



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

CAMILA REGINA BASSO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM JEJUNO DE RATOS WISTAR
EXPOSTOS A BAIXAS DOSES DE MALATION**

Londrina
2021

CAMILA REGINA BASSO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM JEJUNO DE RATOS WISTAR
EXPOSTOS A BAIXAS DOSES DE MALATION**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para 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

B322a Basso, Camila Regina.
Alterações morfológicas em jejuno de ratos wistar expostos a baixas doses de malation / Camila Regina Basso. - Londrina, 2021.
88 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Organofosforado - Tese. 2. Intoxicação - Tese. 3. Intestino Delgado - Tese. 4. Sistema nervoso entérico - Tese. I. Araújo, Eduardo José de Almeida . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

CAMILA REGINA BASSO

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM JEJUNO DE RATOS WISTAR
EXPOSTOS A BAIXAS DOSES DE MALATION**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Gessilda de Alcantara Nogueira de
Melo Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Profa. Dra. Nilza Cristina Buttow Universidade
Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 17 de dezembro de 2021.

“Eu tentei noventa e nove vezes e falhei, mas na centéssima tentativa eu consegui, nunca desista dos seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo, por me dar forças nos momentos de dificuldade e me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Vera e Sebastião que estiveram presentes em cada etapa deste caminho. Aos meus irmãos, Karina, Fernando e Luciano, meu cunhado José, minhas cunhadas Juliana e Micaela, que me incentivaram, me apoiaram e sempre estiveram comigo e minha sobrinha, motivo de muita alegria em nossas vidas.

A amiga Greci que mesmo de longe foi fundamental nessa caminhada, que partilhou momentos de dificuldade e os de alegria, que me incentivou incansavelmente e me fez acreditar que seria possível.

Ao meu orientador, Professor Eduardo José de Almeida Araújo, que me recebeu como orientada. Por todos os ensinamentos, pelas revisões, sugestões, correções e pela paciência. Obrigada professor, por suas palavras de incentivo, seus conselhos e seu carinho.

Aos colegas do Laboratório de Neurociência Entérica, Andreia, Beatriz, Camila M., Vinicius, Paulo, Larissa, Joyce e Gionanni, que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar com muita atenção, me aconselharam e dividiram comigo o trabalho e as experiências, em especial ao Matheus, que partilhou momentos de dificuldades e se tornou um grande amigo.

A professora Glaura S. A. Fernandes, sempre tão atenciosa, obrigada pela elaboração do projeto e pelo auxílio na realização da parte experimental, a professora Flavia A. Guarnier pelo auxílio das análises, pelas discussões dos resultados e pelo carinho, e a professora Andrea Name, pelo auxílio na realização das análises e pela discussão dos resultados, sempre muita atenciosa e prestativa e a colega Rafaela Erthal que me auxiliou em várias etapas da parte experimental e dividiu seu conhecimento.

BASSO, Camila Regina. **Alterações morfológicas em jejuno de ratos Wistar expostos a baixas doses de Malation**. 2021. 89 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

Os organofosforados (OF) são mundialmente utilizados na agricultura e centros urbanos de países tropicais para o controle de pragas e vetores de doenças como Dengue e Chikungunya. São reconhecidos por causar a morte de insetos por atuar em alvos colinérgicos. Contudo, estudos demonstram que pode ocorrer ação em alvos não colinérgicos favorecendo problemas de saúde frente à exposição a baixas doses de forma prolongada. Neste trabalho, objetivou-se avaliar os efeitos decorrentes da exposição contínua a baixas doses do OF malation sobre o jejuno de ratos. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Ratos machos Wistar com 21 dias de idade distribuídos em três grupos, controle, o qual recebeu solução salina 0,9% e os grupos que receberam baixas doses de malation, 10mg/kg (M10) e 50 mg/kg (M50), via gavagem por 40 dias. No 41º dia experimental foi realizada a eutanásia e coleta do jejuno para avaliar a estrutura morfológica da parede do órgão, quantificar e mensurar as populações neuronais dos plexos nervosos, evidenciados por imunofluorescência. Também foi avaliado o consumo de ração, massa de pellets fecais e a atividade de butilcolinesterase no jejuno. Os dados foram avaliados quanto ao tipo de distribuição para definição de testes estatísticos de comparação entre grupos. O teste t de student foi utilizado para dados com distribuição normal e Mann Withney para os dados com distribuição livre, considerando $p < 0,05$ como nível de significância. Em ambos os tratamentos foi observado aumento significativo na massa corporal, na massa bruta e seca dos pellets fecais. No M10 ainda foi observado aumento na massa jejunal ($p < 0,05$) e no tratamento M50 aumento no consumo de ração e na área das placas de Peyer ($p < 0,05$). Quanto às características morfológicas da parede do jejuno, o M10 apresentou atrofia em todos os parâmetros da camada mucosa, da tela submucosa, e das musculares ($p < 0,05$). Já no grupo M50, observou-se atrofia da camada mucosa, da altura de enterócitos e núcleos, de vilos, da muscular da mucosa e tela submucosa ($p < 0,05$). No plexo submucoso, no grupo M10, os neurônios da população geral, subpopulação fracamente marcada para calretinina tiveram redução do número de neurônios, e junto à subpopulação fortemente marcada para calretinina, sofreram hipertrofia e os corpos celulares no grupo M50 da população geral e da subpopulação fracamente marcada sofreram atrofia ($p < 0,05$). No plexo mioentérico, M10 apresentou atrofia dos corpos celulares da subpopulação colinérgica e hipertrofia da subpopulação nitrérgica ($p < 0,05$), sendo que em M50 as duas subpopulações sofreram hipertrofia ($p < 0,05$). Conclui-se que as doses de malation avaliadas apresentam baixa toxicidade para o jejuno de ratos, pois provocam atrofia das estruturas microscópicas da parede jejunal e alteram o tamanho dos corpos celulares dos plexos nervosos.

Palavras-Chave: organofosforado; intoxicação; intestino delgado; sistema nervoso entérico.

BASSO, Camila Regina. **Morphological changes in the jejunum of Wistar rats exposed to low doses of Malation**. 2021. 89 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Organophosphates (OF) are used worldwide in agriculture and urban centers in subtropical countries to control pests and vectors of diseases such as Dengue and Chikungunya. They are known to cause insect death by acting on cholinergic targets. However, studies show that there may be action on non-cholinergic targets favoring health problems when exposed to low doses in a prolonged manner. In this study, we aimed to evaluate the effects of continuous exposure to low doses of malathion on the jejunum of rats. All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Londrina (UEL). Male Wistar rats 21 days old distributed in the control group received 0.9% saline solution or low doses of malathion, 10 mg/kg (M10) and 50 mg/kg (M50), by gavage for 40 days. On the 41st day, the animals were euthanized and the jejunum was collected to evaluate the morphological structure, quantify and measure the neuronal populations of the nerve plexuses, evidenced by immunofluorescence. Feed intake, fecal pellet mass, and butylcholinesterase activity in the jejunum were also evaluated. The data were evaluated for the type of distribution to define statistical tests for comparison between groups. Student's t-test was used for data with normal distribution and Mann Withney test for data with free distribution, considering $p < 0.05$ as the significance level. In both treatments, a significant increase in body mass, gross mass, and dry mass of fecal pellets were observed. In M10 an increase in jejunal mass was also observed ($p < 0.05$) and in M50 an increase in feed intake and Peyer plaques area ($p < 0.05$). Regarding morphological characteristics of the jejunal wall, the M10 group showed atrophy in all parameters of the mucosal layer, submucosal layer, and muscular layer ($p < 0.05$). In the M50 group, atrophy of the mucosal layer, height of enterocytes and nuclei, villi, mucosal muscle, and the submucosal mesh was observed ($p < 0.05$). In the submucosal plexus, in group M10, the neurons of the general population, subpopulation weakly labeled for calretinin had a reduction in the number of neurons, and together with the subpopulation strongly labeled for calretinin, suffered hypertrophy and the cell bodies in group M50 of the general population and the weakly labeled subpopulation suffered atrophy ($p < 0.05$). In the myenteric plexus, M10 showed atrophy of the cholinergic subpopulation cell bodies and hypertrophy of the nitrenergic subpopulation ($p < 0.05$), and in M50 both subpopulations suffered hypertrophy ($p < 0.05$). It is concluded that the evaluated malathion doses present low toxicity to the rat jejunum, as they cause atrophy of the microscopic structures of the jejunal wall and alter the size of the cell bodies of the nerve plexuses.

Key words: enteric nervous system; intoxication; organophosphate; small intestine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da interação entre dois neurônios por meio da sinapse química. **A.** Sinalização colinérgica – funcionamento inalterado. **B.** Efeito dos organofosforados sobre a acetilcolinesterase – funcionamento alterado por meio da atuação de OF atuando sobre a acetilcolinesterase, favorecendo a inibição desta enzima e conseqüentemente, a não degradação do neurotransmissor. ACh – acetilcolina; AChE – enzima acetilcolinesterase.....18

Figura 2. Representação dos órgãos do trato gastrointestinal e órgãos anexos.....24

Figura 3. Representação das camadas constituintes da parede do trato gastrointestinal.....24

Figura 4. Célula M - sem microvilos, presente na mucosa do intestino, entre os enterócitos, região basal da célula em contato com linfócitos e prolongamentos citoplasmáticos de macrófago.....26

Figura 5. Mucosa, vilos, criptas no intestino delgado e células componentes da mucosa do intestino delgado.....28

Figura 6. Distribuição do sistema nervoso entérico nos órgãos do trato digestório. **A.** Distribuição do plexo mioentérico do esôfago ao intestino grosso e plexo submucoso a partir do intestino delgado. **B.** Organização e distribuição do plexo submucoso e mioentérico na parede do intestino.....30

Figura 7. Representação de neurônios no intestino delgado de cobaias. Tipos de neurônios segundo as funções, morfologia do corpo celular, neurotransmissores e projeções. 1. Interneurônio ascendente; 2. Neurônio intestínofugal; 3. Motor inibitório do músculo circular; 4. Motor excitatório do músculo longitudinal; 5. Motor inibitório do músculo longitudinal; 6. Motor excitatório do músculo circular; 7. Aferente primário intrínseco mioentérico; 8 Interneurônio descendente (reflexos locais); 9. Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. Interneurônio descendente; 11. Vasodilatador/secretomotor colinérgico; 12. Vasodilatador/secretomotor não colinérgico; 13. Aferente primário intrínseco submucoso e 14. Secretomotor (não vasodilatador) colinérgico. Legenda: Muc. Mucosa, MM. Muscular da mucosa, PS. Plexo submucoso. MC. Músculo, PM. Plexo mioentérico, ML. Músculo longitudinal.34

Figure 1 (article). **(A)** Quantification of butylcholinesterase/total proteins (L) in the jejunum. **(B)** Jejunal length (cm). **(C)** Jejunal circumference (cm). **(D)** Jejunal area (cm²). **(E)** Jejunal weight (g - rated at 1cm²). **(F)** Peyer's patches (nb). **(G)** Peyer's patches area (mm²). Data **(B, C, D, F)** presented as mean ± S.E.M., t student test. Data **(A, E, G)** presented as median (percentiles 25 -75); Unpaired t test - Mann

Withney, n= 10 per group. *Significant difference, p <0.05 of treatments in relation to the control group.77

Figure 2 (article). Morphometric analysis. **(A)** Mucosa of the jejunum (μm). **(B)** Enterocytes height (μm). **(C)** Enterocyte height core (μm). **(D)** Villus height (μm). **(E)** Crypts depth (μm). **(F)** Mucosa muscle (μm). **(G)** Submucosa (μm). **(H)** Circular muscle (μm). **(I)** Longitudinal muscle (μm). **(J)** Muscle (μm). **(K)** Total wall (μm). Data presented as median (percentiles 25 -75); Unpaired t test – Mann Whitney test, n= 6 per group. *Significant difference, p <0.05, of treatments in relation to the control group.....79

Figure 3 (article). **A.** Total wall in control, **A'**. M10, and **A''**. M50. **B.** Enterocytes height in the control, **B'** M10, and **B''** M50. **C.** Villus height in the control, **C'**. M10, and **C''**. M50. **D.** Crypt delph in the control, **D'**. M10, and **D''**. M50. **E.** Submucosa and muscle in the control, **E'**. M10, and **E''**. M50. *represented submucosa and key represented the muscle81

Figure 4 (article). Submucous plexus. **(A)** Geral neurons (nb/cm^2). **(B)** Neurons strongly immunoreactive to calretinin (nb/cm^2). **(C)** Neurons weakly immunoreactive to calretinin (nb/cm^2). **(D)** General neuron population morphometry (μm). **(E)** Strongly immunoreactive cells to calretinin (μm). **(F)** Weakly immunoreactive cells to calretinin (μm). Data **(A, B, C)** presented as mean \pm S.E.M., t Student test. Data **(D,E,F)** presented as median (percentiles 25 -75), Unpaired t test - Mann Whitney test, n= 5 per group. *Significant difference, p <0.05 of treatments in relation to the control group.82

Figure 5 (article). Immunofluorescence photomicrographs of the submucosal plexus. General neurons – HuC/D. White arrow - Neurons strongly immunoreactive to calretinin and asterisk - Neurons weakly immunoreactive to calretinin. Increase of 200x.82

Figure 6 (article). Myenteric plexus. **(A)** General neuronal (nb/cm^2). **(B)** Cholinergic neuronal (nb/cm^2). **(C)** Nitrgic neuronal (nb/cm^2). **(D)** General neuron population morfometry (μm). **(E)** Cholinergic neuron measures (μm). **(F)** Nitrgic neuron measures (μm). Data **(A,B,C)** presented as mean \pm S.E.M., t Student test. Data **(D,E,F)** presented as median (percentiles 25 -75), Unpaired t test - Mann Whitney test, n= 5 per group. *Significant difference, p <0.05, of treatments in relation to the control group83

Figure 7 (article). Immunofluorescence photomicrographs of the myoenteric plexus. **A.** General neurons – HuC/D. Asterisk - Immunoreactive neurons for ChAT (Cholinergics). Increase of 200x. **B.** General neurons – HuC/D. White arrow - Immunoreactive neurons for nNOS (Nitrgics). Increase of 200x.....84

LISTA DE TABELAS

Table 1. Evaluation of food and related parameters. Feed consumption/day (g). Faecal weight / pellet number (g). Dried faecal weight / pellet number (g). Degree of digestibility (%). Delta weight (g). Retroperitoneal fat (g). Data with normal distribution were presented as mean \pm S.E.M. Data with non-normal distribution were presented as median (25-75% percentiles). *Significant difference, $p < 0.05$, of treatments in relation to the control group.....78

Table 2. Quantification of cells in the jejunum wall. Intraepithelial lymphocytes (nb) in the mucosa. PAS⁺ Globet cells (nb), AB 1.0⁺ Globet cells (nb), AB 2.5⁺ Globet cells (nb) and number of mitosis figures per crypt. Longitudinal muscle: core (nb/mm²) and Circular muscle: core (nb/mm²) in the muscle. Data with normal distribution were presented as mean \pm S.E.M. Data with non-normal distribution were presented as median (25-75% percentiles). *Significant difference, $p < 0.05$, of treatments in relation to the control group.....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Alcian Blue
ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ATM - Atmosfera
ATP - Trifosfato de Adenosina
 α - Alfa
 β - Beta
BChE - Butilcolinesterase
BSA – Albumina Bovina Sérica
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCK – Colecistoquinica
CEUA/UEL – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina
cm – Centímetro
 cm^2 – Centímetro quadrado
CMM – Complexo Migratório Mioelétrico
DL₅₀ – Dose letal mediana
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
EPAN – Neurônio Aferente Primário
EUA – Estados Unidos da América
g – Gramas
GFAP - Proteína Ácida Fibrilar
GIP – Peptídeo Inibidor Gástrico
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
HE – Hematoxilina e Eosina
IL-6 – Interleucina 6
IL-1 β – Interleucina 1 beta
iNOS – Oxido Nítrico Sintase Induzida
IPAN – Neurônio Aferente Primário Intrínseco
kg – quilograma
 μL - Microlitro

µm – Micrômetro
m- Metro
mm- Milimetro
mm² – Milimetro quadrado
Mo- Motilina
MS – Ministério da Saúde
mg – miligramas
nNOS – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO – Óxido Nítrico
NOS- Óxido Nítrico Sintase
NPY – Neuropeptídeo Y
OF – Organofosforados
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAS – Ácido Periódico de Schiff
PBS – Tampão Fosfato-salino
PCND – Plano Nacional de Controle de Dengue
PON 1 – Enzima Paraoxonase 1
pH – Potencial hidrogeniônico
% - Porcentagem
SNC – Sistema Nervoso Central
SNE – Sistema Nervoso Entérico
SOD – Superóxido desmutase
SOM – Somatostatina
TBARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TDAH – Transtorno e *Déficit* de Atenção e Hiperatividade
TGI – Trato Gastrointestinal
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa
UEL – Universidade Estadual de Londrina
VIP – Peptídeo Vasoativo Intestinal
vAChT – Transportador Vesicular de Acetilcolina
5-HT - Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ORGANOFOSFORADOS (OF)	15
2.1.1	Malation	19
2.1.2	Exposição e Possíveis Efeitos do OF – Malation	21
2.2	TRATO GASTROINTESTINAL - INTESTINO DELGADO	23
2.2.1	Túnica Mucosa e Tipos Celulares	25
2.2.2	Tela Submucosa	28
2.2.3	Túnica Muscular e Serosa	29
2.3	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)	29
2.3.1	Organização e Distribuição do Sistema Nervoso Entérico	30
2.3.1.2	Neurônios entéricos	33
2.4	EFEITOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO À ORGANOFOSFORADOS	37
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.1.1	Objetivos Específicos	43
	REFERÊNCIAS	44
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	53
	LONG-TERM AND LOW-DOSE MALATHION EXPOSURE CAUSES JEJUNAL MICROSCOPY CHANGES IN WISTAR RATS	55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	ANEXO	87
	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo nº137/2016 e processo 12305.2016.65	88

1 INTRODUÇÃO

Os organofosforados (OF) são produtos químicos amplamente utilizados em todo o mundo. Nesse grupo químico, o malation tem sido um dos mais utilizados no controle do *Aedes aegypti*, mosquito transmissor do vírus da zika, chikunguya e dengue, doenças de alta prevalência em países tropicais e que são um problema de saúde pública (EPA, 2017). Além de ser utilizado no controle de vetores de doenças, também é utilizado com regularidade diretamente na agricultura para o controle de insetos pragas em vários cultivares. Ainda, o uso excessivo nos campos agrícolas favorece amplamente a contaminação de recursos hídricos próximos, o que aumenta os riscos de ingestão e ou contato para seres humanos e animais (BALJINDER; JAGDEEP; KASHMIR, 2014).

Os OF são capazes de controlar a população de insetos adultos, transmissores de doenças ou pragas de plantações de forma eficaz, mas pode também exercer efeitos adversos significativos em espécies não alvos, incluindo o ser humano (BALJINDER; JAGDEEP; KASHMIR, 2014; COSTA, 2018). Por causa da fosforilação da acetilcolinesterase, o malation exerce uma toxicidade colinérgica, com possibilidade de desencadear polineuropatias tardias (COSTA, 2006), além de alterações estruturais e celulares decorrentes da atuação em alvos não colinérgicos (TERRY JR., 2012). Diante disso, tem se investigado os possíveis efeitos decorrentes da exposição prolongada a baixos níveis, susceptibilidade genética à toxicidade aos OF e toxicidade no desenvolvimento e neurotoxicidade (COSTA, 2006).

O malation vem sendo, utilizado amplamente no ambiente de forma contínua em baixas doses, mas o emprego indiscriminado na agricultura e no controle de vetores de doenças possibilita a contaminação não só do solo e de recursos hídricos, como de alimentos. Devido a essa constante exposição, se tornou um dos OF alvos desses estudos de atuação no organismo animal e/ou humano. Os resultados das pesquisas já mostraram alterações em trato reprodutor masculino com alteração de viabilidade e quantidade de espermatozoides (ERTHAL et al., 2020), alterações no fígado como espessamento do tecido conjuntivo do espaço porta e vasos congestos (INOUYE et al., 2014), infiltrados de células mononucleares, hemorragia, dilatação de capilares sinusóides, congestão vascular e necrose (KALENDER et al., 2010), além de espessamento do tecido conjuntivo

bronquiolar, descamação epitelial bronquiolar e hemácias na luz de brônquios e bronquíolos nos pulmões (INOUYE et al., 2014) de ratos, sendo descritas ainda, alterações em sistema nervoso (CASIDA, 2009), são descritos efeitos neuropáticos que parecem ocorrer devido à inibição na produção da enzima, mais do que por sua inibição, ou seja, podem interferir nos processos de transporte axoplasmático, na manutenção e no reparo da integridade das células nervosas (CALDAS, 2000). Mesmo com todos esses estudos, a literatura ainda não relata danos causados por essa substância diretamente nas estruturas da parede do intestino delgado e, no sistema nervoso entérico. A fim de avançar no estado da arte no que diz respeito às alterações morfológicas em órgãos de animais expostos de forma prolongada a baixas doses de malation, parece de extrema relevância que se avalie alterações estruturais na parede e no sistema nervoso entérico (SNE) que ocorrem no intestino delgado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Organofosforados (OF)

Os organofosforados são formados por elementos orgânicos degradáveis (SILVA; DE CARLI, 2021), que compõem um amplo grupo de pesticidas e que pode ser encontrado em centenas de produtos em todo o mundo. São basicamente ésteres do ácido fosfórico e sua nomenclatura se baseia nos átomos e radicais que se ligam ao átomo central de fósforo (NAUGHTON; TERRY JR., 2018).

Apresenta uma ampla diversidade estrutural em seus componentes, o que resulta em uma variabilidade nas propriedades físico-químicas como, a volatidade, por exemplo, o que permite sua aplicação diversificada (BARBOSA, 2004). São classificados em três subgrupos: os derivados de fenil (etil, metil paration, etc.), os heterocíclicos (clorpirifos, clorpirifos metil, etc.) – classe de agrotóxico com alto interesse comercial e toxicológico, e os alifáticos (malation, vapon, etc.) (COLEONE, 2014; CAN, 2014).

Os OF são amplamente usados como solventes industriais, lubrificantes, plastificantes, aditivo para combustíveis, medicamentos, desfolhantes e pesticidas (apresentam função anti-helmíntica), fungicida, inseticida e herbicida (COSTA, 2018). São na sua maioria, produtos descritos como fortemente tóxicos e

apresentam alta taxa de mortalidade química. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), já são mais de 3 milhões de casos registrados, acidentais ou intencionais, de envenenamento por OF. Em países agrícolas, são especialmente preferidos entre os pesticidas, devido ao baixo preço e alto rendimento (VANOVA et al., 2018).

O uso de OF como pesticida está relacionado ao sucesso apresentado no controle das pragas devido à característica de atividade biológica forte que apresentam e a relativa instabilidade na biosfera (BARBOSA, 2004). A escolha de uso por esse grupo de pesticida nas últimas décadas foi uma medida de substituição ao uso de compostos organoclorados, responsáveis por grandes prejuízos ambientais devido à alta taxa de toxicidade e degradação ambiental (COLEONE, 2014).

