



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA - TRINDADE
CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC
TELEFONE (048) 3721-4617
e-mail: pmpg@contato.ufsc.br – www.pmpg.ufsc.br

MACIEL ALENCAR BRUXEL

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE
GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS
METABÓLICOS NO PÓS-TERMO EM RATAS E PROLE**

Florianópolis,

Janeiro de 2021

MACIEL ALENCAR BRUXEL

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE
GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS
METABÓLICOS NO PÓS-TERMO EM RATAS E PROLE**

Tese de Doutorado, submetido ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Linha de pesquisa: Fisiologia Endócrina

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Florianópolis,

Janeiro de 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bruxel, Maciel Alencar

Impacto da exposição ao Malathion sobre a homeostase glicêmica durante a gestação e seus desfechos metabólicos nopós-termo em ratas e prole / Maciel Alencar Bruxel; orientador, Alex Rafacho, 2021. 174 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de PósGraduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Fisiológicas. 2. Agrotóxicos. 3. Fator de risco. 4. Diabetes. 5. Gestação. I. Rafacho, Alex. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. III. Título.

Maciel Alencar Bruxel

**IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE
GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS METABÓLICOS NO
PÓS-TERMO EM RATAS E PROLE**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Dr.(a)

Universidade de São Paulo - USP

Prof. Rubens Onofre Nodari, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Fernanda Barbosa Lima, Dr.(a)

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de **Doutor em Fisiologia**.

Prof.(a) Fernanda Barbosa Lima, Dr.(a)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alex Rafacho, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021.

DEDICATÓRIA

"Eu não tenho outro vestido, com exceção do que uso diariamente. Se você vai ser gentil o suficiente para me dar outro, faço questão de ele ser prático e escuro para que eu possa colocá-lo depois para ir ao laboratório."*

Marie Curie

*A todas as mulheres que dedicam suas vidas a fazer ciência, a todos os cientistas que acreditam e fazem do mundo um lugar melhor através do fruto de seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha família: pelo apoio e incentivo constante dando suporte emocional e acima de tudo pelo acolhimento devoto;

A meu orientador: pelos ensinamentos e incentivo, por ser sempre solícito e extremamente diligente com o trabalho;

Aos parceiros: Flávia Natividade da Silva pela dedicação no monitoramento das proles e acompanhamento de todo o projeto;

Rodrigo Augusto da Silva pelo esmero nas análises epigenômicas;

LAMEB: Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e membros do corpo técnico pela disponibilidade de equipamentos e acessoria no uso;

Aos colegas de trabalho: Priscila Laiz Zimath pelo auxílio em todos os experimentos;

Milena dos Santos Almeida pelas colaborações nos experimentos;

Cinthia Rejane Corrêa pelas colaborações nos experimentos;

Felipe Azevedo Gomes pelo auxílio e cuidado com os pilotos;

Aos companheiros de laboratório: Katia Motta; Francielle Batista Duarte Ferreira; Júlia Spanhol da Silva; Carolina Ruoso; Cristiane dos Santos; Amanda Marreiro Barbosa; Henver Simionato Brunetta; Thayz Rodrigues Chagas; Ana Paula Dambros Taschetto; Renata Silvério Deluca; Matheus Henrique Besen; José Rodrigo Nascimento Martins; Thais Alves do Amaral; Guilherme Durante Cruz; Danilo Francisco da Silva Marçal; Robson Bart; Francieli Caroline de Ramos; Kamila Blaka; Liana Conrado França; Natália Stingham Tonet, pelo convívio agradável e o abençoado café;

Aos vizinhos de laboratório: Flaviano Lorenzon, Tamires Gregorio e Sara Pereira Braga pela inigualável amizade;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas;

O meu MUITO OBRIGADO a todos!

APOIO FINANCEIRO

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC: disponibilização de animais através do biotério central, de insumos (ração e maravalha) e logística de limpeza;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES: concessão da bolsa de estudo;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq: financiamento parcial dos estudos por meio do processo 428023/2018-5;

Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas – LIDoC: disponibilização de reagentes e insumos para execução dos experimentos;

Resumo:

