4, p. 1095–
13 100, ago. 1994.
- 14 ZAMY, C.; MAZELLIER, P.; LEGUBE, B. Phototransformation of selected
15 organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. **Water research**, v. 38, n.
16 9, p. 2304–13, 1 maio 2004.
- 17

ANEXOS

A) Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) protocolo 137/2016.



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 137/2016

Londrina, 13 de Julho de 2016.

Prezada Pesquisadora,

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação dos efeitos do inseticida Malation sobre o desenvolvimento do sistema genital masculino, gastrointestinal e renal de ratos desde o período juvenil até a puberdade", protocolo CEUA nº 12305.2016.65, sob a responsabilidade de **Glaura Scantamburlo Alves Fernandes**, 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL), em reunião realizada em **05/07/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar se a exposição ao Malation durante o período peripuberal poderá trazer prejuízos para o desenvolvimento dos sistemas genital masculino, gastrointestinal, renal e hepático de ratos. Os animais serão distribuídos casualmente em três grupos experimentais (n=25 animais/grupo). Dois grupos de animais serão tratados com Malation nas doses de 10 mg/Kg ou 50 mg/Kg de peso corpóreo via gavagem. Essas doses correspondem a 0,5% e 2,6%, respectivamente, da DL50 oral para ratos (DL50 oral =2000 mg/kg) (U S EPA, 2000). O outro grupo (grupo controle) receberá apenas o veículo (óleo de soja) em igual volume. No 90º dia experimental os ratos serão anestesiados com a associação de xilazina e ketamina e mortos por punção cardíaca para a coleta do sangue em tubo heparinizado (hepararina sódica) para dosagens hormonais. GI 1

Vigência do Projeto	30/08/2016 a 30/08/2019
Espécie/inhagem	Rato heterogêneo / Wistar
Nº de animais	75
Peso/idade	Indeterminado / 22 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Testículos, epidídimos, vesícula seminal, próstata, sangue, fígado, estômago, rim, intestino, fêmur

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

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

Prof. Dr. João Waine Pinheiro
Vice-Coordenador da CEUA/UUEL

Illa. Sra.

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes

Coordenadora do Projeto

Departamento de Biologia Geral / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia Waldiceu A. Verri Junior (Coord. do Biotério Central/UUEL); Chefe do Departamento de Biologia Geral e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

Campus: Foz de Iguaçu, Roberto Carlos/Guaçu, CxP DE FOS, km 260 - Fone (514) 321-0990 FAX: - Fax (514) 321-0990 - Caixa Postal 19061 - CEP 84072-970 - Internet: <http://www.uuel.br>

LONDRIINA - PARANÁ - BRASIL

B) Diretrizes Gerais para Preparação de Manuscritos para submissão de artigo na The Journal of Physiology:

https://jp.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?form_type=display_requirements