No entanto, a contaminação de recursos hídricos, vegetação agrícola, solo, além de vegetação não agrícola oferece riscos a saúde de inúmeras espécies animais, incluindo o ser humano, pois permanecem em constante exposição em doses baixas (VASSEGHIAN et al., 2021).

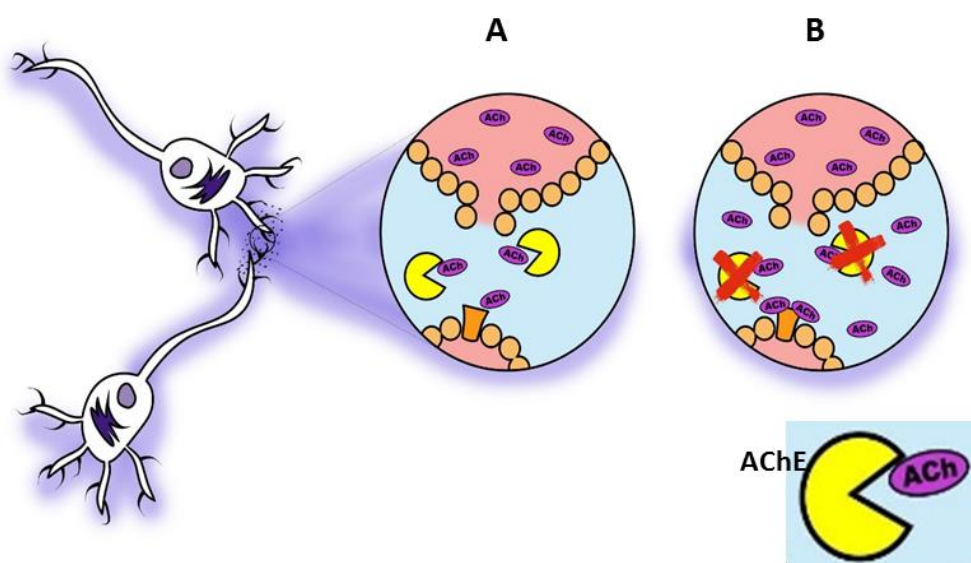
Os estudos mais recentes já mostram que OF vêm sendo detectados com frequência no ambiente e nos tecidos de animais e humanos (NAUGHTON; TERRY JR., 2018), pois devido ao carácter lipossolúvel podem ser rapidamente hidrolisados e absorvidos pelos tecidos, pela barreira placentária ou hematoencefálica (SILVA, DE CARLI, 2021). Por se tratar de uma substância altamente tóxica e pelo fato de a exposição poder resultar em efeitos deletérios à saúde, estes produtos também tem se tornado alvo de preocupação. Distúrbios neurológicos, psiquiátricos de longo prazo, como prejuízos na memória, atenção e outros domínios de cognição, doenças crônicas que manifestam esses sintomas têm sido atribuídas à exposição aos organofosforados (NAUGHTON; TERRY JR., 2018), além de relatos de formigamento e queimação em membros superiores, seguido de fraqueza e ataxia dos membros inferiores, com possibilidade de evolução para paralisia espástica, que implica em lesão em neurônios motores (efeito direto na medula espinhal) em casos de exposição prolongada aos OF (CALDAS, 2000).

Os OF caracterizam-se pela inibição aguda da acetilcolinesterase, que também pode afetar diversos alvos que desencadeiam estresse oxidativo, *déficits* de transporte axonal, neuroinflamação e autoimunidade (NAUGHTON; TERRY JR.,

2018). A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima do sistema nervoso, responsável pela hidrólise da acetilcolina presente nas sinapses (FIGURA 1A) e com função de mediação química da transmissão de impulsos nervosos por meio das fibras pré-ganglionares parassimpática e pós-ganglionares simpáticas (CÂMARA et al., 2012).

A inibição da acetilcolinesterase desencadeia o acúmulo do neurotransmissor, acetilcolina (ACh), nas junções nervosas (FIGURA 1B), favorecendo sua ação de forma intensa e prolongada nas sinapses nervosas, uma super estimulação colinérgica. O que interfere na propagação dos estímulos nervosos, levando a efeitos muscarínicos, pós-ganglionares, no sistema nervoso parassimpático e simpático, nicotínicos, pré-ganglionares, no sistema nervoso simpático, além de efeitos nicotínicos nas junções neuromusculares (RUSYNIAK; NAÑAGAS, 2004; BRAGA; VALLE, 2007), além de efeitos motores no sistema nervoso central que, em insetos, possivelmente resultará em paralisia e morte (BRAGA; VALLE, 2007).

Figura 1. Representação esquemática da interação entre dois neurônios por meio da sinapse química. **A.** Sinalização colinérgica – funcionamento inalterado. **B.** Efeito dos organofosforados sobre a acetilcolinesterase – funcionamento alterado por meio da atuação de OF atuando sobre a acetilcolinesterase, favorecendo a inibição desta enzima e conseqüentemente, a não degradação do neurotransmissor. ACh – acetilcolina; AChE – enzima acetilcolinesterase.



Fonte: Adaptado de Correa et al. (2019).

Ainda, estudos vêm indicando que a neurotoxicidade pode ser decorrente da exposição prolongada e contínua a baixas doses de OF, resultando em sintomas neurocomportamentais tardios, os quais ocorrem sem sintomas colinérgicos visíveis, demonstrando ser independentes da inibição da AChE (SINGH; SHARMA, 2000; SALVI et al., 2003). Segundo Terry Jr. (2012), a exposição prolongada a OF em que ocorrem alterações de função em alvos não colinérgicos, afeta outras proteínas, além da AChE e uma variedade de receptores e de enzimas.

Os efeitos desencadeados nos insetos ou em mamíferos exposto aos OF depende das propriedades do produto, sendo destaque a solubilidade em lipídios, estabilidade da união à acetilcolinesterase e da atividade da enzima (BALJINDER; JAGDEEP; KASHMIR, 2014). A forma de atuação do OF também interfere nos efeitos desencadeados, uma vez que alguns apresentam metabolização indireta, como é o caso do malation, quando ocorre formação de metabólitos primários tóxicos e direta, quando a substância age diretamente nas células e tecidos (TERRY JR., 2012).

No organismo, a colinesterase se apresenta de duas formas: a primeira conhecida como acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira ou eritrocitária (AChE), encontrada nos eritrócitos, no tecido nervoso (CALDAS, 2000; CÂMARA et al., 2012), no pulmão e nos músculos estriados (CÂMARA et al., 2012). Sua síntese ocorre durante a eritropoiese, sendo renovada entre 60 e 90 dias e tem afinidade específica para a acetilcolina (CALDAS, 2000).

A segunda forma de colinesterase é a sérica, butilcolinesterase, pseudocolinesterase ou colinesterase inespecífica (BChE), encontrada no fígado, pâncreas, intestino delgado, no plasma e em menor concentração no sistema nervoso central e periférico (CÂMARA et al., 2012), hidrolisa vários ésteres, incluindo a acetilcolina. Sua síntese ocorre a nível hepático e a renovação ocorre no período entre 07 e 60 dias. No sistema nervoso central está presente em células gliais, mas não em neurônios (CALDAS, 2000).

Em casos e intoxicação por OF, a determinação de colinesterase laboratorialmente é uma ferramenta importante (BALJINDER; JAGDEEP; KASHMIR, 2014), embora a determinação possa não coincidir com o quadro clínico (CALDAS, 2000). O tempo de meia vida e a função como biomarcador dessas enzimas são diferentes. A colinesterase eritrocitária apresenta o tempo de meia vida de três meses e biomarcador com função de efeito ao OF e cerca de sete dias

e biomarcador de exposição no caso da butilcolinesterase. Com base nessas diferenças, é possível identificar de forma temporal a intoxicação em aguda ou crônica (FELZENSZWALB, 2005; GEORGINO; GOMES; DRUMOND, 2005).

Câmara et al. (2012) demonstraram em análises com humanos expostos a OF, que a dosagem de acetilcolinesterase e butilcolinesterase apresentam valores com grande variabilidade interindividual. O coeficiente de variação no sexo masculino é de aproximadamente 47,5% na acetilcolinesterase e 24,6% na butilcolinesterase. Importante ressaltar que fatores como idade, sexo, massa corpórea e doenças cardíacas ou hepáticas podem interferir nos valores observados decorrentes da exposição. Diante da dificuldade em estabelecer um valor de referência para essas enzimas, é necessária a determinação de valores de referência para cada grupo analisado.

Estudos com ratos demonstraram que os níveis de BChE nos tecidos, exceto nos músculos e no cérebro são superiores aos níveis de AChE (LI et al., 2000). Foi observado que ratos selvagens apresentam até dez vezes mais BChE do que AChE. No soro e no intestino, foram observados, 1.03 e 0.21 unidades no tecido de AChE e 3.31 e 6.10 unidades no tecido de BChE, respectivamente (DUYSEN et al., 2001).

Os OF, como demonstrado anteriormente, interferem no sistema nervoso dos insetos, interferindo na propagação dos impulsos nervosos, mas os estudos demonstram que essas substâncias podem acarretar alterações ou danos de forma similar nos mamíferos, incluindo os humanos. Vale ressaltar que, os efeitos observados e o grau de intoxicação decorrentes da exposição são dependentes da via de contato, tempo de exposição e a dose a qual o organismo foi exposto (COLEONE, 2014).

2.1.1 Malation

O malation S-[1,2-di (etoxicarbonil) etil] dimetil fosforotionato ($C_{10}H_{19}O_6PS_2$) é um OF utilizado em larga escala em todo o mundo, as pesquisas recentes mostram um consumo entre 32 e 44% do total de pesticidas organofostorados (VASSEGHIAN et al., 2020). Esse produto apresenta as seguintes características físico-químicas: massa molar de $330 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, solubilidade considerada pequena em água, na faixa de 20°C a 25°C , alta solubilidade em solventes orgânicos e em

compostos lipídicos (SILVA; DE CARLI, 2021), ponto de ebulição de aproximadamente 156°C e polaridade quanto ao pH, moderado ou fracamente polar (COLEONE, 2014).

Esse produto apresenta classificação toxicológica na classe I, como extremamente tóxica e classificação do potencial de periculosidade ambiental e, na classe, II como muito perigoso ao meio ambiente (SILVA; GUIMARÃES; FERREIRA, 2001). Estudos em ratos mostram a DL50 do malation de 2100 mg/kg/dia (CALDAS, 2000). O malation ainda é classificado quanto à biotransformação em inibidor indireto, pois se apresenta na forma *tion* que não tem ação sob a colinesterase, necessitando da ação enzimática (molécula de enxofre é substituída por uma de oxigênio) para passar a forma *oxon*, que possui ação inibitória sob a colinesterase (SILVA; GUIMARÃES; FERREIRA, 2001). Por ser um composto lipofílico pode alcançar concentrações significativas no tecido nervoso, e/ou outros tecidos ricos em lipídios (CALDAS, 2000).

Usado no controle de mosquitos e uma variedade de insetos que atacam plantas, arbustos, legumes e frutas. Ainda é encontrado na composição de outros produtos pesticidas usados em jardins ou ambientes fechados, como estufas de produção para o controle de insetos, produtos para controle de ectoparasitas em animais domésticos, e produtos para controle de piolhos em humanos (OMS, 2003).

O malation, amplamente usado em países como os Estados Unidos e agências estaduais locais para o controle de mosquitos adultos, a fim de impedir a propagação do vetor *Aedes aegypti* e propagação do Zika vírus, Chikungunya e Dengue (EPA, 2017). No Brasil, o malation, foi adotado pelo Ministério da Saúde em 2002, para o controle do mosquito transmissor do vírus da dengue, período em que foi criado, no Brasil, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), que propôs as Diretrizes Nacionais para a prevenção e controle de epidemias de Dengue, a qual recomendava: O uso de substâncias químicas – inseticidas, para o controle do vetor na fase larval ou adulta (BRASIL, 2009).

Para a aplicação, foi previsto o uso de equipamentos acoplados a veículos realizando a distribuição de gotículas a ultrabaixo volume, ou seja, a pulverização, que possibilita a dispersão por todo o ambiente e não somente voltado a controle de inseto adulto (BRASIL, 2009). Em ambientes abertos, o malation tem rápida degradação por hidrólise, biodegradação e fotólise. Quando liberado no ar, é

degradado na ATM por reação com o radical hidroxila, produzido fotoquimicamente. A meia vida para essa reação é de aproximadamente 5 horas (ATSDR, 2000). Assim, essa substância é classificada como não persistente ou moderadamente persistente no ambiente (COLEONE, 2014).

O malation dá origem ao seu metabólito primário, malaoxon, substância com efeito tóxico, além de outros dos seus metabólitos como, malation monoácido (α e β), dietil fumarato, ácido O, O dimetilfosforotidiotico (EPA, 2006). A exposição ao malation ou aos seus subprodutos pode levar à intoxicação que pode causar diferentes efeitos agudos, subcrônicos ou crônicos. São relatadas alterações no sistema nervoso central, simpático, parassimpático, além de, ser citotóxico, carcinogênico e gerar efeitos deletérios em células reprodutivas (GIRI et al., 2002; PAVÃO; LEÃO, 2005).

Barnejee et al. (1999) relataram que a exposição a esse OF também está relacionada a efeitos imunossupressores no organismo em diferentes níveis. Podendo causar alterações fisiológicas e patológicas no estado nutricional, nas funções hormonais, no metabolismo hepático e outros mecanismos imunoregulatórios. Podem interferir direta ou indiretamente nas células linfoides, células T, macrófagos, no metabolismo das imunoglobulinas ou mesmo na biossíntese macromolecular.

2.1.2 Exposição e possíveis efeitos do OF – Malation

Os pesticidas em contato com os mamíferos podem ser absorvidos pela via respiratória, dérmica e/ou gastrointestinal, acarretando em diversos e diferentes sinais e sintomas específicos de intoxicação aguda, subcrônica ou crônica, com manifestação leve, moderada ou grave (POSSAMAI et al., 2007). O uso extensivo do malation resulta na contaminação das culturas alimentares, sistemas hídricos naturais e no solo, o que expõe animais e humanos constantemente a ingestão de água e alimentos com resíduos (NEWHART, 2006).

Aindam por via oral é bastante comum casos de intoxicação aguda acidental ou em tentativas de suicídio, já a via dérmica é a mais comum nas intoxicações ocupacionais, seguidas das respiratórias (THOMPSON et al., 1998).

O tempo de exposição, a dose e a via de administração do composto influenciam diretamente se a absorção pelos tecidos será em maior ou menor grau

(BOUCHARD et al., 2003). A eliminação do malation no homem ocorre principalmente pela urina, ocorrendo no período máximo de 2 dias. Nos ratos, a via de excreção também é a urina, mas em um tempo mais curto, de 80 a 90% é excretado nas primeiras 24 horas após a exposição. Os ratos convertem de 4 a 6% do malation em malaaxon e apresenta um tempo de meia-vida ao composto de 1,4 dias no sangue, se administrado oralmente (WHO, 2003).

Em casos de exposição aguda ao malation pode ocorrer a chamada síndrome muscarínica na qual são observados sintomas como: distúrbios cardiocirculatórios, distúrbios gastrointestinais (aumento de movimento peristáltico e tônus intestinal, aumento da secreção digestiva, vômitos e cólicas) entre outros sintomas. Síndrome nicotínica com sintomas como: espasmos, tremores da musculatura esquelética, flacidez e paralisia muscular, tremor de língua, lábios, olhos ou pálpebras e fibrilações musculares são muito comuns. Ainda, pode ocorrer síndrome do sistema nervoso central como inquietude, insônia, cefaleia, convulsão ou coma (WHO, 2003; COSTA, 2018).

Estudos mostram que a exposição ao malation é tóxica ao fígado, aos rins, testículos e cérebro de humanos e animais, pois a molécula do malation é rapidamente metabolizada no corpo na forma análoga, bioativa, o malaaxon. Este bioativo é solúvel em lipídios, sendo geralmente armazenado no fígado na forma de vácuolos, causando um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BURATTI et al., 2005). A biotransformação que favorece a toxicidade do malation tem relação com a conversão deste composto em radicais livres. Os estudos mostram que esses radicais junto a outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio participam do mecanismo de ação deste composto (BANERJEE et al., 1999).

Silva e De Carli (2021), afirmam que um dos mecanismos associados à toxicidade do malation é a formação de radicais livres provenientes do estresse oxidativo causado nas células. Este fator indica uma ligação entre o malation e o processo de envelhecimento e a ocorrência de doenças degenerativa com ação dos radicais livres. Entretanto, é importante destacar que os mecanismos envolvidos na toxicidade induzida por esse OF ainda são limitados.

A exposição ao malation causa alteração dos níveis de substâncias que são reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), favorecendo o aumento dessas substâncias no organismo, e assim, alteram a atividade das enzimas antioxidantes

glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superóxido dimutase (SOD), catalase e danos no DNA (SILVA, DE CARLI, 2021). Tais alterações também foram observadas em camundongo expostos a doses de 100, 500 ou 1500mg/kg/dia de malation por períodos de 15 a 120 dias (YARSAN et al., 1999).

Ainda, segundo Severcan et al. (2019), a exposição crônica ao malation pode levar a danos ao fígado, pois causa vasodilatação nos capilares sinusóides e a formação de vacúolos lipídicos nos hepatócitos, infiltrações leucocíticas, dilatação e congestão dos vasos sanguíneos com hemorragia. Estudos em ratos mostram aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6).

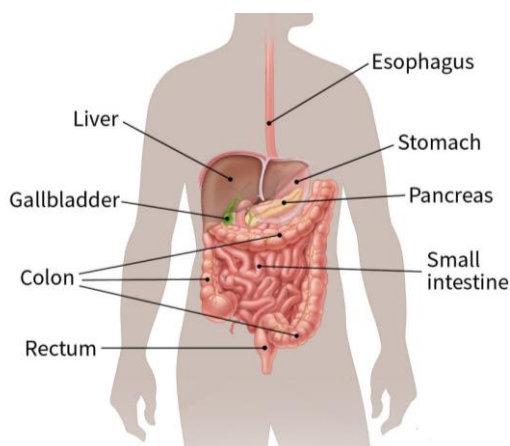
Terry Jr. (2012) em estudos com animais observou que exposições crônicas ou repetidas a OF em níveis que não estão associados à toxicidade aguda pode resultar em múltiplos sintomas neurocomportamentais e particularmente *déficit* cognitivo. Segundo Pope, Karanth e Liu (2005), uma variedade de efeitos podem ser observados a longo prazo, decorrente da exposição repetidas a OF abaixo do limiar para a toxicidade colinérgica aguda.

2.2 Trato Gastrointestinal - Intestino delgado

O tubo digestório ou gastrointestinal (TGI) é formado pelo dobramento do embrião, envolvendo parte do saco vitelínico e revestido pela endoderme. O TGI é dividido em esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e canal anal, além de apresentar os órgãos anexos como o fígado, vesícula biliar e pâncreas que participam do processo de digestão indiretamente (FIGURA 2) (GREENWOOD-VAN MEERVELD et al., 2017).

Em toda sua extensão, o tubo digestório, apresenta a mesma arquitetura geral, sendo constituído por quatro camadas concêntricas que possuem algumas particularidades de acordo com a função desempenhada. São descritas como camada ou túnica mucosa, camada ou tela submucosa, camada ou túnica muscular e camada ou túnica serosa (FIGURA 3) (GLERAN; SIMÕES, 2013).

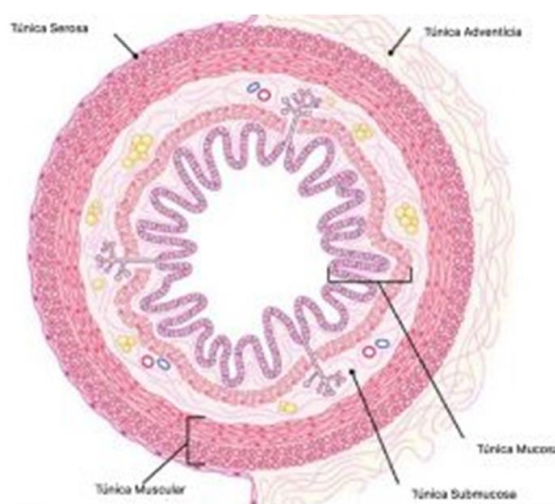
Figura 2. Representação dos órgãos do trato gastrointestinal e órgãos anexos.



Fonte: American Cancer Society, 2021.

Cada região apresenta funções especializadas, como transporte, digestão química, absorção de nutrientes, água, íons e eletrólitos. Especificamente, o intestino delgado é o local onde ocorre o final da digestão química dos alimentos e a absorção de nutrientes. O intestino delgado apresenta um comprimento médio de 5m a 7m em humanos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018) e em ratos Wistar adultos é de aproximadamente 100 cm (BARRA et al., 2008; HRYN et al., 2019). O comprimento desse órgão, aliado às especializações na superfície da mucosa, desempenha um importante papel no aumento da superfície de contato com o quimo, fator relevante à absorção de nutrientes (MENIN et al., 2008).

Figura 3. Representação das camadas constituintes da parede do trato gastrointestinal.



Fonte: Adaptado de Universidade Federal de Alfenas (2021).

São conhecidas as regiões de duodeno, jejuno e íleo no intestino delgado, regiões que apresentam semelhanças histológicas, mas sua identificação pode ser realizada por pequenas características (GARTNER; HIATT, 2007). No jejuno, por exemplo, são observadas pregas permanentes (valvas de Kerckring), em forma circular ou espiral, que são compostas pela camada mucosa e a tela submucosa, no duodeno e íleo, tais pregas podem ser observadas, mas não são características. As pregas favorecem o contato do quimo com a mucosa, região em que as células absorptivas ou enterócitos estão localizadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018), além de diminuir a velocidade do movimento do quimo ao longo do TGI (GARTNER; HIATT, 2007). Como o jejuno é a maior porção do intestino, a absorção de nutrientes ocorre na sua maioria, nesta porção (ABRAHAMSOHN, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

2.2.1. Túnica Mucosa e tipos celulares

Na camada mucosa, o tecido epitelial, o tecido conjuntivo frouxo e algumas células musculares lisas, contínuas à muscular da mucosa, formam protrusões digitiformes ou foliáceas, conhecidas como vilos ou vilosidades (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). Os vilos são estruturas permanentes, sendo mais numerosos no duodeno do que no jejuno e no íleo (GARTNER; HIATT, 2007).