Os inseticidas organofosforados (OPs), entre eles o Malathion, estão entre os pesticidas mais empregados no mundo e há evidências que relacionam a exposição aos OPs com o desenvolvimento de doenças metabólicas, incluindo o diabetes *mellitus* e a obesidade. No entanto, não há estudos pré-clínicos avaliando se os OPs podem atuar como um fator de risco para o diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Assim, hipotetizamos que a exposição subcrônica ao pesticida Malathion pela via oral, no período periconcepcional, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de DMG. Para isso, ratas Wistar foram alocadas em 2 grupos e expostas diariamente por 21 dias consecutivos com Malathion na dose de 14 mg/Kg ou 140 mg/Kg de massa corpórea (m.c.) por administração intragástrica. O óleo de milho foi utilizado como veículo em um terceiro grupo controle (1 ml/Kg, m.c.). Subgrupos foram definidos com base na ausência (nulíparas) ou presença (gestantes) de plugue copulatório ou se seguiram por um período adicional de 2 meses após o termo (pós-termo), sem a continuidade do tratamento com o OP. Os fetos e a prole adulta de machos e fêmeas também foram avaliados. O estudo também foi composto por um desenho experimental adicional em que o Malathion foi administrado na dose de 0,1 mg/Kg m.c. A exposição ao Malathion não afetou a tolerância à glicose em ratas nulíparas, mas resultou em intolerância à glicose nas ratas prenhes de maneira dose-dependente, que permaneceu comprometida nos 2 meses seguintes ao parto em ratas tratadas com ambas as doses do OP, incluindo na menor dose avaliada (0,1 mg/Kg). A intolerância à glicose na gestação não esteve acompanhada de alterações na massa de células β pancreáticas, mas à menor secreção de insulina *in vivo*. As proles oriundas de progenitoras tratadas com o OP também exibiram intolerância à glicose, sendo mais pronunciada nas proles fêmeas. A intolerância à glicose na prole também não se deu em paralelo à alterações na massa de ilhotas pancreáticas, mas sim ao aumento do padrão de metilação global no fígado, especialmente nas proles oriundas das progenitoras com maiores exposições ao OP (14 e 140 mg/Kg). O tratamento com o Malathion afetou a função hepática, o perfil de células sanguíneas (leucócitos), a adiposidade, valores circulantes de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL) na gestação, e tais alterações persistiram até o período pós-termo. As proles também apresentaram maiores valores da aspartato aminotransferase, independente do grau em que a progenitora foi exposta ao Malathion. A atividade da enzima ChE foi atenuada de maneira dose-dependente pelo tratamento com o OPs, mas permaneceu inalterada durante a gestação ou em qualquer contexto na dose de 0,1 mg/Kg, m.c. Em conclusão, a exposição ao OP Malathion no período periconcepcional causa intolerância à glicose durante a gravidez, compatível com o DMG em humanos, e mantém-se persistente no pós-termo. A exposição periconcepcional ao Malathion também afeta a tolerância à glicose nas proles adultas. Considerando que a massa de pâncreas endócrino está inalterada e que demonstramos maior metilação global no fígado, é possível que alterações na função pancreática e hepática contribuam para a intolerância à glicose. Assim, a exposição silenciosa, acidental ou laboral ao Malathion, de forma subcrônica, atua como potencial fator de risco para o desenvolvimento de DMG bem como para desfechos metabólicos na vida tardia da prole. Esses dados destacam a importância de mais pesquisas sobre o impacto dos OPs sobre o metabolismo geral e seus desfechos em populações mais expostas.

Palavras-chave: Inseticidas; Organofosforado; Malathion, Fator de Risco, Diabetes; Hiperglicemia; Gestação.

Abstract:

Organophosphate insecticides (OPs), including Malathion, are among the most widely used pesticides in the world and there is evidence that links exposure to OPs with the development of metabolic diseases, including diabetes *mellitus* and obesity. However, there are no preclinical studies evaluating whether OPs can act as a risk factor for gestational diabetes *mellitus* (GDM). Thus, we hypothesized that subchronic oral exposure to the pesticide Malathion, in the periconceptual period, may be a risk factor for the development of GDM. For that, Wistar rats were allocated in 2 groups and exposed daily for 21 consecutive days with Malathion at a dose of 14 mg/kg or 140 mg/kg of body mass (b.m.) by intragastric administration. Corn oil was used as a vehicle in a third control group (1 ml/Kg, b.m.). Subgroups were defined based on the absence (nulliparous) or presence (pregnant) of a copulatory plug or followed by an additional period of 2 months after the term (post-term), without continuing treatment with OP. Fetuses and adult offspring of males and females were also evaluated. The study also included an additional experimental design with rats exposed to Malathion at a dose of 0.1 mg/kg b.m. Exposure to Malathion did not affect glucose tolerance in nulliparous rats, but resulted in glucose intolerance in pregnant rats in a dose-dependent manner, which remained compromised for the 2 months following delivery in rats treated with both doses of OP, including lowest evaluated dose (0.1 mg/kg). Glucose intolerance during pregnancy was not accompanied by changes in the mass of pancreatic β cells, but by lower insulin secretion *in vivo*. Offspring from progenitors treated with OP also exhibited glucose intolerance, being more pronounced in female offspring. Glucose intolerance in the offspring also did not occur in parallel with changes in the mass of pancreatic islets, but with the increase in the overall methylation pattern in the liver, especially in the offspring from the parents with greater exposure to OP (14 and 140 mg/Kg). Malathion exposure affected liver function, blood cell profile (leukocytes), adiposity, circulating triglyceride values, total cholesterol and fractions (HDL, LDL and VLDL) during pregnancy, such changes persisted until the post-term period. The offspring also showed higher values of aspartate aminotransferase, regardless of the degree to which the parent was exposed to Malathion. The activity of the ChE enzyme was attenuated in a dose-dependent manner by treatment with OPs, but remained unchanged during pregnancy or in any context at a dose of 0.1 mg/kg, b.m. In conclusion, exposure to OP Malathion in the periconceptual period causes glucose intolerance during pregnancy, compatible with GDM in humans, and remains persistent in the post-term period. Periconceptual exposure to Malathion also affects glucose tolerance in adult offspring. Considering that the mass of the endocrine pancreas is unchanged and that we demonstrate greater overall methylation in the liver, it is possible that changes in pancreatic and liver function contribute to glucose intolerance. Thus, silent, accidental or occupational exposure to Malathion, in a subchronic manner, acts as a potential risk factor for the development of GDM as well as for metabolic outcomes in the late life of the offspring. These data highlight the importance of further research on the impact of OPs on general metabolism and its outcomes in more exposed populations.

Keywords: Insecticides; Organophosphate; Malathion, Risk Factor, Diabetes; Hyperglycemia; Gestation.

Lista de Figuras:

Figura 1: Súmula de dados dos testes de formulações do Malathion	49
Figura 2: Súmula de dados da definição das doses do Malathion	52
Figura 3: Alterações murinométricas de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion	55
Figura 4: Níveis glicose sanguínea durante o teste de sobrecarga de glicose em ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion	57
Figura 5: Atividade enzimática da ChE e concentrações de insulina em jejum e no estado alimentado de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion	60
Figura 6: Análise quantitativa por imunofluorescência das células beta pancreática, em Gestantes e no Pós-termo, em pâncreas de ratas expostas ao Malathion	62
Figura 7: Determinação das concentrações plasmática de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), de ratas expostas ao Malathion	65
Figura 8: Avaliação da função renal e hepática pelas concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética – TGO e transaminase glutâmico pirúvica- TGP, de ratas expostas ao Malathion	68
Figura 9: Avaliação qualitativa da morfologia hepática de ratas expostas ao Malathion	70
Figura 10: Avaliação qualitativa de células brancas sanguíneas (leucócitos) de ratas expostas ao Malathion	75
Figura 11: Massa corporal, glicose sanguínea e sua correlação em fetos de ratas expostas ao Malathion	77
Figura 12: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, triglicérides, colesterol total, função hepática e estresse oxidativo) da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion	80
Figura 13: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, triglicérides, colesterol total, função hepática e estresse oxidativo) da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion	83
Figura 14: Avaliação qualitativa da morfologia hepática e pancreática e avaliação quantitativa da massa de células β da prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion	86
Figura 15: Perfil epigênomico de progenitores (machos) de ratas expostas ao Malathion	89
Figura 16: Perfil epigênomico de progenitores (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion	92
Figura 17: Alterações murinométricas de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion	95

Figura 18: Níveis de glicose sanguínea durante o teste de sobrecarga de glicose em ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion em dose ultra baixa	97
Figura 19: Atividade enzimática da ChE e concentrações de insulina no estado alimentado de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion em dose ultra baixa	99
Figura 20: Determinação das concentrações plasmática de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	101
Figura 21: Avaliação da função renal e hepática pelas concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética – TGO e transaminase glutâmico pirúvica- TGP, de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	104
Figura 22: Massa corporal, glicose sanguínea e sua correlação em fetos (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	106
Figura 23: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, resposta a sobrecarga de glicose (ipGTT), resposta a insulina (ipITT), triglicérides, colesterol total e função hepática) da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	109
Figura 24: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, resposta a sobrecarga de glicose (ipGTT), resposta a insulina (ipITT), triglicérides, colesterol total e função hepática) da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	112
Figura 25: Avaliação qualitativa da morfologia hepática e pancreática e avaliação quantitativa da massa de células β da prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	115
Figura 26: Perfil epigenômico de progenitores (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	118
Figura 27: Perfil epigenômico de progenitores (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	121