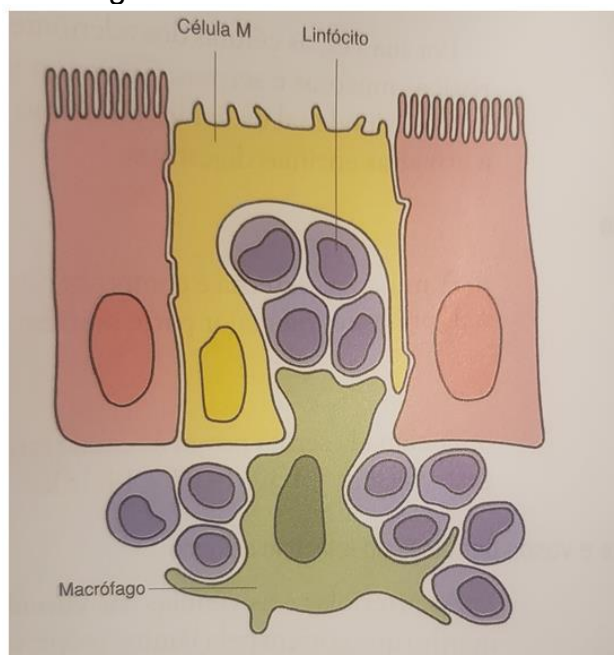
A lâmina própria que compõe a camada mucosa apresenta atividade imunológica. Células como plasmócitos, linfócitos, leucócitos extravasados, macrófagos, mastócitos e fibroblastos são residentes em meio a este tecido, além de nódulos linfoides solitários, adjacentes ao epitélio de revestimento da mucosa (HIB, 2003; GARTNER; HIATT, 2007).

No íleo são comuns grupos permanentes de nódulos linfoides, coletivamente descritos como Placas de Peyer. Os nódulos linfoides ao encostarem no epitélio de revestimento, substituem as células colunares por células M, que endocitam antígenos do lúmen intestinal (GARTNER; HIATT, 2007).

Nos vilos, o epitélio de revestimento é do tipo simples colunar, sendo contínuo ao epitélio das criptas. As células do revestimento da mucosa são chamadas de enterócitos ou células absorptivas, além das células caliciformes, que também compõe o revestimento. Nas criptas, são visíveis, os mesmos tipos celulares do revestimento, além de células enteroendócrinas, tronco e células de

Paneth, sendo essas exclusivas da região basal das criptas no intestino delgado (FIGURA 4) (ABRAHAMSOHN, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Figura 4. Célula M, sem microvilos, presente na mucosa do intestino, entre os enterócitos, região basal da célula em contato com linfócitos e prolongamentos citoplasmáticos de macrófago.



Fonte: Hibb, (2003).

Nos enterócitos são observados os microvilos, projeções digitiformes da membrana plasmática que aumentam a superfície de contato celular, auxiliando na função de absorção de nutrientes do órgão. A presença de pregas, vilos e microvilos são responsáveis por um grande aumento da superfície do órgão, pois é estimado que as pregas favoreçam um aumento de três vezes, os vilos, cerca de 10 vezes e os microvilos de aproximadamente 20 vezes, o que resulta em um aumento total de cerca de 600 vezes (GARTNER; HIATT, 2007; GLERAN; SIMÕES, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

As células caliciformes são produtoras de mucinogênio, cuja forma hidratada é a mucina, um componente do muco que constitui uma camada protetora que reveste o lúmen. Já as células M são células com micropregas que endocitam e transportam antígenos do lúmen para a lâmina própria, presentes somente nas regiões de placas de Peyer, quando o revestimento epitelial simples colunar é substituído por células M que não apresentam microvilos. Essa mudança de tipo de epitélio é um processo fisiológico que permite as células apresentarem a função de

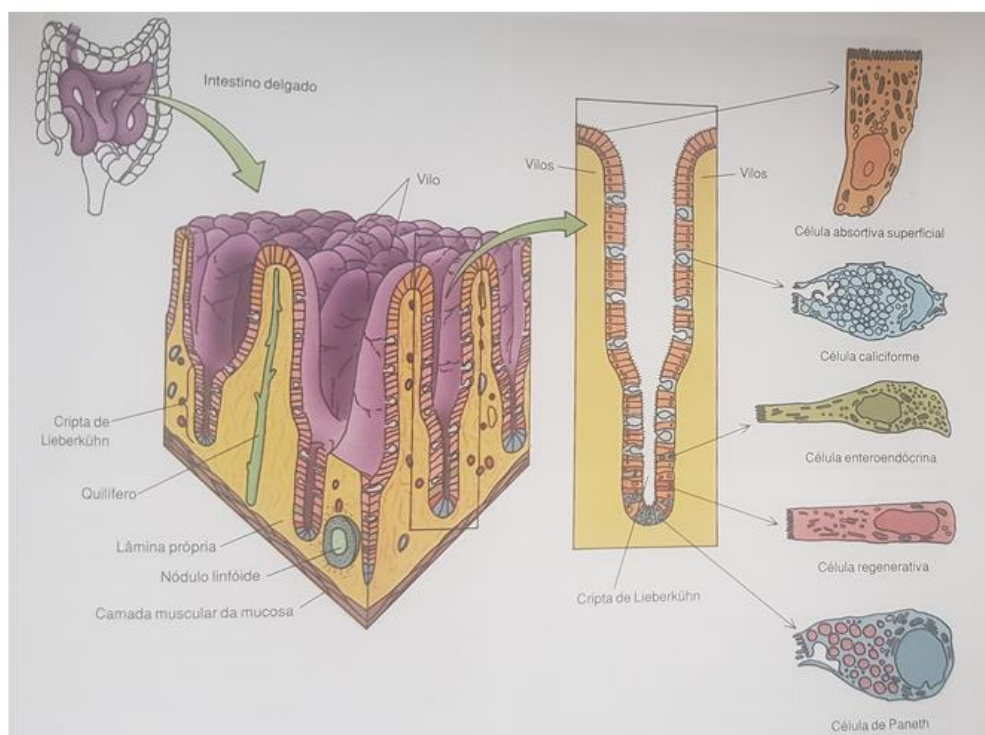
endocitose na região de revestimento das placas de Peyer (GARTNER; HIATT, 2007). As células enteroendócrinas presentes no intestino delgado, secretam uma variedade de hormônios gastrointestinais (CORMACK, 2008). São presentes as células G, secretora de gastrina no duodeno, célula D, secretora de somatostatina, célula D1, célula EC, célula P, célula K, célula S, célula I, além de bombesina no duodeno, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), serotonina, peptídeo inibidor gástrico (GIP), secretina, motilina (Mo) e colecistoquinina (CCK) (HIB, 2003).

As criptas são glândulas tubulosas simples, que se abrem nos espaços entre os vilos como perfurações do epitélio de revestimento. A metade das criptas é composta pelas células absortivas e caliciformes, sendo que a região basal da cripta não apresenta os enterócitos e poucas células caliciformes. A maioria das células nesta região é do tipo célula tronco, que sofrem extensa proliferação para repor as células do epitélio das criptas, da superfície da mucosa e dos vilos (SHARMA; KAUR; DHALLA, 2011).

As células de Paneth, também presentes na base das criptas, são facilmente identificadas devido a grande presença de grânulos de secreção eosinófilas no citoplasma apical. Essas células são produtoras de agente antibacteriano, lisozima, defensinas e o fator de necrose tumoral α (TNF- α). As células de Paneth, ao contrário das demais células presentes no intestino, apresentam um tempo de vida longo, cerca de 20 dias (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018) (FIGURA 5).

As células do intestino delgado são constantemente renovadas sendo que a cada 3 a 5 dias todas as células do revestimento são repostas (ABRAHAMSOHN, 2016). Cerca de 70 bilhões de células surgem diariamente no epitélio digestório (GLERAN; SIMÕES, 2013). As células do revestimento das vilosidades entram em apoptose e descamam, sendo repostas por células que migram a partir do fundo das criptas, originadas a partir de células tronco que apresentam alta atividade mitótica, as células formadas se diferenciam em enterócitos ou células caliciformes e alcançam as regiões de descamação celular (GLERAN; SIMÕES, 2013; ABRAHAMSOHN, 2016).

Figura 5. Mucosa, vilos, criptas no intestino delgado e células componentes da mucosa do intestino delgado.



Fonte: Gartner; Hiatt, (2007).

Na camada muscular da mucosa do intestino delgado ocorre a presença de um estrato circular interno e outro longitudinal externo de células musculares lisas. As fibras musculares da camada circular interna penetram as vilosidades e se estendem pelo eixo até a ponta do tecido conjuntivo frouxo, chegando à membrana basal. Durante a digestão, essas fibras musculares apresentam contração rítmica, encurtando os vilos várias vezes por minuto (GARTNER; HIATT, 2007).

2.2.2. Tela Submucosa

A tela submucosa do intestino delgado é composta por tecido conjuntivo fibroelástico com rico suprimento vascular e linfático. No duodeno são conhecidas as glândulas de Brünner ou duodenais, responsáveis por produzir um fluido mucoso, rico em bicarbonato de sódio (GARTNER; HIATT, 2007). A inervação intrínseca da submucosa provém do plexo submucoso, parte do sistema nervoso parassimpático (HIB, 2003).

2.2.3. Túnica Muscular e Serosa

A túnica muscular é construída por dois estratos de células musculares lisas: a circular interna e a longitudinal externa. Entre esses dois estratos da camada muscular localiza-se o plexo mioentérico, sendo o principal suprimento nervoso intrínseco da túnica muscular, camada responsável pela atividade peristáltica do intestino delgado (GARTNER; HIATT, 2007). O plexo mioentérico atua na modulação da contratilidade dos músculos lisos que alinham o trato gastrointestinal, fundamental para o transito intestinal (SOENEN et al., 2016).

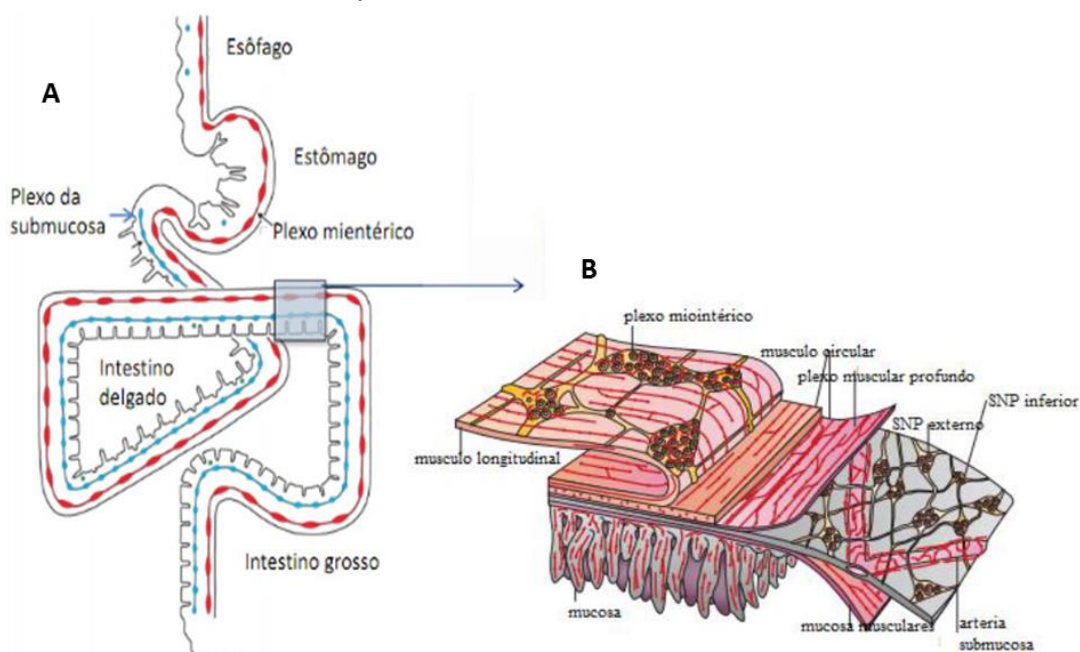
Estudos mostram que a camada muscular na região do jejuno de ratos apresenta uma espessura de 106 a 120 μ m e os corpos celulares de neurônios do plexo mioentérico apresentam uma área inferior a 156 μ m, denominados pequenos, de 156 a 308 μ m, considerados neurônios médios, e com área superior a 308 μ m, grandes neurônios (DE BRITTO et al., 2011). Os dois principais grupos de neurônios mioentéricos são neurônios colinérgicos, que são excitatórios e os nitrérgicos que são inibitórios (SOENEN, et al., 2016). A variação de tamanho tem relação com a atividade do neurônio.

O plexo submucoso e o plexo mioentérico, responsáveis pela inervação do intestino delgado, compõe o Sistema Nervoso Entérico. O revestimento externo do intestino delgado é realizado pela túnica serosa, camada fina de tecido conjuntivo frouxo com epitélio de revestimento simples pavimentoso e vasos sanguíneos (GARTNER; HIATT, 2007).

2.3 Sistema Nervoso Entérico (SNE)

A parede do trato gastrointestinal, nas regiões de esôfago, estômago e intestinos, apresenta uma grande quantidade de tecido neural que constitui o chamado Sistema Nervoso Entérico - SNE (GERSHON, 2002) (FIGURA 6A). Este sistema é composto por extensos plexos de fibras nervosas que são derivadas parcialmente de fibras simpáticas e parassimpáticas, pré e pós-ganglionares, além de neurônios intrínsecos à parede intestinal (SOUZA et al., 1993) (FIGURA 6B).

Figura 6. Distribuição do sistema nervoso entérico nos órgãos do trato digestório. **A.** Distribuição do plexo mioentérico do esôfago ao intestino grosso e plexo submucoso a partir do intestino delgado. **B.** Organização e distribuição do plexo submucoso e mioentérico na parede do intestino.



Fonte: Adaptado de Frauches et al. (2016) (A) e Furness, (2012) (B).

O monitoramento e o controle do sistema digestivo pelos neurônios é um processo hierárquico. O SNE é capaz de gerar reflexos locais apropriados, além de participar de reflexos entre órgãos. Os reflexos entero-entéricos passam por vias de gânglios pré-vertebrais, sem incluir necessariamente o sistema nervoso central. Os sinais transmitidos dos órgãos digestivos por vias aferentes extrínsecas primárias ao sistema nervoso central desencadeiam reflexos que atuam de volta no sistema digestivo. Alguns sinais aferentes ao sistema nervoso central (SNC) mediam a coordenação com outros sistemas corporais, sendo que alguns estão relacionados a sensações como náuseas, dores, saciedade e desconforto (FURNESS, 2006).

2.3.1 Organização e distribuição do sistema nervoso entérico

As células nervosas e as de suporte, conhecidas como glias entéricas, permanecem agrupadas em pequenos aglomerados, denominados de gânglios e

interligados por feixes de fibras nervosas, compondo o SNE (FURNESS, 2006). Neste sistema ocorre a formação de circuitos neurais que controlam as funções motoras, o fluxo sanguíneo local, o transporte e a secreção na mucosa, além de modular as funções imunológicas e endócrinas no trato digestório (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000), no sistema biliar e no pâncreas (FURNESS, 2006).

Neurônios primários aferentes presentes no SNE são sensíveis à substâncias químicas e a estímulos mecânicos, a interneurônios, ou a neurônios motores que agem em diferentes células efetoras, incluindo músculo liso, células de Cajal (células marca-passo), vasos sanguíneos, glândulas mucosas e epitélio, além de células intestinais envolvidas na resposta imune (COSTA; HENNING; BROOKES, 1998).

Um dos aspectos mais relevantes do SNE é o fato que os circuitos são capazes de responder às funções do TGI de modo independente aos comandos da medula espinal ou do cérebro, devido à presença dos corpos celulares que compõem os gânglios da parede de parte do trato gastrointestinal. Os circuitos formados por gânglios e feixes de fibras compõem os circuitos ganglionares (FURNESS, 2006).

Os circuitos ganglionares, no intestino delgado e no intestino grosso são compostos pelos gânglios, constituindo o plexo submucoso e plexo mioentérico. Os axônios dessas células nervosas inervam outros gânglios e também, os tecidos dos órgãos digestivos, como a camada muscular e a camada mucosa (FURNESS, 2006). A maioria dos neurônios entéricos envolvidos no controle das funções motoras estão localizados no plexo mioentérico, com alguns neurônios primários aferentes dispostos no plexo submucoso (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000).

2.3.1.1 Plexos submucoso e mioentérico

O arranjo dos gânglios no plexo submucoso, as funções e tipos de neurônios destes gânglios diferem entre as espécies. Nos humanos e nos porcos, exemplos de grandes mamíferos, os gânglios submucosos formam plexos distintos, mas interconectados que se organizam em diferentes níveis de profundidade e com populações neuronais diferentes, sendo essas variações aparentes na morfologia e natureza química das células nervosas constituintes (TIMMERMANS; HENS; ADRIAENSEN, 2001; FURNESS, 2006).

Na tela submucosa em grandes mamíferos, Furness (2006) descreve que os gânglios são compostos por um número menor de células nervosas, mas estes corpos celulares costumam ser maiores do que os presentes nos gânglios do plexo mioentérico. O plexo submucoso é contínuo ao redor da circunferência e ao longo do comprimento do intestino delgado e grosso.

Nesta tela, ainda são observados gânglios mais próximos à mucosa e gânglios mais próximos à camada muscular, todos interconectados entre si. São chamados de plexo submucoso interno, localizado mais próximo à mucosa, composto por muitos neurônios que inervam a mucosa e alguns poucos que suprem a muscular, e, plexo submucoso externo, o mais próximo à túnica muscular que fornece inervação a camada muscular circular e a longitudinal, além de fornecer inervação para a mucosa (TIMMERMANS; HENS; ADRIAENSEN, 2001; FURNESS, 2006).

Em cobaias, exemplo clássico de pequeno mamífero, o plexo submucoso é composto por somente uma camada de gânglios, sendo que os neurônios presentes contêm substâncias secretomotoras, mas não neurônios motores que suprem o músculo externo. O plexo submucoso nos pequenos mamíferos apresenta maior semelhança ao plexo submucoso interno presente nos grandes mamíferos (FURNESS, 2006). A formação do plexo também apresenta relação com o tamanho das espécies, em camundongos, o plexo submucoso é colonizado 2 a 3 dias após a colonização do plexo mioentérico. Em humanos, o atraso na formação do plexo submucoso é de 2 a 3 semanas, após a formação do mioentérico (WALLACE; BURNS, 2005).

Plexos submucosos ganglionados e extensos não são característicos no esôfago e estômago, como são no intestino delgado e grosso. No estômago dos pequenos mamíferos, como cobaias e ratos, também são raros ou mesmo ausentes os gânglios submucosos, sendo a inervação intrínseca da mucosa, realizada pelo plexo mioentérico, já em humanos ou cães, grandes mamíferos, os gânglios submucosos estão presentes (FURNESS; BORNSTEIN, 1991).

Ainda, ocorre um plexo de feixes de fibras finas presentes no tecido conjuntivo, que forma a camada superficial dos órgãos do trato digestório, conhecido como plexo subseroso. Este plexo fica entre o revestimento seroso da cavidade peritoneal e o músculo externo do intestino. A função destes feixes é a de

conectar nervos extrínsecos a nervos das camadas mais profundas da parede intestinal como a camada mucosa e a tela submucosa (FURNESS, 2006).

Na camada muscular, a inervação é organizada de acordo com a camada longitudinal e a circular. A muscular longitudinal apresenta inervação proveniente do plexo muscular longitudinal, o qual é formado por finos feixes de fibras nervosas paralelas, no interior do músculo, ou pelo chamado, componente terciário do plexo mioentérico. Este componente terciário é composto por axônios em feixes que se encontram dispostos na superfície do músculo (FURNESS, 2006).

A muscular circular apresenta feixes de nervos finos, paralelos ao comprimento das células musculares em toda a espessura do músculo circular. Esses feixes conectam-se com os componentes primários e secundários do plexo mioentérico e com o plexo muscular profundo no intestino delgado. Os feixes de fibras nervosas do plexo muscular circular formam uma malha continua ao redor da circunferência do intestino e por meio do nervo oblíquo, ao longo do comprimento do músculo (FURNESS, 2006).

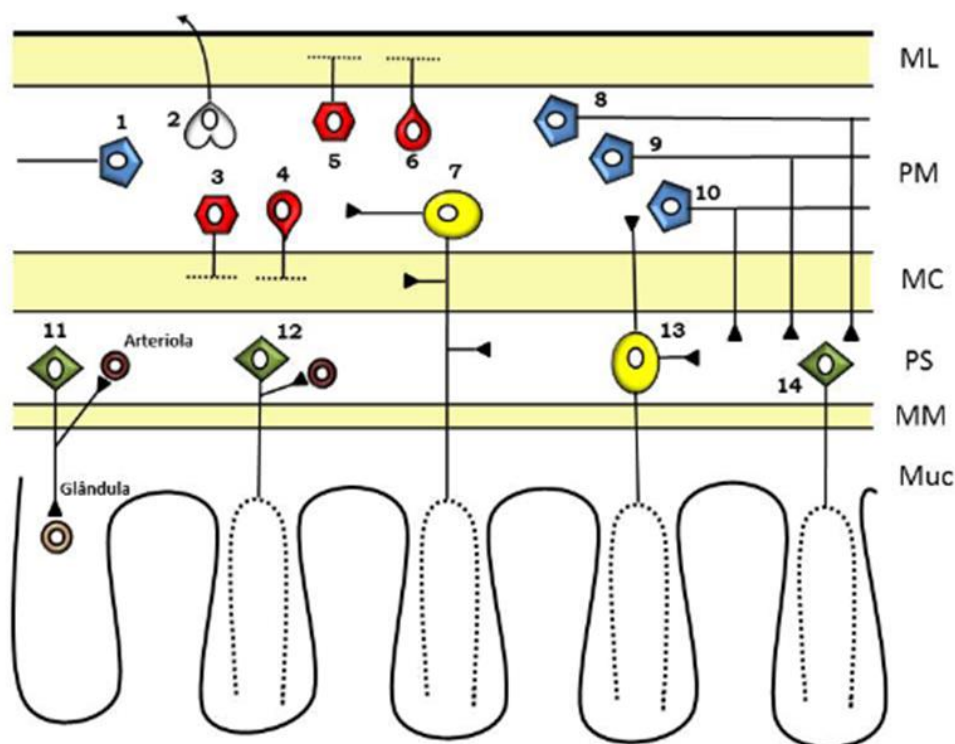
Nos pequenos mamíferos a maioria dos axônios que formam o plexo muscular, derivam de neurônios motores, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios mioentéricos. Mas, existem algumas poucas fibras que provêm de células nervosas presentes nos gânglios externos do plexo submucoso. Comumente, em espécies maiores, os gânglios são mais numerosos do que em espécies pequenas (FURNESS, 2006).

2.3.1.2 Neurônios entéricos

Os neurônios entéricos são classificados por meio da combinação de propriedades dos reflexos entéricos, morfologia, tipo de neurotransmissores entéricos e receptores, apresentando-se com uma variedade de tipos (FIGURA 7). Os neurônios aferentes primários (EPAN) apresentam os corpos celulares nos gânglios nodosos e na jugular (vagal aferente), ou nos gânglios de raiz dorsal (aferentes da coluna vertebral). O termo aferente é para determinar que são neurônios que carregam informação, mas não causam sensações, e primários por serem os primeiros. Os sinais desses neurônios são transportados por meio dos

neurônios intestinais, que apresentam corpos celulares no intestino, mas projetam além da parede intestinal os prolongamentos (FURNESS, 2006).

Figura 7. Representação de neurônios no intestino delgado de cobaias. Tipos de neurônios segundo as funções, morfologia do corpo celular, neurotransmissores e projeções. 1. Interneurônio ascendente; 2. Neurônio intestinais; 3. Motor inibitório do músculo circular; 4. Motor excitatório do músculo longitudinal; 5. Motor inibitório do músculo longitudinal; 6. Motor excitatório do músculo circular; 7. Aferente primário intrínseco mioentérico; 8. Interneurônio descendente (reflexos locais); 9. Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. Interneurônio descendente; 11. Vasodilatador/secretomotor colinérgico; 12. Vasodilatador/secretomotor não-colinérgico; 13. Aferente primário intrínseco submucoso e 14. Secretomotor (não-vasodilatador) colinérgico. Legenda: Muc. Mucosa, MM. Muscular da mucosa, PS. Plexo submucoso. MC. Músculo, PM. Plexo mioentérico, ML. Músculo longitudinal.



Fonte: Adaptado de Frauches et al. (2016).

Os chamados neurônios aferentes primários intrínsecos (IPAN) são neurônios distribuídos tanto nos gânglios submucosos quanto no mioentérico e não transmitem sensações como dor no intestino (FURNESS, 2006). Cerca de 14% dos neurônios submucosos são IPAN e no mioentérico são aproximadamente 30% do total. Esses neurônios respondem aos estímulos químicos luminiais, deformação

mecânica da mucosa e alongamento radial, além de tensão muscular (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). Além de estarem envolvidos nas funções fisiológicas no intestino delgado e intestino grosso, como secreções e fluxo sanguíneo, também participam do controle de doenças nesses órgãos (FURNESS, 2006).

Os IPAN se projetam para as vilosidades e se ramificam dentro dos gânglios submucosos e mioentéricos (FURNESS, 2006). Esses neurônios ainda, se ligam circunferencialmente a interneurônios ascendentes e descendentes do mioentérico, neurônios motores da muscular longitudinal, neurônios motores inibitórios e excitatórios da muscular circular e neurônios motores da muscular circular. Possivelmente as subpopulações se conectam por caminhos separados, ascendentes e descendentes (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000).

Neurônios excitatórios e inibitórios inervam a camada muscular circular e longitudinal e muscular da mucosa em todo o trato digestório. Os neurotransmissores primários dos neurônios excitatórios são a acetilcolina e as taquicininas, que atuam diretamente no músculo liso e indiretamente, via rede de células intersticiais no plexo profundo (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000; FURNESS, 2006). Já os neurônios inibitórios apresentam múltiplos neurotransmissores, como o óxido nítrico (NO), peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e trifosfato de adenosina (ATP). O papel do neurotransmissor de neurônios inibitórios varia entre as regiões e as espécies (FURNESS, 2006).

A maioria dos neurônios que inervam o músculo circular tem os corpos celulares nos gânglios mioentéricos, com alguma variação entre as espécies, por exemplo, em cobaias, todos os neurônios estão nos gânglios mioentéricos. Em cães, ratos, porcos e humanos uma parte desses neurônios estão alojados em gânglios submucosos, os demais nos gânglios mioentéricos (TIMMERMANS; HENS; ADRIAENSEN, 2001; FURNESS, 2006). Parte dos neurônios que inervam a muscular circular, na maioria das espécies são descritos como motores inibitórios (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000), além de neurônios motores excitatórios (FURNESS, 2006).

Os neurônios motores excitatórios representam em média, 14% da subpopulação neuronal na muscular circular com receptores nicotínicos rápidos e lentos que recebem estímulos de neurônios aferentes primários e de interneurônios ascendentes colinérgicos, além de estímulos de interneurônios excitatórios descendentes. Os neurônios motores inibitórios representam 17% da população e

recebem entradas nicotínicas rápidas de neurônios aferentes primários e entradas não colinérgicas de neurônios aferentes primários descendentes (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000).

Os neurônios motores responsáveis pela inervação do músculo longitudinal representam em média, 25% do total com corpos celulares localizados no plexo mioentérico de pequenos animais, já em porcos e grandes mamíferos, os corpos celulares estão no mioentérico com alguns corpos celulares no plexo submucoso. Independentemente da espécie, os neurônios motores que inervam a muscular longitudinal são muito numerosos (FURNESS, 2006). Esses neurônios apresentam pequenas projeções para o músculo longitudinal e recebem entradas sinápticas de neurônios aferentes primários de vias ascendentes e descendentes (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000).

No plexo submucoso, a fim de confirmar os tipos de neurônios e a identidade funcional das diferentes classes dessas células nervosas, Fantaguzzi et al. (2009) realizaram imunomarcações com calretinina em íleo de camundongos. A calretinina marcou 91% da população neuronal e em preparações marcadas com VIP e calretinina, 88% dos neurônios VIP eram fracamente marcados por calretinina, sendo que nenhum neurônio fortemente marcado era positivo para VIP, demonstrando a possibilidade de serem neurônios colinérgicos.

Ainda nesse plexo são descritos a presença de corpos celulares de neurônios não colinérgicos como: VIP/NPY/TH/calretinina, neurônios vasodilatadores: VIP / NPY / calretinina, neurônios secretomotores: ChAT / CGRP / somatostatina /calretinina e pequenas populações de neurônios mecânicos secretomotores colinérgicos e não colinérgicos (FANTAGUZZI et al., 2009).

A muscular da mucosa também apresenta inervação por neurônios motores inibitórios e excitatórios, sendo que os corpos celulares estão alojados no plexo submucoso (FURNESS, 2006). Já os interneurônios estão presentes em todas as regiões do intestino e apresentam variações entre as regiões do intestino delgado e grosso. Os interneurônios ascendentes compõem uma classe pequena, com aproximadamente 5% dos neurônios entéricos, sendo que recebem entradas sinápticas rápidas de outros interneurônios ascendentes que formam uma cadeia ascendente de excitação (COSTA, BROOKES, HENNIG, 2000). Também é comum os interneurônios ascendentes receberem entradas sinápticas nicotínicas rápidas e lentas dos neurônios aferentes primários. Eles apresentam enzimas para a síntese

de acetilcolina, taquicininas e também peptídeos opióides (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). Esses tipos de interneurônios estão envolvidos em reflexos locais de motilidade, assim como dois tipos de neurônios colinérgicos descendentes (FURNESS, 2006).

Já os interneurônios descendentes compreendem cerca de 7% do total com várias classes, cada grupo difere na neuroquímica, sendo três delas colinérgicas por conterem a enzima para a síntese de acetilcolina, conhecida como colina acetiltransferase (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). Os interneurônios descendentes, somatostatina (SOM) e ChAT, parecem estar envolvidos na passagem do complexo migratório mioelétrico (CMM) ao longo do intestino. Recebem entradas sinápticas rápidas e lentas, principalmente de neurônios aferentes não primários e formam uma cadeia sináptica de interneurônios ligados com outros neurônios do plexo mioentérico e submucoso (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000). O CMM são ondas de atividade excitatória conduzidas ao longo do intestino, mediadas pelo sistema neural intrínseco do intestino delgado. As ondas do CMM iniciam entre o estômago e o duodeno e passam por toda a extensão do intestino delgado (FURNESS, 2006).

2.4 Efeitos decorrentes da exposição à Organofosforados

A exposição a pesticidas vem sendo associada às doenças neurológicas e psiquiátricas em crianças e adultos em muitos estudos epidemiológicos, pois a exposição a várias classes de pesticidas parece causar aumento de TDAH (transtorno e *déficit* de atenção e hiperatividade), de comprometimentos motores, de diferenças estruturais no cérebro e de doenças neurodegenerativas como doença de Parkinson e doença de Alzheimer (BHATT; ELIAS; MANDOKI, 1999; ASCHERIO et al., 2006). Os OF podem atravessar a placenta devido as suas propriedades de solubilidade lipídica e a imaturidade da barreira hematoencefálica no início do desenvolvimento embrionário, além do fato que, a propriedade lipofílica os torna mais propenso a apresentar concentrações significativas no tecido nervoso (CALDAS, 2000) e/ou em órgãos com tecidos ricos em lipídios como o cérebro (ANDERSEN; NIELSEN; GRANDJEAN, 2000).

As enzimas envolvidas no metabolismo de pesticidas têm atividade diferencial e níveis de expressão ao longo do desenvolvimento, o que também pode predispor, durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a concentrações elevadas de produtos químicos tóxicos. A enzima paraoxonase 1 (PON-1), é uma importante enzima do tipo fosfotriesterase ou A-esterase, capaz de hidrolisar os compostos OF, desempenhando ação direta de detoxificação, sendo que os níveis plasmáticos de PON-1 podem diferir ao longo do desenvolvimento (COLE et al., 2003; COSTA, 2006).

A vulnerabilidade do desenvolvimento à exposição a pesticidas pode continuar na vida pós-natal, pois por meio da amamentação, as crianças podem ser altamente expostas a substâncias tóxicas ambientais (COLE et al., 2003), além do consumo de água e/ou alimentos contaminados, o que favorece uma exposição prolongada em quantidades pequenas (VASSEGHIAN, et al., 2021). Estudos mostram que a exposição de crianças a pesticidas OF leva a decréscimo no índice de memória e cognição. Em ratos, ocorrem alterações nos transportadores de serotonina (5-HT), nos receptores 5-HT no cérebro, diminuição de colina acetiltransferase (ChAT) e transportador vesicular de acetilcolina (vAChT), entre outras alterações (QIAO et al., 2002; ALDRIDGE et al., 2003).

A toxicidade dos compostos OF apresentam como mecanismo principal ou primário a inibição da enzima AChE (BANKS; LEIN, 2012), mas alguns estudos indicam que a intoxicação, seja crônica ou aguda, pode levar a outros efeitos não somente atribuídos à inibição da enzima, os chamados efeitos não colinérgicos (DUYSEN et al., 2001). A natureza lipofílica do metabólito do malation, por exemplo, facilita a interação com a membrana celular, desencadeando perturbações na estrutura da bicamada fosfolipídica da célula (ANDERSEN; NIELSEN; GRANDJEAN, 2000; VIDEIRA et al., 2001).

Por essa característica, os OF mesmo em baixas doses, podem interagir diretamente com membranas de diferentes células do corpo (NIIJIMA et al., 1999), resultando em modulação do estresse oxidativo (ANGUIANO; DE CASTRO; PECHEN DE D'ANGELO, 2001). No caso do OF malation, foi observada a incidência de estresse oxidativo em diferentes tecidos, como no fígado, cérebro, rim e testículos (ABDOLLAHI et al., 2004) e até mesmo em algumas áreas do cérebro (FORTUNATO et al., 2006).

Ainda em baixas doses de OF foram observadas ocorrências de fosforilação de proteínas e disfunção em mitocôndrias (HARGREAVES, 2012) e em doses mais elevadas foram observados danos ao DNA (PEARSON; PATEL, 2016; VANOVA et al., 2018). Saleh et al. (2003) relataram ainda que os OF também afetam vias bioquímicas que não envolvem a modulação da AChE, como alterações cromossômicas. Os efeitos dos OF sobre as mitocôndrias é bastante relevante, pois são organelas que apresentam importância e participação nas funções neuronais normais, o que inclui a homeostase do cálcio, o metabolismo aeróbico e, até mesmo, processos apoptóticos (HOLLENBECK; SAXTON, 2005). A exposição crônica de baixo nível induz neurodegeneração apoptótica, desencadeando o aumento de Ca^{+2} , levando a prejuízos na atividade dos complexos mitocondriais (KAU et al., 2007).

Estudos em ratos demonstraram que os OF em doses relativamente altas, podem alterar o transporte axonal, processo fundamental nos neurônios, em que várias organelas e vesículas ligadas à membrana e cargas adicionais são transportadas ao longo de microtúbulos do corpo celular ao axônio, esse processo é essencial durante o crescimento axonal e também para o desenvolvimento neuronal (MADAY et al., 2014). Yang et al. (2008) observaram em estudos *in vitro* diminuição do crescimento axonal decorrente da exposição aos OF.

Terry Jr. et al. (2007) observaram que tanto o transporte anterógrado quanto o retrógrado de vesículas no nervo ciático (*ex vivo*) foram prejudicados em ratos expostos repetidamente a OF, sendo que os *déficits* no transporte axonal foram persistentes, detectados por um período de até 14 dias após a exposição. Os mecanismos envolvidos nos *déficits* presentes nos axônios decorrente da exposição aos OF ainda não são completamente elucidados, mas evidências mostram que essas substâncias podem alterar a função de proteínas motoras como a cinesina e componentes do citoesqueleto neuronal como os microtúbulos (GEARHART et al., 2007).

Há evidências também que os OF danificam a polimerização da tubulina e outros fatores que participam da montagem e estabilidade dos microtúbulos, desencadeando prejuízos no transporte axonal (PRENDERGAST et al., 2007). Alguns OF ou seus metabólitos se ligam de forma covalente aos resíduos de tirosina na tubulina, um efeito que pode explicar a interrupção na polimerização observada na tubulina (JIANG et al., 2010).

Estudos mais recentes mostram que os OF ainda podem desencadear alterações nas modificações pós traducionais de moléculas no transporte axonal, por exemplo, alguns OF podem diminuir a acetilação da tubulina, o que prejudica os movimentos das mitocôndrias nos axônios e nos corpos celulares em neurônios de ratos (RAO et al., 2017). Estudos ainda mostram que OF como os clorpirifós pode induzir a peroxidação lipídica no tecido nervoso de ratos em desenvolvimento, mesmo com sinais leves de toxicidade sistêmica nos animais (SLOTKIN, 2005), além da diminuição dos antioxidantes mitocondriais glutationa e superóxido dismutase, por exemplo (NAUGHTON; TERRY JR., 2018).

A exposição repetida a baixos níveis de OF induz respostas inflamatórias em astrócitos cultivados, o que representa aumento de IL-6 e GFAP (MENSE et al., 2006). A exposição aguda aos OF aumenta a expressão de vários genes relacionados à citocinas associadas a inflamação, como a IL-6 e a IL-1 β (KOO et al., 2018). Exposições agudas e crônicas a essas substâncias também desencadeiam neuroinflamação por ativar as micróglias e estimular o aumento de citocinas pró-inflamatórias em camundongos (VIVIANI et al., 2014).

O aumento da inflamação após a exposição aos OF é descrito nos estudos, o que sugere a possibilidade de estar ligado a alterações no estresse oxidativo (JANG et al., 2015). Liang et al. (2018) demonstraram que níveis aumentados de marcadores de estresse oxidativo como GSSG, GSH e tirosina no cérebro após a exposição aguda a OF são acompanhados por aumentos nas citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC e GRO. Estudos realizados com soro de humanos expostos a OF demonstram que pode favorecer a produção de anticorpos direcionados às proteínas, como as proteínas de neurofilamentos, proteínas associadas aos microtúbulos, proteína associada aos microtúbulos 2 (MAP-2), proteína básica de mielina, glicoproteína associada a mielina, proteína ácida fibrilar glial e cálcio calmodulina quinase II. Destacam-se principalmente as que são conhecidas por desempenhar papéis relevantes na estrutura e função dos neurônios, incluindo a mielinização dos axônios e o transporte axonal (NAUGHTON; TERRY JR., 2018).

Quanto às características estruturais e morfológicas em órgãos, também são observadas alterações decorrentes da exposição prolongada a baixas doses de OF. Estudos com ratos adultos, expostos a baixa dose de malation por período prolongado com administração intraperitoneal mostram alterações no fígado como:

espaço portal pouco preservado, espessamento do tecido conjuntivo da região portal e vasos congestos. Nos pulmões foi observado infiltrado inflamatório mononuclear, constituído de macrófagos e linfócitos, descamação epitelial nos bronquíolos, presença de hemácias na luz e espessamento de tecido conjuntivo bronquiolar (INOUYE et al., 2014). Mansour e Gamet-Payrastre, (2014) observaram em fêmeas de camundongos expostas a baixas doses por período prolongado de clorpirifos, aumento de massa corporal e distúrbios no lóbulo hepático, degeneração hidrópica e áreas hemorrágicas no fígado, hipertrofia glomerular, descolamento do epitélio nos túbulos renais e degeneração hidrópica nos túbulos contorcidos próximos, além de acúmulo de células inflamatórias e espessamento da parede dos vasos sanguíneos nos rins, e ainda degeneração de alguns folículos ovarianos.

Vismaya (2014) observou em ratos jovens expostos à baixas doses de monocrotofos diminuição do tempo de trânsito intestinal e aumento da massa do intestino delgado, além de presença de infiltrados inflamatórios na base e ao longo do comprimento das vilosidades, congestão, erosão da superfície epitelial dos vilos e hipertrofia de células caliciformes. Sharma, Kaur e Dhalla, (2011) relataram redução de massa do intestino delgado e mudanças histopatológicas como perda de vilos, degeneração em criptas, grande quantidade de células picnóticas e diminuição do número total de células nas criptas devido a exposição de camundongos adultos à doses agudas de metil paration administrada intraperitonealmente por curto período de tempo.

Em íleo de ratos adultos expostos a baixas doses de diazinon foi observado aumento da estimulação das contrações musculares (TRAILOVIĆ et al., 2017). Em um estudo comparativo dos efeitos de doses baixas e intermediárias de forma prolongada ao OF phoxim em jejuno de ratos jovens, não foram observadas alterações de massa corporal ou na morfologia do órgão de ratos expostos a baixas doses. Sendo que ocorreu aumento da massa corporal dos animais e diminuição da altura dos vilos em jejuno de ratos expostos a doses intermediárias (SUN et al., 2018).

Dessa forma, este estudo foi desenvolvido a partir da hipótese de que a exposição oral a baixas doses de malation por vários dias consecutivos poderia causar modificações na estrutura morfológica da parede do jejuno, incluindo os componentes neuronais de sua inervação intrínseca, como parte do processo de

adaptação de indivíduos a agressão cumulativa causada por pequenas quantidades deste pesticida.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de duas diferentes doses de malation, consideradas baixas de acordo com a DL 50 oral para ratos (2100mg/kg/dia), decorrente da exposição contínua por 40 dias consecutivos no jejuno de ratos Wistar.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as características macroscópicas e microscópicas da parede do jejuno de ratos jovens expostos continuamente a doses de malation consideradas baixas;
- Verificar se a exposição a baixas doses de malation causa alterações na população geral e nas subpopulações fortemente e fracamente marcadas para calretinina e colinérgicas e nitrérgicas de neurônios dos plexos submucoso e mioentérico, respectivamente;
- Averiguar se ocorre alterações estruturais na parede do jejuno de ratos jovens expostos a baixas doses de malation, e se havendo alterações, ocorre o comprometimento do aproveitamento de nutrientes para o desenvolvimento de massa corporal.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; MOSTAFALOU, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SHADNIA, S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 137:29-34, 2004.

ABRAHAMSOHN, P. *Histologia*. 1 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

ANDERSEN, H. R.; NIELSEN, J. B.; GRANDJEAN, P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology*, 144, 121–127, 2000.

ALDRIDGE, J. E.; SEIDLER, F. J.; MEYER, A.; THILLAI, I.; SLOTKIN, T. A. Serotonergic systems targeted by developmental exposure to chlorpyrifos: Effects during different critical periods. *Environ. Health Perspect*, 111, 1736–1743, 2003.

American Cancer Society. How the gastrointestinal (GI) tract Works. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/gastrointestinal-stromal-tumor/about/what-is-gist.html>>. Acesso em: 05 set. 2021.

ANGUIANO, O. L.; DE CASTRO, A. C.; PECHEN DE D'ANGELO, A.M. The role of glutathione conjugation in the regulation of early toad embryos' tolerance to pesticides. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 128, 35–43, 2001.

ASCHERIO, A.; CHEN, H.; WEISSKOPF, M. G.; O'REILLY, E.; MCCULLOUGH, M.L.; CALLE, E. E.; SCHWARZSCHILD, M.A.; THUN, M. J. Pesticide exposure and risk for parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 60, 197–203, 2006.

ATSDR. Toxicological profile information sheet — Malathion. Draft for public comment. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000.

BHATT, M. H.; ELIAS, M. A.; MANKODI, A. K. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: Five cases. *Neurology*, 52, 1467–1471, 1999.

BALJINDER, S.; JAGDEEP, K.; KASHMIR, S. Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(2), 146–154, 2014.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A.; PASHA, S. T.; CHAKRABORTY, A. K. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107:33-47, 1999.

BANKS, C. N.; LEIN, P. J. A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology*, 33:575-584, 2012.

BARBOSA, L. C. A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: Editora UFV. 2004.

BARRA, A. A.; SILVA, A. L.; RENA, C. L.; FURTADO, M. C. V.; PINTO, R. M. Estudo morfológico do intestino de ratos após a criação cirúrgica de esfínteres artificiais. *Rev. Col. Bras. Cir.* v.35 n.2 Rio de Janeiro, 2008.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.16, n.4, p.279-293, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes Nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue – Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 160p.

BOUCHARD, M.; GOSSELIN, N. H.; BRUNET, R. C.; SAMUEL, O.; DUMOULIN, M. J.; CARRIER, G. A toxicokinetic model of malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. *Toxicological Sciences*, 73:182-194, 2003.

BURATTI, F. M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M. T. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos*, 33: 295-302, 2005.

CALDAS, L. Q. A. Intoxicações exógenas agudas por carbamatos, organofosforados, compostos biperidílicos e piretróides. Centro de Controle de intoxicações do Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense. Rio de Janeiro, 2000.

CÂMARA, S. A. V.; SILVA, I. S.; PONTES, E. R. J. C.; BARBOSA, A. M. J. Exposição a agrotóxicos: determinação dos valores de referência para colinesterase plasmática e eritrocitária. *Brasília Med*, 49(3):163-169, 2012.

CAN, A. Quantitative structure–toxicity relationship (QSTR) studies on the organophosphate insecticides. *Toxicology Letters* 230, 434–443, 2014.

CASIDA, J. E. Pest toxicology: The primary mechanisms of pesticide actions. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619, 2009.

COLE, T. B.; JAMPSA, R. L.; WALTER, B. J.; ARNDT, T. L.; RICHTER, R. J.; SHIH, D. M.; TWARD, A.; LUSIS, A. J.; JACK, R. M.; COSTA, L. G. Expression of human paraoxonase (Pon1) during development. *Pharmacogenetics*, 13, 357–364, 2003.

CORREA, G. F.; MORENA, B. C.; KIHARA, A. H.; PASCHON, V. Exposição a organofosforados durante a gravidez pode afetar o neurodesenvolvimento infantil. *Nanocell News*. v. 6, n. 5, 2019.

COSTA, M.; HENNIG, G. W.; BROOKES, S. J. H. Intestinal peristalsis: A mammalian motor pattern controlled by enteric neural circuits. In: Keihn RMH-WO, Jordan LM, Hultborn H, et al, eds. *Neuronal mechanisms for generating locomotor activity*. New York: New York Academy of Sciences, 860:464–6, 1998.

COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous System. *Gut*, supl. IV, 47: iv15–iv19, 2000.

COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*, 366 (1-2): 1-13, 2006.

COSTA, L. G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicol Sci*. Mar 1;162(1):24–35, 2018.

COLEONE, A. C. Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica e de risco ambiental. Dissertação de mestrado. USP, 2014.

CORMACK, D. H. *Fundamentos de Histologia*. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

DE BRITTO, M. R.; SCOZ, J. R.; MELO, R. G. de; PEREIRA, J. N. B.; DE TOLEDO, E. L.; H.; FARIA, H. G. de; STABILLE, S. R. Quantification and Morphometry of Myenteric Neurons in the Jejunum of Holtzman Rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of veterinary medicine*. 2011.

DUYSEN, E. G.; LI, B.; XIE, W.; SCHOPFER, L. M.; ANDERSON, S. R.; BROOMFIELD, C. A.; LOCKRIDGE, O. Evidence for nonacetylcholinesterase targets of organophosphorus nerve agent: supersensitivity of acetylcholinesterase knockout mouse to VX lethality. *J Pharmacol Exp Ther*, 299:528–535, 2001.

Environmental Protection Agency (EPA). *Controlling Adult Mosquitoes*. 2006. Disponível em: <www.epa.gov/mosquitocontrol/controlling-adult-mosquitoes>. Acesso em: 23 jul. 2020.

Environmental Protection Agency (EPA). Reregistration eligibility decision for malathion. 2017. Disponível em: <<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/malathion-red-revised.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

ERTHAL, R. P.; STAURENGO-FERRARI, L.; FATTORI, V.; LUIZ, K. G.; CUNHA, F. Q.; PESCIM, R. R.; CECCHINI, R.; VERRI JR., W. A.; GUARNIER, F. A.; FERNANDES, G. S. A. Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and testosterone. *Reproductive Toxicology*, 96: 17–26, 2020.

FANTAGUZZI, C. M.; THACKER, M.; CHIOCCHETTI, R.; FURNESS, J. B. Identification of neuron types in the submucosal ganglia of the mouse ileum. *Cell Tissue Res*, 336:179–189, 2009.

FELZENSZWALB, I. Indicadores biológicos de exposição e de efeito. In: Seminário Nacional de Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

FORTUNATO, J. J.; FEIER, G.; VITALI, A. M.; PETRONILHO, F. C.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochem Res* 31(5):671–678, 2006.

FURLONG, C. E.; COLE, T. B.; JARVIK, G. P.; PETTAN-BREWER, C.; GEISS, G. K.; RICHTER, R. J.; SHIH, D. M.; TWARD, A. D.; LUSIS, A. J.; COSTA, L. G. Role of paraoxonase (PON1) status in pesticide sensitivity: genetic and temporal determinants. *Neurotoxicology*, 26(4): 651-659, 2005.

FURNESS, J. B.; BORNSTEIN, J. C. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Yamada T (ed.) *Textbook of Gastroenterology*. p. 2–24. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, 1991.

FURNESS, J. B. *The Enteric Nervous System*. Backweel Publishing, 2006.

FURNESS, J. B. O sistema nervoso entérico e neurogastroenterology. 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.32>> Acesso em 16 set. 2021.

FRAUCHES, A. B.; MIZUNO, M. S.; COELHO-AGUIAR, J. M.; GOMES, A. L. T.; SOLETTI, R.; GOTIFRIED, C.; CASTELUCCI, P.; MOURA NETO, P.V. O Sistema Nervoso Entérico. In: Sistema digestório: integração Básico clinica, 13.ed., 2016.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de histologia em cores*. 3 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GEARHART, D. A.; SICKLES, D. W.; BUCCAFUSCO, J. J.; PRENDERGAST, M. A.; TERRY, A. V. Jr. Chlorpyrifos, chlorpyrifos-oxon, and diisopropylfluorophosphate inhibit kinesin-dependent microtubule motility. *Toxicol Appl Pharmacol.* 11; 218 (1) :20–9, 2007.

GEORGINO, H. O.; GOMES, M. M.; DRUMOND, T. L. Importância da linha de base pré-exposição das colinesterases (ChES) no controle ocupacional a praguicidas organofosforados e carbamatos. *Rev. Bras. Toxicol.* 18(1):43-8, 2005.

GERSHON, M. D. Development of the enteric nervous system. In: Brookes SJH, Costa M (eds) *Innervation of the Gastrointestinal Tract.* p. 469–525. Taylor & Francis, London and New York, 2002.

GIRI, S.; PRASAD, S. B.; GIRI, A.; SHARMA, G. D. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutation Research*, 514:223-231, 2002.

GLEREAN, A.; SIMÕES, M. J. *Fundamentos de Histologia para estudantes da área da saúde.* São Paulo: Santos editora, 2013.

HARGREAVES, A. J. Neurodegenerations Induced by Organophosphorous Compounds. *Adv Exp Med Biol*, 724:189-204, 2012.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B.; JOHNSON, A. C.; GRUNDY, D. *Gastrointestinal Physiology and Function. Handbook of experimental pharmacology*, 1-16, 2017.

HIB, J. Di Fiori *Histologia: Texto e Atlas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

HRYN, V. H. et al. Microscopic structure of albino rats' small intestine. *Wiad Lek*, 72, 5 cz. I, 733-738, 2019.

HOLLENBECK, P. J.; SAXTON, W. M. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci*, 118:5411–5419, 2005.

INOUE, L. A.; FERNANDEZ, L. M.; CARNEIRO, L. F. S; GERMANO, J. J.; CRISCI, A. R. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. *UNICIÊNCIAS*, v. 18, n. 2, p. 103-109, Dez. 2014.

JANG, Y.; LEE, A. Y.; JEONG, S. H.; PARK, K. H.; PAIK, M. K.; CHO, N. J.; KIM, J. E.; CHO, M. H. Chlorpyrifos induces NLRP3 inflammasome and pyroptosis/apoptosis via mitochondrial oxidative stress in human keratinocyte HaCaT cells. *Toxicology*. 12 2; 338:37–46, 2015.

JIANG, W.; DUYSSEN, E. G.; HANSEN, H.; SHLYAKHTENKO, L.; SCHOPFER, L. M.; LOCKRIDGE, O. Mice treated with chlorpyrifos or chlorpyrifos oxon have organophosphorylated tubulin in the brain and disrupted microtubule structures, suggesting a role for tubulin in neurotoxicity associated with exposure to organophosphorus agents. *Toxicol Sci.* 5;115(1):183–93, 2010.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas.* 13 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KALENDER, S.; UZUM, F. G.; DURAK, D.; DEMIR, F.; KALENDER, Y. Malathion-induced hepatotoxicity in rats: The effects of vitamins C and E. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 633–638, 2010.

KAU, P.; RADOTRA, B.; MINZ, R. W.; GILL, K. D. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *Neurotoxicology.* 11;28 (6):1208–19, 2007.

KOO, B. B.; MICHALOVICZ, L.T.; CALDERAZZO, S.; KELLY, K. A.; SULLIVAN, K.; KILLIANY, R.J.; O'CALLAGHAN, J. P. Corticosterone potentiates DFP-induced neuroinflammation and affects high-order diffusion imaging in a rat model of Gulf War Illness. *Brain Behav Immun* 1;67:42–46, 2018.

LI, B.; STRIBLEY, J.A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L. M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J. Neurochem*, 75:1320– 1331, 2000.

LIANG, L. P.; PEARSON-SMITH, J. N.; HUANG, J.; MCELROY, P.; DAY, B. J.; PATEL, M. Neuroprotective Effects of AEOL10150 in a Rat Organophosphate Model. *Toxicol Sci* 4 1;162(2):611–621, 2018.

MADAY, S.; TWELVETREES, A. E.; MOUGHAMIAN, A. J.; HOLZBAUR, E. L. Axonal transport: cargo-specific mechanisms of motility and regulation. *Neuron.* 10 22;84(2):292–309, 2014.

MANSOUR, S. A. K.; GAMET-PAYRASTRE, L. Ameliorative effect of vitamin E to mouse dams and their pups following exposure of mothers to chlorpyrifos during gestation and lactation periods. *Toxicology and Industrial Health* 1–18, 2014.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D. et al. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciência Rural*, v. 6, n.38, p. 1687-1693, 2008.

MENSE, S. M.; SENGUPTA, A.; LAN, C.; ZHOU, M.; BENTSMAN, G.; VOLSKY, D. J.; WHYATT, R. M.; PERERA, F. P.; ZHANG, L. The common insecticides cyfluthrin and chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicol Sci* 9;93(1):125–35, 2006.

NAUGHTON, S. X.; TERRY JR., A. V. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*. Sept. 01; 408: 101–112, 2018.

NEWHART, K. Environmental fate of malathion. California environmental protect agency, p.1-20, 2006.

NIIJIMA, H.; NAGAO, M.; NAKAJIMA, M.; TAKATORI, T.; MATSUDA, Y.; IWASE, H.; KOBAYASHI, M. Sarin-like and soman-like organophosphorous agents activate PLC in rat brains. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 156:64–69, 1999.

OMS, U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR MALATHION. Sept. 2003.

PAVÃO, A. C.; LEÃO, M. B. C. Riscos de carcinogenese quimica no controle do Aedes. In: Augusto, L. G. S.; CARNEIRO, R. M.; MARTINS, P. H. (Org.). *Abordagem Ecosistêmica Ensaio para o Controle da Dengue*. 1 ed. Recife: Editora Universitária da UFPE, v. 1, p. 213-225, 2005.

PEARSON, J. N.; PATEL, M. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Ann N Y Acad Sci*. 8;1378(1):17–24, 2016.

POPE, C. N.; KARANTH, S.; LIU, J. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 433-446, 2005.

POSSAMAI, F. P.; FORTUNATO, J. J. ; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; QUEVEDO, J. ; WILHELM FILHO, D.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 23(2):198-204, 2007.

PRENDERGAST, M. A.; SELF, R. L.; SMITH, K. J.; GHAYOUMI, L.; MULLINS, M. M.; BUTLER, T. R.; BUCCAFUSCO, J. J.; GEARHART, D. A.; TERRY, A.V. JR. Microtubule-associated targets in chlorpyrifos oxon hippocampal neurotoxicity. *Neuroscience*. 2007 4 25;146(1):330–9, 2007.

QIAO, D.; SEIDLER, F.J.; PADILLA, S.; SLOTKIN, T.A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: What is the vulnerable period? *Environ. Health Perspect.*, 110, 1097–1103, 2002.

RAO, A.N.; PATIL, A.; BRODNIK, Z. D.; QIANG, L.; ESPAÑA, R. A.; SULLIVAN, K. A.; BLACK, M. M.; BAAS, P. W. Pharmacologically increasing microtubule acetylation corrects stress-exacerbated effects of organophosphates on neurons. *Traffic* 7;18(7):433–441, 2017.

RUSYNIAK, D. E.; NAÑAGAS, K. A. Organophosphate poisoning. *Semin Neurol*, 24(2):197-204, 2004.

SALEH, A. M.; VIJAYASARATHY, C.; FERNANDEZ-CABEZUDO, M.; TALEB, M.; PETROIANU, G. Influence of paraoxon (POX) and parathion (PAT) on apoptosis: a possible mechanism for toxicity in low dose exposure. *J. Appl. Toxicol.* 23, 23–29, 2003.

SALVI, R. M; LARA, D. R.; GHISOLFI, E. S. et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Sci*, 72:267–271, 2003.

SEVERCAN, C.; EKREMOGLU, M.; SEN, B.; PASAOGLU, O. T.; AKYUREK, N.; SEVERCAN, S. M.; PASAOGLU, H. Acute effects of different doses of malathion on the rat liver. *Clinical and Experimental hepatology*. 2019.

SILVA, P. C. da; GUIMARÃES, F. L.; FERREIRA, R. N. C. Controle de vetores – Procedimento de Segurança. 1 ed., Brasília: MINISTÉRIO DA SAÚDE, Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia, 2001.

SILVA, L. O. T.; DE CARLI, B. P. Efeitos do malathion no sistema nervoso central: uma revisão breve. *J Health Sci Inst.* n. 39, v.1: 29-32, 2021.

SINGH, S.; SHARMA, N. Neurological syndromes following organophosphate poisoning. *Neurology India*, 48:308–313, 2000.

SLOTKIN, T. A. Developmental neurotoxicity of organophosphates: a case study of chlorpyrifos In: Gupta RC, editor. *Toxicity of organophosphate and carbamate pesticides*. San Diego: Elsevier Academic Press; p. 293–314, 2005.

SOUZA, R. R.; MORATELLI, H. B.; BORGES, N.; LIBERTI, E. A. Age-induced nerve cell loss in the myenteric plexus of the small intestine in man. *Gerontology*, 39:183-188, 1993.

SUN, Y.; ZHANG, J.; SONG, W.; SHAN, A. Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018.

SHARMA, S.; KAUR, K. DHALLA, A. S. Toxicological Effects of Methyl Parathion and Protection Afforded by Ascorbic Acid in Small Intestine of Swiss Albino Mice: A Histological and Histometric Study. *J Life Sci*, 3(2): 121-126, 2011.

TERRY, A. V. JR.; GEARHART, D. A.; BECK, W. D. JR.; TRUAN, J. N.; MIDDLEMORE, M. L.; WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M. G.; PRENDERGAST, M. A.; SICKLES, D. W.; BUCCAFUSCO, J. J. Chronic, intermittent exposure to chlorpyrifos in rats: protracted effects on axonal transport, neurotrophin receptors, cholinergic markers, and information processing. *J Pharmacol Exp Ther*. 9;322(3):1117–28, 2007.

TERRY JR, A. V. Functional Consequences of Repeated Organophosphate Exposure: Potential Non-Cholinergic Mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134:355–365, 2012.

TIMMERMANS, J. P.; BARBIERS, M.; SCHEUERMANN, D. W.; STACH, W.; ADRIAENSEN, D.; DE GROODT-LASSEEL, M. H. A. Occurrence, distribution and neurochemical features of small intestinal neurons projecting to the cranial mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res* 272:49–58, 1993.

TIMMERMANS, J. P.; HENS, J.; ADRIAENSEN, D. Outer Submucous Plexus: in Intrinsic Nerve Network Involved in Both Secretory and Motility Processes in the Intestine of Large Mammals and Humans. *The Anatomical Record*, 262:71–78, 2001.

THOMPSON, T. S.; TREBLE, R. G.; MAGLIOCCO, A.; ROETTGER, J. R.; EICHHORST, J. C. Case study: fatal poisoning by malathion. *Forensic Science International*, 95:89-98, 1998.

TRAILOVIĆ, S. M.; MARJANOVIĆ, D. S.; UZELAC, T. V.; MILOVANOVIĆ, M.; TRAILOVIĆ, J. N. Two opposite dose-dependent effects of diazinon on the motor activity of the rat ileum. *Research in Veterinary Science*, 2017.

Universidade Federal de Alfenas. Sistema Digestório. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/sistema-digestorio/>. Acesso em: 05 set. 2021.

VANOVA, N.; PEJCHAL, J.; HERMAN, D.; et al. Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *J Appl Toxicol.*, 38: 1058-1070, 2018.

VASSEGHIAN, Y.; MORADI, M.; PIRSAHEB, M.; KHATAEE, A.; HAHIMI, S.; BADI, M.Y.; KHANEGHAN, A. M. Pesticide descontamination usig UV/ferrous- activated

persulfate with the aid neuro-fuzzy modeling: a case study of Malathion. Food Res. 2020.

VIDEIRA, R. A.; ANTUNES-MADEIRA, M. C.; LOPES, V. I.; MADEIRA, V. M. Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. Biochim Biophys Acta 1511(2):360–368, 2001.

VISMAYA, P. S. R. Oral exposure to the organophosphorus insecticide, Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats. Food and Chemical Toxicology, 71 236–243, 2014.

VIVIANI, B.; BORASO, M.; MARCHETTI, N.; MARINOVICH, M. Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: a neurotoxic conspiracy? Neurotoxicology. 7;43:10–20, 2014.

WALLACE, A. S.; BURNS, A. J. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract. Cell Tissue Res. 319: 367–382, 2005.

WHO – World Organization of Health. Toxicological Profile for Malathion. Agency for toxic substances and disease registry, 2003.

YANG, D.; HOWARD, A.; BRUUN, D.; AJUA-ALEMANJ, M.; PICKART, C.; LEIN, P. J. Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase. Toxicol Appl Pharmacol. 2008 4 1;228(1):32–41, 2008.

YARSAN E, TANYUKSEL M, CELIK S, AYDIN A. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. Bull Environ Contam Toxicol 63:575–81, 1999.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho originou um artigo científico que será incluído como anexo nesta tese.

O artigo científico intitulado: LONG-TERM AND LOW-DOSE MALATHION EXPOSURE CAUSES JEJUNAL MORPHOLOGICAL CHANGES IN WISTAR RATS será submetido para publicação na revista científica TOXICOLOGY (ISSN: 0300-483X), cujo fator de impacto é 4.099.

Normas: <https://www.elsevier.com/journals/toxicology/0300-483X/guide-for-authors>.
Item: Support Open Acess:
<https://www.elsevier.com/journals/toxicology/0300-483X?generatepdf=true>.

LONG-TERM AND LOW-DOSE MALATHION EXPOSURE CAUSES JEJUNAL MORPHOLOGICAL CHANGES IN WISTAR RATS

Camila Regina Basso^a, Andreia Carla Eugenio Pupim^a,
Flávia Alessandra Guarnier^b, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes^c,
Andrea Name Colado Simão^d, Eduardo José de Almeida Araújo^a

^aUniversidade Estadual de Londrina, Laboratório de Neurociência Entérica,
Londrina Paraná, Brasil

^bUniversidade Estadual de Londrina, Laboratório de Fisiologia dos Radicais Livres,
Londrina, Paraná, Brasil

^cUniversidade Estadual de Londrina, Laboratório de Toxicologia e Distúrbios
Metabólicos da Reprodução, Londrina Paraná, Brasil

^dUniversidade Estadual de Londrina, Laboratório de Pesquisa em imunologia
Aplicada, Londrina Paraná, Brasil

Correspondent author: Eduardo José de Almeida Araujo

Email: eduardoaraujo@uel.br

Fax/Phone: +55 43 3371-4327

Laboratory of Enteric Neuroscience, Universidade Estadual de Londrina,
Avenida Celso Garcia Cid, PR 455, Km 380 Campus Universitário,
Londrina, cep: 86057-970, Paraná, Brasil.

ABSTRACT

Malathion (MAL) is among the organophosphorus (OP) most used worldwide as pesticide. This OP has rapid metabolism in the environment, but the impact of long-term and low-dose MAL exposure on the intestinal structure is not fully understood. Thus, this study aimed to evaluate the jejunal structure of rats exposed to two different low doses of MAL for long-term period. Young male Wistar rats were assigned into groups that received 0.9% saline solution (control) or were treated with 10mg/kg (M10) and 50mg/kg (M50) of MAL via gavage for 40 consecutive days. After euthanasia, the jejunum was collected for microscopy analysis, i.e., histopathology of the intestinal wall and organization of the enteric nervous system. Both doses did not change the body mass gain and the area of the jejunum. The lowest dose (10 mg/Kg) caused atrophy general atrophy in the jejunal histology layers and also depletion of intraepithelial lymphocytes and goblet cells producing neutral and acid mucins. General and weakly submucosal neurons labeled for calretinin were hypertrophied and the general and cholinergic myenteric ones were atrophied. The highest dose (50 mg/Kg) presented similar histopathological

changes in the jejunal wall, while the enteric neurons were atrophied in the submucosal plexus and hypertrophied in the myenteric plexus. We conclude that long-term and low-doses of MAL causes morphological changes on the jejunal wall but no changing the development of the rats.

Palavras-chave: organophosphorus, toxicity, small intestine.

1. Introduction

Malathion is an organophosphorus (OP) widely used in the world due to its high efficacy as a pesticide and low toxicity to mammals (BURATTI et al., 2005; UMETSU et al., 2009). In addition to its applicability in agriculture, malathion was also used for several years to control *Aedes aegypti*, which is the vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses, which are still a public health problem in several tropical countries nowadays (OPAS, 2019).

When sprayed into the environment or applied to vegetables, malathion can be absorbed by animals and humans through the dermal, respiratory or digestive routes. After absorption, enterocytes and hepatocytes biotransformed malathion into malaoxon, which is the primary metabolic responsible for its toxicity (BURATTI et al., 2005).

Acute, subchronic or chronic intoxication can occur depending on the concentration, time and route of exposure to malathion (VINHAL; SOARES, 2018). In acute intoxication, occurs the inhibition of the acetylcholinesterase enzyme, triggering typical symptoms of the cholinergic syndrome, such as increased sweating, salivation, bronchoconstriction, miosis, increased intestinal motility, diarrhea, tremors, muscle spasms. In addition, malathion can depress the central nervous system leading to dizziness, inhibition of the central respiratory center and even coma (COSTA, 2018). Subchronic and chronic intoxications result from the action of malathion metabolites on non-cholinergic targets, such as production of reactive oxygen species in the liver, brain, kidney and testis (ABDOLLAHI et al., 2004) and biochemical and physiological changes in lymphocytes (POSSAMAI et al., 2007).

Long-term and low-dose malathion exposure has been a concern of some research groups, as this OP has been used in agriculture since the mid-1940s

(COSTA, 2006; COSTA, 2018) and, for the control of disease-carrying vector insects in urban centers for nearly 20 years (FARENHORST; ANDRONAK; McQUEEN, 2015).

There are some reports highlighting damages caused by long-term and low-dose OP exposure. For example, young male rats showed alterations in the viability and quantity of sperm (ERTHAL et al., 2020). Regarding the body development, there is studies showing reduction (VISMAYA, 2014b) or increase (YAMAGUCHI et al., 2017) of the body mass of young rats. Long-term and mid-doses of malathion exposure cause thickening of the bronchiolar connective tissue, epithelial desquamation in the bronchi, presence of red blood cells in the lumen of the bronchioles and mononuclear inflammatory infiltrate in the lungs; in addition to hepatic alterations, such as poorly preserved portal space, thickening of the connective tissue in the portal region and congested vessels (INOUE et al., 2014).

Considering the impact on the intestine, low-dose of monocrotopho provokes a delay on the intestinal transit time and increase in the intestine mass, besides the appearance of inflammatory infiltrates at the base and along the length of the villi, goblet cell hypertrophy and erosion of the epithelial surface of the villi due to repeated low dose exposures (VISMAYA, 2014a). Ratos exposed to low-dose (20 mg/Kg) of phoxim for 28 days did not present changes in the body mass or structure of the intestine, but a mid-dose (180 mg/Kg) caused increase of the body mass and atrophy villi height (SUN et al., 2018). Trailović et al. (2017) found increased stimulation of muscle contractions in the ileum of rats exposed to low-dose of diazinon.

This background shows that OP are able to damaged the body depending on the dose, exposition time and via of administration. However, the scientific literature is lack regarding the impact of the malation low-dose exposition on the intestine and, thus, this study evaluated the toxicity of this OP on the jejunum of Wistar rats.

2. Material e Methods

All procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the State University of Londrina CEUA/UEL (Official Letter No. 137/2016).

2.1 Animals

Thirty 21-day-old male Wistar rats from the Central Animal Facility of the State University of Londrina were used. The rats were kept in 41x 34x17 cm polypropylene cages (n=5 animals). Water and chow (NUVILAB) were provided *ad libitum*. The rats underwent a period of acclimatization for 5 days, antiparasitic treatment and then were exposed to malathion or 0.9% saline (control group), for 40 days, via gavage.

2.2 Experimental groups

The animals were randomly assigned into three experimental groups (n=10/group): the control group received 0.9% saline solution; the M10 group received 10mg/kg of malathion and the M50 group received 50 mg/kg of malathion, by gavage, for 40 consecutive days.

The rats were individually weighed, twice a week, during the experimental period, in order to correct the amount of malathion necessary to maintain the predefined doses (10 or 50 mg/kg) and to monitor the body mass variation, to verify if malation alters the body development of the rats.

2.3 Food consumption and faecal pellet phenotype

During the last week of the experiment, all rats were isolated in individual cages for 12 hours (night period), returning to collective cages during the day. Food consumption, number and mass (gross and dried) of the total fecal pellets/rat/night were evaluated as an indication of the degree of digestibility of the food.

2.4 Samples collecting

On the 41st day of the experiment, when the rats were 65 days old, they were euthanized by inhaling carbon dioxide. The entire jejunum was collected, washed with a 0.1M PBS solution pH 7.4 to remove the luminal content. The jejunal length and width were measured in order to calculate the total area of the organ, which

was used as a correction factor for density population of submucosal and myenteric neurons.

The number of Peyer's patches in the jejunum was quantified. Besides, the major and minor axis of each patch was measured with a caliper in order to calculate their area, considering they presented an ellipses shape.

A 1 cm proximal jejunal fragment/rat was weighed. Another 1 cm-fragment was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C for the quantification of butylcholinesterase activity. Two more fragments were collected and fixed in 4% buffered paraformaldehyde for three hours, then washed with PBS and stored in PBS + sodium azide: the first was destined to the routine processing protocol to obtain histopathological slides and the second was used to make whole-mounts that were submitted to the immunofluorescence.

Retroperitoneal fat from each rat was weighed to verify whether there was an increase or decrease in lipid deposition resulting from exposure to malathion.

2.5 Butylcholinesterase activity

Frozen jejunum fragments were thawed, macerated in 500 µL of saline and centrifuged at 14,500 rpm for 10 minutes. Then, the homogenate was removed and centrifuged at 14,500 rpm for 5 minutes to obtain the supernatant. The sediment was discarded.

The supernatant was processed to determine the activity of Butyrylcholinesterase/mg of proteins using the PCHE method with the aid of the Flex® reagent cartridge kit (Dimension® clinical chemistry system - Siemens). To correct the value of butylcholinesterase, the quantification of total proteins from the remaining homogenate was performed using the Bradford method (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

2.6 Histopathological analysis

Four 5 µm semi-serial cross sections from each animal were stained with hematoxylin and eosin (HE) and seven images per section were captured in a photomicroscope (Axiophot Zeiss light – Moticam 2500 camera, 5.0 pixel, USB 2.0)

totaling 28 images/animal. The 5x objective was used to capture images to measure the total and mucosal thickness: the height of the villi and the depth of the crypts. The 20X objective images were used to measure the submucosal and muscle layers thickness. Regarding the muscle layer, the number of smooth muscle cell nuclei was counted in five images per section/rat using a 63x objective, in order to verify if there was a reduction in the number of smooth muscle cells. The Image Pro Plus 4.5 software was used to perform these analysis.

The 40x objective was used to quantify the number of intraepithelial lymphocytes present in the range of 100 enterocytes per villi/section/rat. In addition, in the 63x objective, we counted all cells in mitotic division (without differentiating the mitotic phases) present in the 10 crypts/section/rat.

Alcian Blue (AB) pH 1.0, AB pH 2.5 and periodic acid-Schiff (PAS) stains were performed in order to quantify goblet cells producing sulfomucins, sialomucins and neutral mucins, respectively. Quantification was performed directly under an optical light microscope, using a 40x objective, considering a sequence of 100 consecutive epithelial cells per animal, from the top of the villi to the deepest part of a crypt.

2.7 Enteric nervous system

Whole-mount preparations containing only the submucosal (submucosal plexus) or the muscular (myenteric plexus) were submitted to antigen recovery using a solution containing sodium citrate under microwave heating for 2 minutes, power of 90 (ODA et al., 2017). At room temperature, they were washed three times for 5 minutes, then, antigen blocking was performed with a solution containing 0.1 M PBS, 3% BSA and 0.5% Triton X-100 for 1 hour.

Whole-mounted preparations containing the submucosal plexus were incubated for 48h with primary antibodies aiming to label the total neuronal population (anti-HuC/D mouse; 1:500; Invitrogen, A21271) and neuronal subpopulations weakly and strongly immunoreactive for calretinin (anti-goat Cal: 1:1000; Merck Millipore, AB1550). Secondary antibodies (488 donkey anti-mouse e 588 donkey anti-goat) were applied for 2 hours protected from the light.

Whole-mounted preparations containing the myenteric plexus were incubated for 48 hours with primary antibodies to label the total neuronal population (anti-

HuC/D mouse; 1:500; Invitrogen, A21271), cholinergic neuronal subpopulation (anti-goat ChAT; 1:100; Merck Millipore, AB144P) and nitroergic (anti-nNOS rabbit; 1:1000; Santa Cruz, SC8309). Secondary antibodies (488 donkey anti-mouse, 568 donkey anti-goat or 594 donkey anti-rabbit) were applied for 2 hours protected from the light.

Images were captured using a fluorescence photomicroscope (Zeiss Axio Imager A1 – AxioCam MRc 5). To analyse the submucosal plexus, 14 images/rat were used to quantify the total number of the neurons (total population and subpopulations) and to measure the cell body area of 100 neurons using the *Image Pro Plus 4.5* software. The number of neurons found in the 14 images was projected to 1 cm². To analyse the myenteric plexus, we perform the same procedure but using 32 images.

2.8 Statistical analysis

The data obtained were analyzed using Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The type of distribution was analyzed using the Shapiro-Wilk test and results from data presenting normal distribution were expressed as mean \pm SEM, whereas results were expressed as a median (25th-75) for left data. Data from M10 and M50 rats were separately compared to the control group. The statistical t test for unpaired samples was used for data that presented normal distribution and the Mann Whitney test for data with free distribution. For all tests, the significance level considered was 5%.

3. Results

3.1 Effects of exposure to low doses of malathion

Rats exposed to the two doses of malathion (10 and 50 mg/Kg) did not show behavioral changes typical of intoxication with OP, such as stress, restlessness, diarrhea, excessive tearing or respiratory distress. The quantification of the butylcholinesterase activity in the jejunal wall demonstrated that it was not inhibited by the administered doses of malathion (Fig. 1A).

The food consumption of rats exposed to malathion was approximately 2% higher in the M10 group ($P>0.05$) and 6% higher in the M50 group ($P<0.05$) when compared to the control group. This implied a greater gain in body mass in rats from M10 and M50 compared to the control ($P<0.05$), but there was no greater accumulation of retroperitoneal fat. The gross and dried mass of the faecal pellets increased proportionally to the feed intake ($P<0.05$), so there was no significant difference in the degree of digestibility of the feed. These results are shown in the Table 1.

Jejunal dimensions remained unchanged after long-term and low-dose exposure to malathion (Fig. 1B-D), but jejunum mass was greater in the M10 group when compared to the control (Fig. 1E; $P<0.05$). The number of Peyer's patches was not altered by malathion (Fig. 1F), but its area was greater in the jejunum of rats from the M50 group when compared to the control group (Fig. 1G; $P<0.05$).

3.2 Morphometric analysis of the jejunal wall

The morphometric analysis of the microscopic aspects of the jejunal wall of rats exposed to a dose of 10mg/kg of malathion showed atrophy of the mucosal layer (Fig. 2A; $P<0.05$), enterocyte height (Fig. 2B; $P<0.05$), villi (Fig. 2D; $P<0.05$), crypt depth (Fig. 2E; $P<0.05$), mucosal muscle (Fig. 2F; $P<0.05$), submucosal layer (Fig. 2G; $P<0.05$), circular (Fig. 2H; $P<0.05$) and longitudinal (Fig. 2I; $P<0.05$) and total (Fig. 2J; $P<0.05$) muscle layer and, consequently, of the total jejunal wall thickness (Fig. 2K; $P<0.05$) when compared to the same parameters in the control group. The 50mg/kg dose caused atrophy in the mucosal layer (Fig. 2A; $P<0.05$), enterocyte height (Figs. 2B and C; $P<0.05$), villi height (Fig. 2D; $P<0.05$), mucosal muscle (Fig. 2F; $P<0.05$) and submucosal layer (Fig. 2G; $P<0.05$). These results are illustrated in the Fig. 3.

The analysis of the number of nuclei in the muscle layer showed a significant increase in the longitudinal muscle only in the group M10 when compared to the control ($P<0.05$). Regarding the quantification of cells in the jejunal lining, there was a reduction in the number of intraepithelial lymphocytes ($P<0.05$), goblet cells PAS⁺ ($P<0.05$) and AB 1.0⁺ ($P<0.05$) in both groups exposed to malathion. Goblet cells AB 2.5⁺ ($P<0.05$) were in less quantity only in

the M10 group when compared to the control. In both malathion groups, an increase in the number of cells dividing mitotically in the crypts was visible ($P < 0.05$). These results are found in the Table 2.

3.3. Morphometric alterations of the submucosal and myenteric plexi

Although the long-term and low-dose of malathion exposure has caused atrophy of components of the jejunal wall, no loss of enteric neurons was observed (Figs. 4-7).

Regarding submucosal neurons, it was observed that the number of the HuC/D+ general population (Fig. 4A) and of the subpopulation weakly labeled for calretinin (Fig. 4C) was decreased in the M10 group when compared to the control group ($P < 0.05$). The strongly calretinin-labeled submucosal neurons (Fig. 4B) showed no changes in number. The M10 rats presented neuronal hypertrophy in cell bodies of the general population and strongly and weakly subpopulations labelled for caretinin (Figs, 4D-5; $P < 0.05$). While the 50 mg/kg dose caused atrophy of cell bodies in the general population and subpopulation weakly labeled for calretinin (Figs. 4D-F; $P < 0.05$, illustrated in Fig. 5).

The number of myenteric neurons was unchanged (Figs. 6A-C). In rats exposed to a dose of 10mg\kg, atrophy of the cell bodies of the general population (Fig. 6D; $P < 0.05$) and of the cholinergic subpopulation (Fig. 6E; $P < 0.05$) was observed, with hypertrophy of the nitreergic subpopulation (Fig. 6F; $P < 0.05$). Besides, the 50mg\kg dose caused hypertrophy of the cholinergic and nitreergic subpopulations (Figs. 6E-F; $P < 0.05$, illustrated in Fig. 7A and B).

4. Discussion

To control the population of the *Aedes aegypti* in the urban environment, WHO recommends the use of some organophosphorus (OP), as malathion being one of the most used for years in endemic cities (WHO, 2002). Furthermore, this OP is widely used to control pests in crops, exposing workers to the risk of accidents and frequent exposure to the primary metabolite, formed after dispersion in the environment (BASTOS et al., 2020). This substance is even

more toxic and can cause adverse effects when exposure occurs for a long term (EPA, 2006).

The literature describes many of the adverse effects in different organs and systems of the human body, but there are few studies evaluating the consequences of long-term and low-dose exposure of malathion for mammals (DE SILVA; SAMARAWICKREMA; WICKREMASINGHE, 2006) and none of these studies specifically evaluated changes in the structure of the small intestine.

In this study, we present scientific evidence that low doses of malathion (10 and 50 mg/kg) administered orally to rats for 40 days cause slight structural damage to the jejunum wall, which apparently did not impact the growth and development of these animals.

OP intoxication presents a characteristic clinical panel of cholinergic hyperstimulation and can usually be laboratory confirmed by measuring cholinesterases in the blood (CÂMARA et al., 2012). On the other hand, Terry Jr. (2012) draws attention to the fact that long-term exposure to OP has been related to changes in function in non-cholinergic targets, including a variety of receptors and enzymes. If long-term exposure to OF occurs affecting non-cholinergic targets, the quantification of cholinesterases tends to remain unchanged in the incident tissues, including the small intestine (SALVI et al., 2003). The butyrylcholinesterase activity evaluated in the jejunum of rats of this study supports this indication, as there was no significant difference between the exposed groups in relation to the control group. The consequences of the exposure of the rats evaluated in this study were evident when the histological structure of the jejunal wall was verified, as will be discussed later.

Interestingly, the feed consumption of rats exposed to malathion increased by 2% at the 10 mg/kg dose and by 6% at the 50 mg/kg dose. Rats exposed to OP do not always show changes in feed intake (HAZARIKA, 2012; BONEBERG et al., 2017), which suggests that different parameters of the experimental design should be considered when aiming to assess food intake, such as: type of molecule, dose, route of administration and exposure time of the OP; as well as the strain, sex and age of the rats. It is worth mentioning here that intoxication with OP can cause nausea and vomiting (JOKANOVI, 2009), which indicates activation of the postrema area in the CNS and consequent inhibition of neuronal

circuits that generate the sensation of hunger (GELONEZE NETO; PAREJA, 2006). Therefore, the increase in feed intake observed in this study indicates low toxicity of the malathion doses evaluated here.

Our results also demonstrate that this increase in feed intake translated into an increase in body mass, as the degree of feed digestibility was not altered by exposure to malathion. For this understanding, the proportion of dried mass present in the faecal pellets in relation to the amount of ingested feed was considered. This result indicates that the jejunum, the main region of the digestive tube that performs digestion and absorption of nutrients (HRYN et al., 2019), did not presented its function significantly altered, despite the alterations in the histological structure. Considering that the experimental design to assess the consequences of exposing rats to OP varies greatly, in the literature there are descriptions of an increase (YAMAGUCHI et al., 2017) and a reduction (VISMAYA, 2014b) in body mass, which can also be a result variations in the form of metabolism, direct or indirect, and the type of metabolite produced from OP (COLEONE, 2014).

Despite the greater gain in body mass, rats exposed to malathion did not have their metabolism changed in terms of lipid accumulation, unlike what was observed in female rats exposed to different doses of acephate, which showed an increase in 29% of fat mass (YAMAGUCHI et al., 2017), and in male rats exposed to intermediate doses of poxim, which also showed increased body mass (SUN et al., 2018). Therefore, once again, different OP can interfere in the metabolism of rats in a heterogeneous way.

The increase in body mass of rats exposed to malathion was not accompanied by changes in the dimensions of the jejunum, which indicates that M10 and M50 group did not need to expand the jejunum structure to promote digestion and absorption of the greater amount of feed than was being ingested. In this particular case, the expansion of tissues directly exposed to malathion would be counter-intuitive, since atrophy of tissues and organs that are in direct contact with OP is expected, as confirmed in histological analyses. Although the atrophy was only observed at the microscopic level, the mass of the jejunum in relation to its length was increased in the M10 group. If tissue structure was reduced in this group, it is suggested that the observed mass increase is related to fluid accumulation indicating edema. Studies evaluating the effect of low-dose

exposure of monocrotophos in rats also caused an increase in jejunal mass (VISMAYA, 2014a; 2014b). In the lungs of rats exposed to malathion, thickening of the bronchiolar connective tissue was also observed, which may be indicative of edema (INOUYE et al., 2014).

Still on the macroscopic structure of the jejunum, an increase in the area of Peyer's patches was observed in the jejunum of M50 rats, which could be considered an indication of increased lymphoid tissue activity in the intestinal mucosa. However, it is important to highlight here that the number of intraepithelial lymphocytes was reduced in both groups exposed to malathion when compared to the control group. Malathion is known to promote biochemical and physiological changes in lymphocytes (POSSAMAI et al., 2007), which may have favored intraepithelial lymphocytes hypoplasia in groups exposed to OP. Furthermore, during the histopathological analysis, the presence of inflammatory infiltrates was not observed. Therefore, the increase in the area of Peyer's patches may have resulted from a reorganization of lymphoid tissue in the jejunal wall, possibly due to changes in the intestinal microbiota.

In this sense, it is important to consider that the intestinal microbiota acts as a defensive barrier in the animal, preventing the fixation of pathogens or the action of toxic substances on the organ wall (CHIQUIERI et al., 2007). It is estimated that 90% of OP administered orally are absorbed in the small intestine, which can directly affect the intestinal microbiota (COOK; SHENOY, 2003; SUN et al., 2018). A study using mice exposed to malathion showed that the population of commensal bacteria likely to assume a pathogenic character has completely disappeared (GAO et al., 2018). Xia et al. (2013) also observed a decrease in the proportion of proteobacteria and an increase in the proportion of Firmicutes and Lactobacillales in the small intestine of rats exposed to low doses of OP, which confirms that these substances can alter the intestinal microbiota and favor an increased immune response.

The histomorphometric analysis of the jejunal wall revealed that rats exposed to malathion at doses of 10 and 50mg/kg had an atrophied structure when compared to the control group. This is the main parameter of the present study, which demonstrates that even low doses of malathion (10 and 50 mg/kg), which are within the limit recommended by the WHO (MS, 2001), are capable of causing toxicity in rats and thus, it is suggested that in other mammals as well.

Tissue atrophy in the small intestine may result either from loss of cytoplasmic mass/extracellular matrix or from loss of cell numbers (BOUHET et al., 2004; BRACARENSE et al., 2012) and these phenomena are commonly related to a progressive accumulation of free radicals (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; BROWN, 2010). In fact, several studies report that malathion is capable of triggering oxidative stress and, consequently, causing damage to different cell types (KARAMI-MOHAJERI et al., 2014; ABDEL-SALAM et al., 2016).

In rats exposed to a dose of 10mg/kg, atrophy was observed in all parameters evaluated. In the group exposed to a dose of 50mg/kg, a smaller amount of atrophied structures was observed. Intestinal crypts were atrophied in the M10 group, with no atrophy in the M50 group when compared to the control group. This part of the mucosa is responsible for the turnover of the intestinal epithelium (HRUN et al., 2019), and it is therefore possible to infer that the dose of 50mg/kg of malathion caused greater replacement of epithelial cells that were in direct contact with the OP, without lead to atrophy of the crypts. This can be confirmed by the significant increase in the number of mitotically dividing cells in the intestinal crypts of this group. This idea is further corroborated by the fact that M50 enterocytes are impacted. Thus, it is suggested that this greater turnover of the intestinal epithelium, in some way, may have contributed to minimizing the absorption and centrifugal diffusion of malathion in the jejunal wall of rats from the M50 group. In the group exposed to a dose of 10mg/kg, the mitotic division rate was also increased in the crypts, but the impact caused by exposure to malathion to enterocytes was smaller, since the cells were not altered. Atrophy of the intestinal crypts may have occurred due to continuous exposure to low dose.

In addition to the direct effect of malathion, it is also important to consider that this atrophy is due to dysbiosis caused by the presence of OP (CHIQUIERI et al., 2007), which favors an environment for the fixation of pathogenic microorganisms. Several studies in the literature show a reduction in structures that have direct contact with the intestinal lumen when exposed to toxic agents (McLAUGHLIN et al., 2004; PINTON; NOUGAYREDE; DEL RIO, 2009; SUN et al., 2018). Conversely, there are also studies that observed an increase in the height of the villi in the jejunum of rats that received intraperitoneal injections of low doses of monocrotophos (VISMAYA, 2014b) and still others that did not

observe any histomorphological changes, as in the case of male rats exposed to 30 and 90 days at low doses of glyphosate (LARSEN et al., 2012).

Considering the contact between the intestinal wall and the lumen environment, it is important to emphasize that dynamic and balanced interactions between the mucus layer on the epithelium, enterocytes, microbiota and the animal's immune system are essential for the maintenance of mucosal homeostasis intestinal (LIEVIN-LE; SERVIN, 2006; DHARMANI et al., 2009; KIM; HO, 2010). The mucus layer that covers the epithelium, resulting from mucins secreted by goblet cells, favors the elimination of intestinal contents and provides the first line of defense against chemical and physical aggressions caused by ingested food, toxic or pathogenic substances, present in the intestinal lumen (HOLLINGSWORTH; SWANSON, 2004; KIM; HO, 2010). The number and activity of goblet cells is regulated by several types of mediators, many of them secreted by cells of the immune system (CARVALHO; COLLARES-BUZATO, 2005).

In the present study, depletion of almost all types of goblet cells was observed in both groups exposed to malathion, which suggests that the mucus layer on the surface of the intestinal epithelium of these rats was thinner compared to the control group. Thus, the jejunal enterocytes of M10 and M50 rats, and consequently the underlying tissue layers, were more exposed to the toxic environment of the lumen. Even so, as already mentioned, tissue constituents that indicated greater reactivity of the immune system in rats exposed to malathion were not observed. The depletion of goblet cells and decreased mucin secretion may indicate an adaptive response to OP residues in the intestinal lumen. Contrary to our results, Vismaya (2014a) observed goblet cell hypertrophy in the jejunal villi of rats exposed to low doses of monocrotophos. It is noteworthy here that different results between the studies that evaluated structural changes in the small intestine in relation to OP may be related to the form of administration and type of metabolization (direct or indirect) of OP.

OP are lipophilic molecules that can reach significant concentrations in tissues containing a large amount of lipids (ANDERSEN; NIELSEN; GRANDJEAN, 2000), as in the case of nervous tissue. Therefore, this study also evaluated neurons of the enteric nervous system. In this sense, it was observed

that the toxicity observed in microscopic structures of the jejunal wall was not enough to cause loss of neuronal cells in the myenteric plexus, while loss of submucosal neurons was observed for the general population and the subpopulation weakly labeled for calretinin.

It is important to consider that neurons are cells that are not easily replaced and that are often capable of showing adaptation mechanisms for their survival, among which their high plasticity stands out (FURNESS, 2006). In fact, hypertrophy and atrophy of neuronal cell bodies were observed in both jejunal plexuses of rats exposed to malathion. In addition to the physiological aspect (plasticity), it is suggested that these cell body size changes may have resulted from pathological structural changes caused by malathion.

There are several studies that describe that long-term and low-dose exposures to OP can lead to deficits in axonal transport (HIROKAWA; TAKEMURA, 2004; DUNCAN; GOLDSTEIN, 2006; TERRY JR., 2012). This transport is responsible for the movement of lipids, mitochondria, synaptic vesicles, enzymes, receptor proteins, growth factors and other macromolecules between the cell body and the axon (DUNCAN; GOLDSTEIN, 2006). Changing this flow can imply the metabolic activity of the neuronal cell body, leading to atrophy or hypertrophy, due to a possible decrease or accumulation of enzymes, lipids, mitochondria or macromolecules (TERRY JR., 2012; DOS SANTOS et al., 2016).

The submucosal and myenteric plexi are formed by functional subpopulations that are identified by chemical codes, which are formed by a set of molecules that form a signature for each functional group (FURNESS, 2006). In this study, the main subpopulations of these two plexi were evaluated, and all showed some degree of cell body size impairment.

Submucosal neurons strongly labeled for calretinin were hypertrophied in animals from M10 and did not show morphometric alterations in the M50 group when compared to the control group. Neurons weakly labeled for calretinin were atrophied in both the M10 and M50 groups when compared to the control group. These neurons are responsible for the dilation of blood vessels in the mucosa and for the secretion of chloride and, therefore, regulate the flow of fluid between the mucosa and the intestinal lumen (OLSOON; HOLMGREN, 2001).

Considering the myenteric plexus, nitregic neurons were hypertrophied in both groups exposed to malathion, while cholinergic ones were atrophied in M10 and hypertrophied in M50. Nitregic neurons are inhibitory motors and cholinergics are excitatory motors and, therefore, are directly related to peristaltic movements and intestinal transit time (OLSOON; HOLMGREN, 2001). The repercussion of these cell body size changes for the function of each cell type requires specific analyses, which were not performed because the general condition of rats exposed to malathion was good, and they even demonstrated development and body mass gain, which indicated that the body was getting an adequate amount of nutrient through the process of digestion and absorption carried out by the jejunum. Furthermore, these animals did not have diarrhea or constipation and the increase in the mass of the fecal pellets was proportional to the higher feed intake, which indicates that the intestine was being adequately regulated.

Thus, it is concluded exposure of 10 and 50 mg/kg of malathion presents low toxicity to the jejunum of rats, causing atrophy of the microscopic structures of the jejunal wall, but without compromising the homeostasis of the organism, since rats exposed to malathion showed body development similar to rats in the control group. This confirms the hypothesis that long-term and low-dose exposure of malathion is able to change the structure of the jejunal wall.

Acknowledgment

This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001.

REFERENCES

ABDEL-SALAM, O. M.; YOUNESS, E. R., MOHAMMED NA, YASSEN, N. N.; KHADRAWY, Y. A.; EL-TOUKHY, S. E.; et al. Novel neuroprotective and hepatoprotective effects of citric acid in acute malathion intoxication. *Asian Pac J Trop Med.*, 9(12): 1181-1194, 2016.

ABDOLLAHI, M.; MOSTAFALOU, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SHADNIA, S. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 137:29-34, 2004.

ANDERSEN, H. R.; NIELSEN, J. B.; GRANDJEAN, P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology*, 144, 121–127, 2000.

BASTOS, P. L.; BASTOS, A. F. T. L.; GURGEL, A. M.; GURGEL, I. G. D. Carcinogenicidade e Mutagenicidade do Malathion e seus dois Análogos: Uma Revisão Sistemática. *Revista Ciência Saúde coletiva*, 25 (8), 2020.

BONEBERG, A. A.; SAVALL, A. S. P.; FIDELIS, E. M.; FONSECA, N. C.; PINTON, S.; ROOS, D. H. Exposição crônica ao malation afeta a locomoção espontânea sem alterar a locomoção forçada em rato. *Anais do 9º SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – SIEPE*. Universidade Federal do Pampa. 2017.

BOUHET, S.; HOURCADE E., LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I. P. A micotoxina fumonisina B1 altera a proliferação e a função de barreira do intestino suíno células epiteliais. *Toxicol. Sci.*, 77 : 165–171, 2004.

BURATTI, F. M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M. T. et al. Malathion bioactivation in the human liver: the contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos.*, 33: 295-302, 2005.

BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W. D.; SCHATZMA, Y. R. G.; OSWALD, I. P. A ingestão crônica de desoxinivalenol e fumonisina, isoladamente ou em interação, induz alterações morfológicas e imunológicas no intestino dos leitões. *Br. J. Nutr.*, 107 : 1776–1786, 2012.

BROWN, G. C. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide*, 23(3): 153-165, 2010.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. Células: uma abordagem multidisciplinar. Manole, Barueri, São Paulo, 2005.

CÂMARA, S. A. V.; SILVA, I. S.; PONTES, E. R. J. C.; BARBOSA, A. M. J. Exposição a agrotóxicos: determinação dos valores de referência para colinesterase plasmática e eritrocitária. *Brasília Med.*, 49(3):163-169, 2012.

COOK, T.J.; SHENOY, S. S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the singlepass intestinal perfusion method in the rat. *Toxicology*, 184, 125–133, 2003.

COLEONE, C. C. Avaliação da dissipação do inseticida malation utilizado em nebulização a ultrabaixo volume no controle da dengue: avaliação ecotoxicológica

e de risco ambiental. 2014, 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

COSTA, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366, 1 – 13, 2006.

COSTA, L. G. Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues. *Toxicological Sciences*, 162(1), 24–35, 2018.

CHIQUIERI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L. et al. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.8, n.2, p. 97-104, 2007.

DHARMANI, P.; SRIVASTAVA, V.; KISSOON-SINGH, V.; et al.: Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*, 1:123–135. This article provides a succinct review of the role of mucin in innate host defense against commensal and pathogenic microbiota and the role of intestinal microbes in mucin regulation, 2009.

DE SILVA, H. J.; SAMARAWICKREMA, N. A.; WICKREMASINGHE, A. R. Toxicity due to organophosphorus compounds: what about chronic exposure?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100, 803-806, 2006.

DOS SANTOS, A. A.; NAIME, A. A.; DE OLIVEIRA, J.; COLLE, D.; DOS SANTOS, D. B.; HORT, M. A.; et al. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. *Arch Toxicol.*, 90(3): 647-660, 2016.

DUNCAN, J. E., GOLDSTEIN, L. S. The genetics of axonal transport and axonal transport disorders. *PLoS Genet.*, Sep 29.2(9):e124, 2006.

Environmental Protection Agency (EPA). Controlling Adult Mosquitoes. 2006. Disponível em: <www.epa.gov/mosquitocontrol/controlling-adult-mosquitoes>. Acesso em: 23 jul. 2020.

ERTHAL, R. P.; STAURENGO-FERRARI, L.; FATTORI, V.; LUIZ, K. G.; CUNHA, F. Q.; PESCIM, R. R.; CECCHINI, R.; VERRI JR., W. A.; GUARNIER, F. A.; FERNANDES, G. S. A. Exposure to low doses of malathion during juvenile and peripubertal periods impairs testicular and sperm parameters in rats: Role of oxidative stress and testosterone. *Reproductive Toxicology*, 96, 17–26, 2020.

FARENHORST, A.; ANDRONAK, L. A.; McQUEEN, R. D. A. Bulk Deposition of Pesticides in a Canadian City: Part 2. Impact of Malathion Use Within City Limits. *Water Air and Soil Pollution*, v. 226, n. 3, 2015.

FURNESS, J. B. *The Enteric Nervous System*. Backweel Publishing, 2006.

GAO, B., CHI, L., TU, P., BIAN, X., THOMAS, J., RU, H., LU, K. The organophosphate malathion disturbs gut microbiome development and the quorum-Sensing system. *Toxicol. Lett.* 283, 52–57, 2018.

GELONEZE NETO, B.; PAREJA, J. C. Mecanismos hormonais do controle de peso corporal e suas possíveis implicações para o tratamento da obesidade. *Einstein.*, Supl 1: S18-S22, 2006.

HIROKAWA, N.; TAKEMURA, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci.*, 6:201–214, 2004.

HOLLINGSWORTH, M. A.; SWANSON, B. J.: Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.*, 4:45–60, 2004.

HRYN, V. H. et al. Microscopic structure of albino rats' small intestine. *Wiad Lek*, 72, 5 cz. I, 733-738, 2019.

INOUYE, L. A.; FERNANDEZ, L. M.; CARNEIRO, L. F. S; GERMANO, J. J.; CRISCI, A. R. Avaliação Morfológica do Fígado e do Pulmão Pós Intoxicação por Organofosforado, em Ratos Wistar. *UNICIÊNCIAS*, v. 18, n. 2, p. 103-109, Dez. 2014.

JOKANOVI, C. M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol Lett.*, 190(2): 107-115, 2009.

KARAMI-MOHAJERI, S.; HADIAN, M. R.; FOULADDEL, S.; AZIZI, E. GHAHRAMANI MH, HOSSEINI R, et al. Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. *Hum Exp Toxicol.*, 33(3): 251-263, 2014.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress *Curr Gastroenterol Rep.*, 12: 319–330, 2010.

LARSEN, B. K.; NAJLE, R. A.; LIFSCHITZ, B. A.; VIRKEL, G. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental toxicology and pharmacology*. 34, 811-818, 2012.

LIEVIN-LE, M. O. A. L. V.; SERVIN, A. L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev.*, 19:315–337, 2006.

McLAUGHLIN, J.; PADFIELD, P. J.; BURT, J. P.; O'NEILL, C. A. Ochratoxin A increases permeability through tight junctions by removal of specific claudin isoforms. *Am J Phys Cell Phys* 287(5):C1412–C1417, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (MS). FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Controle de vetores: Procedimentos de segurança. Brasília, 2001.

ODA, J. Y.; BELÉM, M. O.; CARLOS, T. M.; GOUVEIA, R.; LUCHETTI, B. F. C.; MOREIRA, N. M.; MASSOCATTO, C. L.; ARAÚJO, S. M.; SANT ANA, D. M. G.; BUTTOW, N. C.; PINGE-FILHO, P.; ARAÚJO, E. J. A. Papel neuroprotetor mioentérico da aspirina em infecções experimentais agudas e crônicas com *Trypanosoma cruzi*. *Neurogastroenterol Motil.*, 29 (10): 1-13, 2017.

OLSSON, C.; HOLMGREN, S. The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 128, 481-503, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Brasil. Folha Informativa. Dengue e Dengue Grave. 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5963:folha-informativa-dengue-e-dengue-grave&Itemid=812>. Acesso em: 21 jan. 2021.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.*, 87(1): 315-424, 2007.

PINTON, P.; NOUGAYREDE, J. P.; DEL RIO, J. C. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 237(1): 41–48, 2009.

POSSAMAI, F. P.; FORTUNATO, J. J. ; FEIER, G.; AGOSTINHO, F. R.; QUEVEDO, J. ; WILHELM FILHO, D.; DAL-PIZZOL, F. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 23(2):198-204, 2007.

RAZARIKA, R. Neurotoxic Effect of Malathion on the Heteropneustes Fossilis. LAP Lambert Academic Publishing, 2012.

SALVI, R. M.; LARA, D. R.; GHISOLFI, E. S. et al. Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Sci*, 72:267–271, 2003.

SUN, Y.; ZHANG, J.; SONG, W.; SHAN, A. Vitamin E alleviates phoxim-induced toxic effects on intestinal oxidative stress, barrier function, and morphological changes in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018.

SHARMA, S.; KAUR, K. DHALLA, A. S. Toxicological Effects of Methyl Parathion and Protection Afforded by Ascorbic Acid in Small Intestine of Swiss Albino Mice: A Histological and Histometric Study. *J Life Sci*, 3(2): 121-126, 2011.

TERRY JR, A. V. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134:355–365, 2012.

TRAILOVIĆ, S. M.; MARJANOVIĆ, D. S.; UZELAC, T. V.; MILOVANOVIĆ, M.; TRAILOVIĆ, J. N. Two opposite dose-dependent effects of diazinon on the motor activity of the rat ileum. *Research in Veterinary Science*, 2017.

UMETSU, N.; Mallipudi, N. M.; TOIA, R. F.; MARCH, R. B.; FUKUTO, T. R. Toxicological properties of phosphorothioate and related esters present as impurities in technical organophosphorus insecticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 7:3-4, 481-497, 2009.

VINHAL, D. C.; SOARES, V. H. C. Organophosphates intoxication: A literature review. *Revista Científica FacMais*, v.XIV, n. 3., 2018.

VISMAYA, P. S. R. Oral exposure to the organophosphorus insecticide, Monocrotophos induces intestinal dysfunction in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 71, 236–243, 2014.(a)

VISMAYA, P. S. R. Exacerbation of intestinal brush border enzyme activities and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by monocrotophos. *Chemical- Biological Interactions*. 211, 11-19p, 2014. (b)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet, [S.I.], n. 117, 2002. Disponível em: <<https://apps.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>>. Acesso em: 12 jan. 2021.

XIA, X., ZHENG, D., ZHONG, H., QIN, B., GURR, G.M., VASSEUR, L., LIN, H., BAI, J., HE, W., YOU, M. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS One* 8, e68852, 2013.

YAMAGUCHI, F. M. M.; PRATES, K. V.; MATHIAS, P. C. F. Efeitos Metabólicos Do Organofosforado Acefato Durante a vida Perinatal em Prole Fêmeas. 26º Encontro Anual de Iniciação Científica. Universidade Estadual de Maringá. UEM, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. QUÍMICA NOVA, 21(6), 1998.

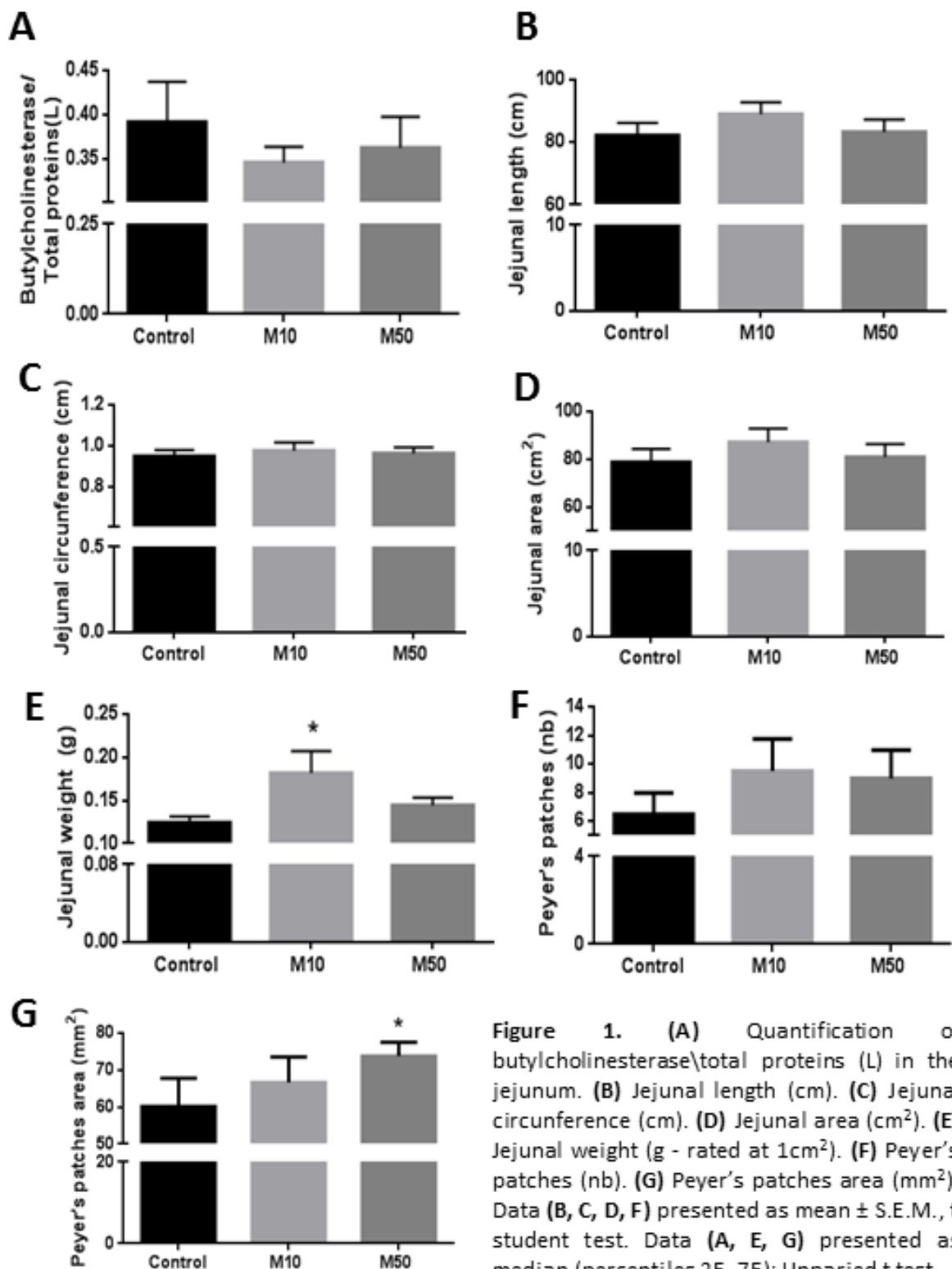
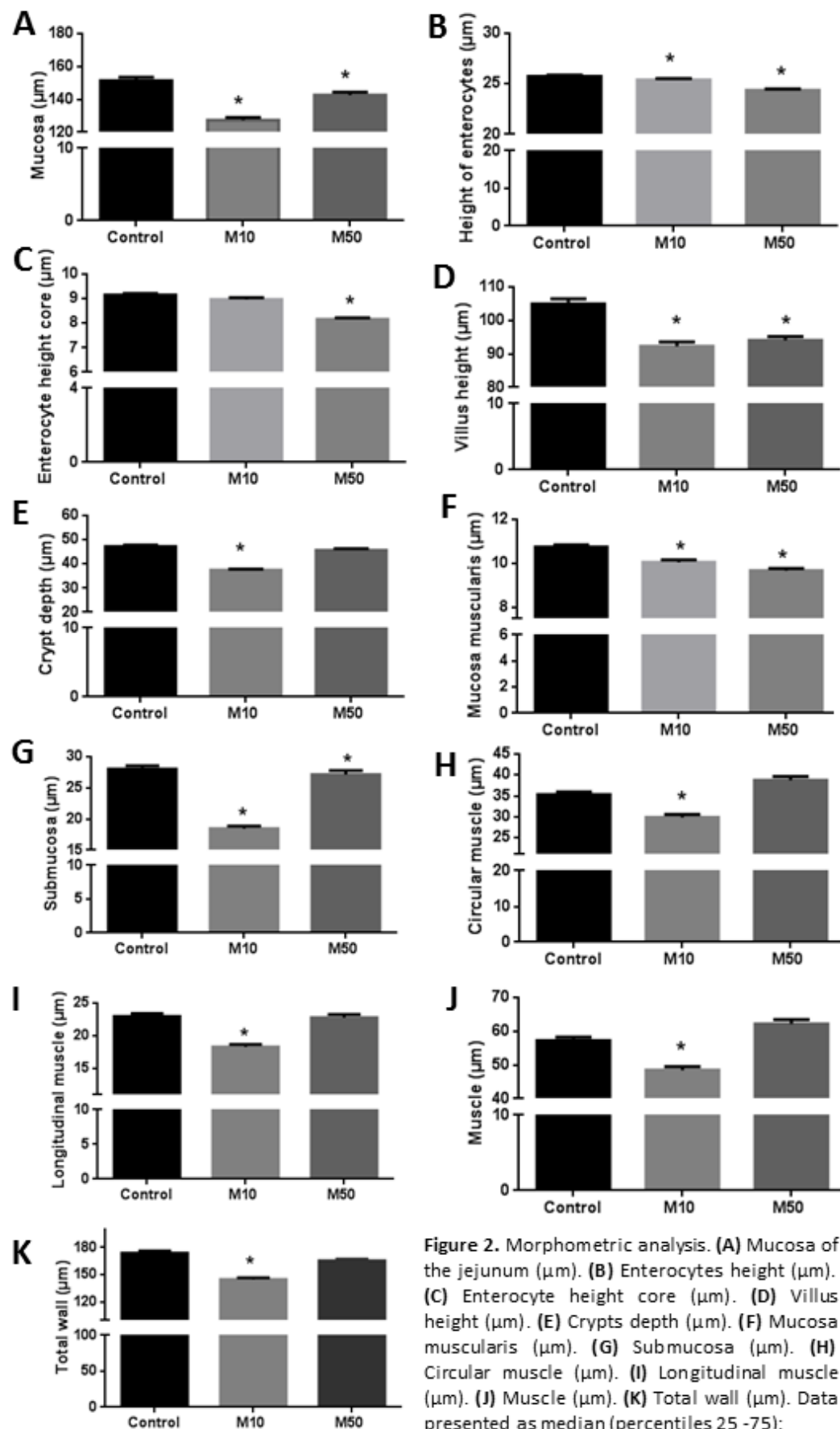


Figure 1. (A) Quantification of butylcholinesterase/total proteins (L) in the jejunum. (B) Jejunal length (cm). (C) Jejunal circumference (cm). (D) Jejunal area (cm²). (E) Jejunal weight (g - rated at 1cm²). (F) Peyer's patches (nb). (G) Peyer's patches area (mm²). Data (B, C, D, F) presented as mean \pm S.E.M., t student test. Data (A, E, G) presented as median (percentiles 25-75); Unpaired t test -

Mann Withney, n= 10 per group. *Significant difference, p < 0.05 of treatments in relation to the control group.

Table 1. Evaluation of food and related parameters. Feed consumption/day (g). Faecal weight / pellet number (g). Dried faecal weight / pellet number (g). Degree of digestibility (%). Delta weight (g). Retroperitoneal fat (g). Data with normal distribution were presented as mean \pm S.E.M. Data with non-normal distribution were presented as median (25-75% percentiles). *Significant difference, $p < 0.05$, of treatments in relation to the control group

Parameter	Control	M10	M50
Feed consumption/day (g)	17.50 (14.50 ; 19.00)	17.75 (16.00 ; 19.13)	18.50 (16.38 ; 19.50) *
Faecal weight / pellet number (g)	6.247 (5.332 ; 7.576)	6.967 (5.613 ; 8.520) *	7.379 (6.150 ; 9.199) *
Dried faecal weight / pellet number (g)	3.387 \pm 0.79	3.822 \pm 0.82 *	4.119 \pm 0.79 *
Degree of digestibility (%)	18.50 (15.75 ; 27.25)	20.00 (18.00 ; 23.00)	23.00 (19.75 ; 24.25)
Delta weight (g)	168.2 \pm 35.54	193.1 \pm 29.25 *	196.7 \pm 22.46 *
Retroperitoneal fat (g)	1.075 \pm 0.51	1.722 \pm 0.85	1.583 \pm 0.53



Unpaired t test – Mann Whitney test, n = 6 per group. *Significant difference, $p < 0.05$, of treatments in relation to the control group.

Table 2. Quantification of cells in the jejunum wall. Intraepithelial lymphocytes (nb) in the mucosa. PAS⁺ Globet cells (nb), AB 1.0⁺ Globet cells (nb), AB 2.5⁺ Globet cells (nb) and number of mitosis figures per crypt. Longitudinal muscle: core (nb/mm²) and Circular muscle: core (nb/mm²) in the muscle. Data with normal distribution were presented as mean \pm S.E.M. Data with non-normal distribution were presented as median (25-75% percentiles). *Significant difference, $p < 0.05$, of treatments in relation to the control group.

Parameter	Control	M10	M50
Intraepithelial lymphocytes(nb)	26.00 (22.00 ; 31.00) *	18.00 (15.25 ; 21.50) *	18.50 (15.00 ; 21.75) *
PAS+ Globet cells(nb)	13.00 (11;00 ; 14.00)	10.50 (9,25 ; 12.00) *	10.00 (9.00 ; 11.00) *
AB 1.0+ Globet cells (nb)	14.00 (13.25 ; 15.00)	12.00 (11.00 ;13.00) *	11.00 (9.25 ; 11.75) *
AB 2.5+ Globet cells (nb)	14.00 (3.00 ; 15.00)	10.00 (9.00 ; 11.75) *	11.00 (9.25 ; 12.00)
Number of mitosis figures (crypt)	3.0 (2.0 ; 4.0)	4.0 (3.0 ; 5.0) *	5.0 (4.0 ; 6.0) *
Longitudinal muscle: core (nb/mm ²)	3640 \pm 703.9	5034 \pm 1161 *	4282 \pm 5034
Circular muscle: core (nb/mm ²)	14065 \pm 2617	19291 \pm 6140	12396 \pm 1893

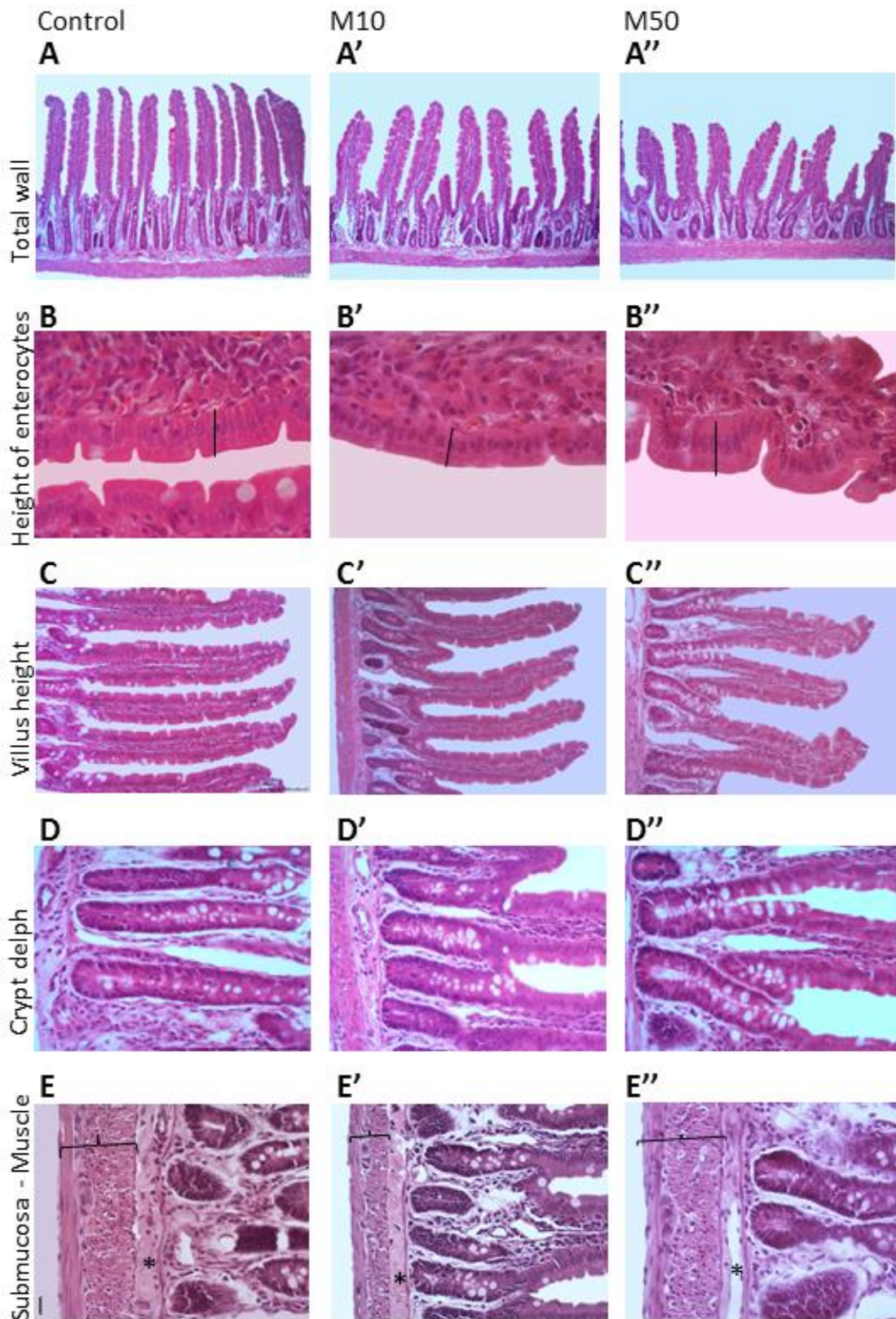


Figure 3. **A.** Total wall in control, **A'**. M10, and **A''**. M50. **B.** Enterocytes height in the control, **B'** M10, and **B''** M50. **C.** Villus height in the control, **C'**. M10, and **C''**. M50. **D.** Crypt depth in the control, **D'**. M10, and **D''**. M50. **E.** Submucosa and muscle in the control, **E'**. M10, and **E''**. M50. *represented submucosa and key represented the muscle.

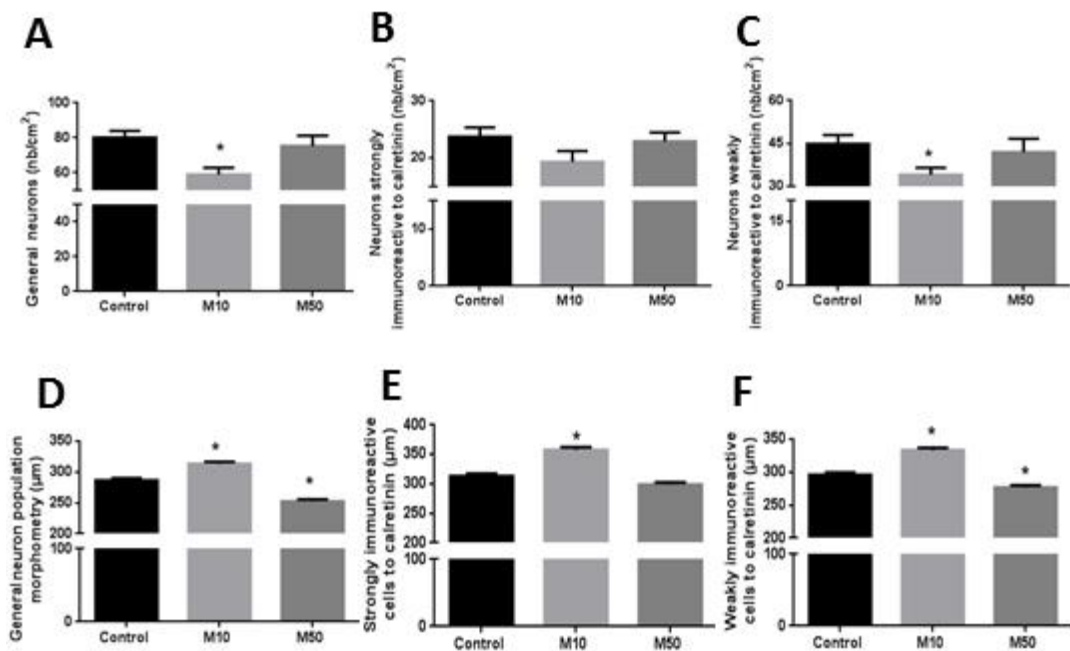


Figure 4. Submucous plexus. (A) General neurons (nb/cm²). (B) Neurons strongly immunoreactive to calretinin (nb/cm²). (C) Neurons weakly immunoreactive to calretinin (nb/cm²). (D) General neuron population morphometry (µm). (E) Strongly immunoreactive cells to calretinin (µm). (F) Weakly immunoreactive cells to calretinin (µm). Data (A, B,C) presented as mean ± S.E.M., t Student test. Data (D,E,F) presented as median (percentiles 25 -75), Unpaired t test - Mann Whitney test, n= 5 per group. *Significant difference, p <0.05 of treatments in relation to the control group.

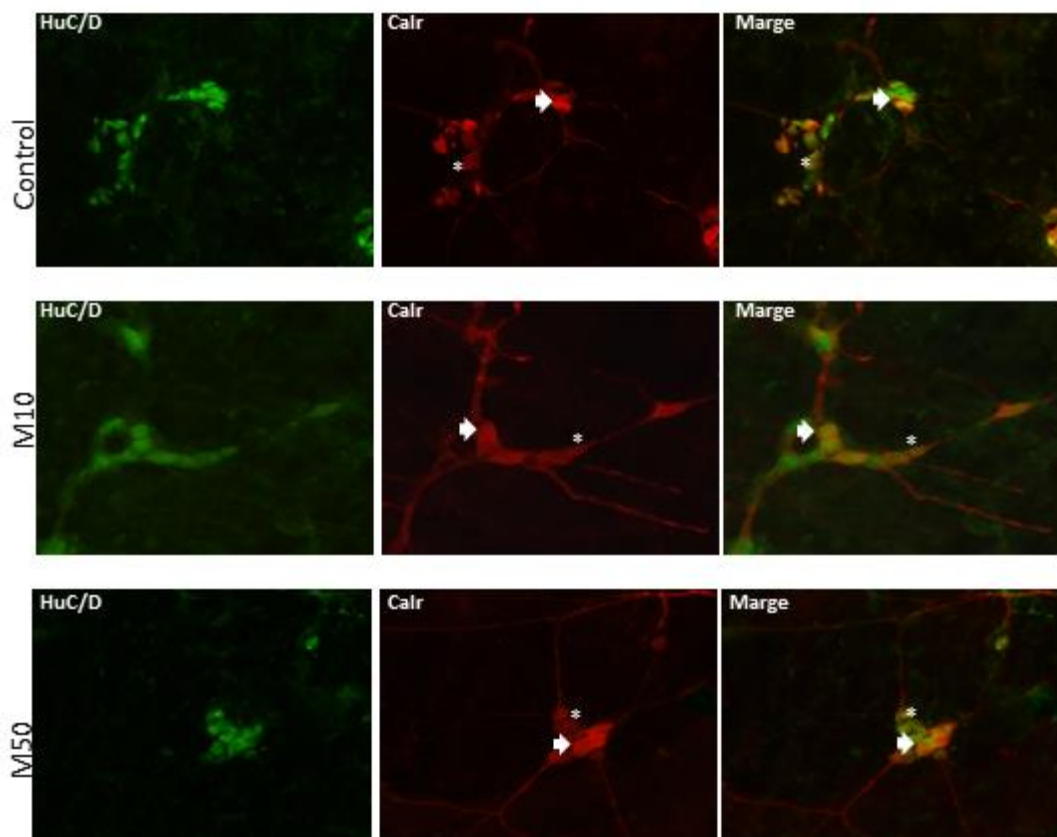


Figure 5. Immunofluorescence photomicrographs of the submucosal plexus. General neurons – HuC/D. White arrow - Neurons strongly immunoreactive to calretinin and asterisk - Neurons weakly immunoreactive to calretinin. Increase of 200x.

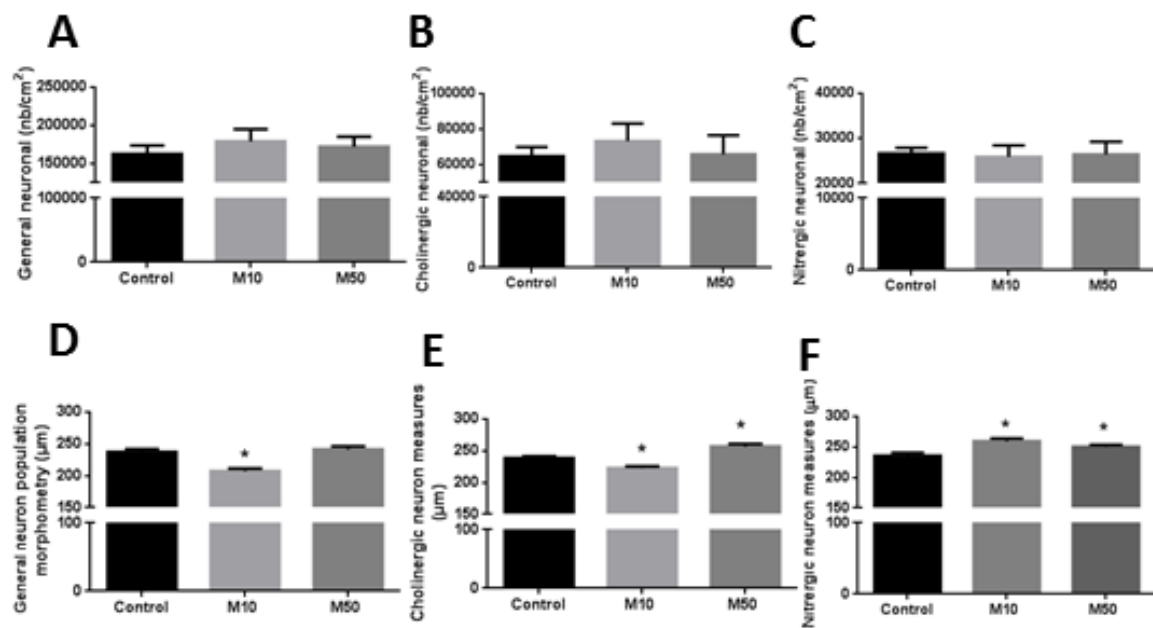


Figure 6. Myenteric plexus. **(A)** General neuronal (nb/cm²). **(B)** Cholinergic neuronal (nb/cm²). **(C)** Nitrenergic neuronal (nb/cm²). **(D)** General neuron population morphometry (µm). **(E)** Cholinergic neuron measures (µm). **(F)** Nitrenergic neuron measures (µm). Data **(A,B,C)** presented as mean \pm S.E.M., t Student test. Data **(D,E,F)** presented as median (percentiles 25 -75), Unpaired t test - Mann Whitney test, n= 5 per group. *Significant difference, p <0.05, of treatments in relation to the control group.

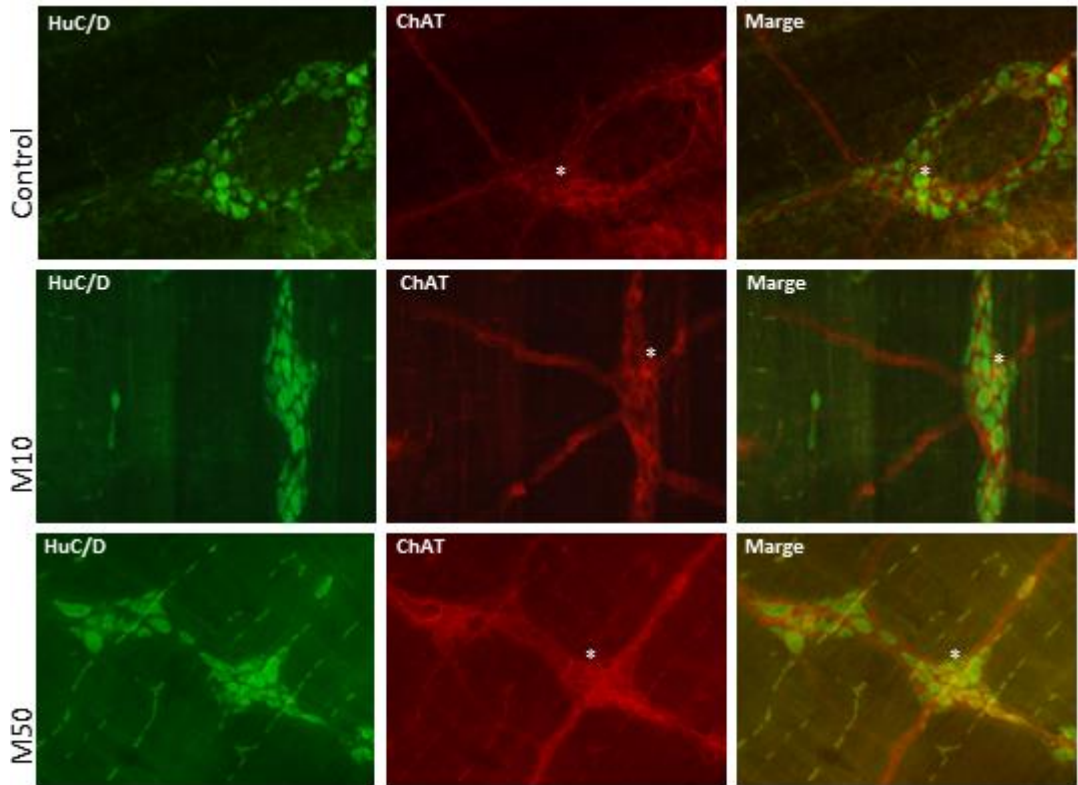


Figure 7. Immunofluorescence photomicrographs of the myoenteric plexus. **A.** General neurons – HuC/D. Asterisk - Immunoreactive neurons for ChAT (Cholinergics). Increase of 200x.

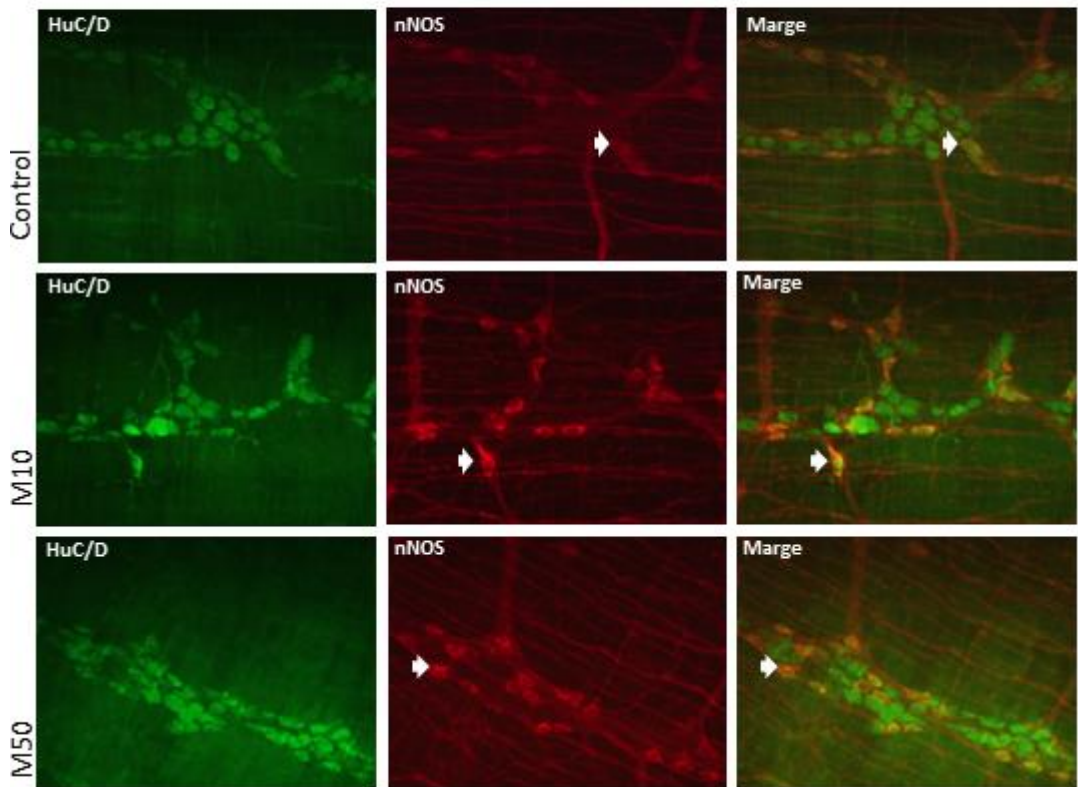


Figure 7B. B. General neurons – HuC/D. White arrow - Immunoreactive neurons for nNOS (Nitregics). Increase of 200x.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a hipótese que a exposição oral a baixas doses de malation por vários dias consecutivos causa modificações na estrutura morfológica da parede do jejuno, incluindo os componentes neuronais de sua inervação intrínseca, como parte do processo de adaptação de indivíduos a agressão cumulativa causada por pequenas quantidades deste pesticida, conclui-se que essa exposição:

1. Não reduziu a atividade da enzima butilcolinesterase na parede jejunal de ratos expostos de ambos os grupos.

2. Não causou alterações macroscópicas na parede jejunal de ratos expostos de ambos os grupos.

3. Aumentou a massa bruta e seca dos peletes fecais de ratos expostos a ambas as doses.

4. Causou atrofia nas camadas, mucosa, tela submucosa e camada muscular da parede do jejuno de ratos expostos à dose de 10mg/kg, com depleção de células calciformes PAS⁺, AB1.0⁺ e AB2.5⁺ e linfócitos intraepiteliais, além de aumento no número de figura de mitoses nas criptas. Atrofia também foi a alteração observada na camada mucosa e na tela submucosa da parede de ratos expostos a dose de 50mg/kg, com depleção de células calciformes PAS⁺, AB1.0⁺ e linfócitos intraepiteliais, além de aumento no número de figura de mitoses nas criptas.

5. Causou redução do número de neurônios da população total e subpopulação fracamente marcada para calretinina, além de hipertrofia destas populações juntamente com a subpopulação fortemente marcada para calretinina no plexo submucoso de ratos expostos a dose de 10mg/kg e atrofia na população geral e subpopulação fracamente marcada para calretinina em ratos expostos a dose de 50mg/kg.

6. Causou atrofia de neurônios colinérgicos no plexo mioentérico de ratos expostos a ambas as doses e hipertrofia de corpos de neurônios nitrérgicos de ratos expostos a ambas as doses.

A dose de 10mg/kg de malation foi a menor dose avaliada mostrando maior número de alterações na parede do jejuno, aliada a depleção de células como caliciformes e linfócitos intraepiteliais e aumento do número de figuras de mitose nas criptas, o que pode indicar uma demanda maior na renovação das células epiteliais dos vilos. Também foi observado aumento da massa corpórea dos animais, sem aumento do consumo de ração. A população e subpopulações neuronais também foram alteradas levando a atrofia e hipertrofia, dependendo da subpopulação, tanto em plexo submucoso, quanto em mioentérico.

Na maior dose avaliada, 50mg/kg as alterações na parede do jejuno foram menos incidentes, mas com semelhança na depleção celular observada na menor dose. Respostas bastante semelhante foram observadas em relação à população e subpopulações de neurônios do plexo submucoso e mioentérico, o que permite demonstrar que mesmo frente a tais alterações, não ocorreram danos ao funcionamento do jejuno, mantendo as funções comuns ao órgão, digestão e absorção de nutrientes, sem causar alterações no crescimento dos animais.

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UUEL) protocolo nº137/2016 e processo 12305.2016.65



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 da 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 2,5%, 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 80º 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 30/06/2019
Espécie/Inhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	75
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, subscrevo, cordialmente.


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

Ilma. 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