Lista de Quadros e Tabelas:

Quadro 1: Principais agrotóxicos empregados mundialmente de acordo com o tipo de praga e grupo químico que pertencem	7
Quadro 2: Nova classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana segundo a ANVISA	8
Quadro 3: Histórico dos marcos Legais do uso de agrotóxicos no Brasil	10
Quadro 4: Organograma do desenho experimental de <i>Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG</i>	38
Quadro 5: Organograma do desenho experimental de <i>Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG</i>	39
Quadro 6: Representação gráfica da localização cromossômica e fragmento amplificado	49
Quadro 7: Sumário das principais alterações quantitativas das progenitoras expostas ao Malathion vs Controle	128
Quadro 8: Sumário das principais alterações quantitativas dos fetos e prole (machos e fêmeas) de progenitoras expostas ao Malathion, comparação vs Controle	129
Tabela 1: Sequência de Primers utilizado para determinação da Expressão Gênica	51
Tabela 2: Perfil de células hematológicas (análise quantitativa) de ratas expostas ao Malathion.....	78

Lista de Abreviaturas e Siglas:

2,4 D.....(2,4 diclorofenoxiacético)	DM1.....(diabetes <i>mellitus</i> tipo1)
2,4,5 T.....(2,4,5 triclorofenoxiacético)	DM2.....(diabetes <i>mellitus</i> tipo2)
ACh.....(acetilcolina)	DMG.....(diabetes <i>mellitus</i> gestacional)
AChE.....(acetilcolinesterase)	DNMT.....(DNA metiltransferase)
ALT-TGP.....(alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica)	DNOC.....(dinitro-ortho-cresol)
anti-GAD.....(autoanticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico)	DPT.....(dia pós-termo)
ANVISA.....(agência nacional de vigilância sanitária)	EROs.....(espécies reativas de oxigênio)
AST-TGO.....(aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética)	FAO.....(organização das nações unidas para alimentação e agricultura)
AUC.....(área sob a curva)	FOXO1.....(proteína garfo rabdiossarcoma O1)
BHC.....(hexaclorobenzeno)	gDNA.....(ácido desoxirribunocleico genômico)
cDNA.....(ácido desoxirribunocleico complementar)	GLP-1.....(peptídio-1 tipo glucagon)
CEUA.....(comitê de ética no uso de animais)	GRAN.....(granulócitos)
ChE.....(colinesterase)	GTT.....(teste oral de tolerância a glicose)
CIOMS.....(conselho internacional para organização das ciências médicas)	HCT.....(hematócrito)
CONAMA.....(conselho nacional do meio ambiente)	HDL.....(lipoproteína de densidade alta)
D-140.....(Malathion 140mg/Kg)	HGB.....(hemoglobina)
D-70.....(Malathion 70mg/Kg)	HOMA-IR.....(modelo de avaliação da homeostase-resistência à insulina)
DBCA.....(diretriz brasileira de cuidados com os animais)	IAA.....(autoanticorpo anti-insulina)
DDT.....(dicloro-difenil-tricloroetano)	IC ₅₀(50% da concentração inibitória máxima)
DG.....(diabetes gestacional)	ICA.....(autoanticorpo citoplasmático anti-ilhota)
DG.....(dia de gestação)	IDF.....(federação internacional de diabetes)
DL.....(dose letal)	IL.....(interleucinas)
DL ₅₀(dose letal para 50% dos animais expostos)	IMC.....(índice de massa corporal)
DM.....(diabetes <i>mellitus</i>)	ipGTT.....(teste intraperitoneal de tolerância a glicose)

IUPAC.....(união internacional de química pura e aplicada)	OP.....(pesticida organofosforado)
^K ITT.....(constante de decaimento da insulina do teste de tolerância)	P.....(fósforo)
LDL.....(lipoproteína de densidade baixa)	ppm.....(partes por milhão)
LINE1.....(elemento transponível de classe I do DNA)	P=O.....(fosforila)
LYM.....(linfócitos)	P=S.....(tiofosforila)
m.c.....(massa corpórea)	P=SE.....(selenofosforila)
M-0,1.....(Malathion 0,1mg/Kg)	RBDC.....(concentração/distribuição de glóbulos vermelhos)
M-14.....(Malathion 14mg/Kg)	RDW.....(distribuição de glóbulos vermelhos)
M-140.....(Malathion 140mg/Kg)	RNA.....(ácido ribonucléico)
M-70.....(Malathion 70mg/Kg)	SBP.....(resmetrina)
MAPA.....(ministério da agricultura, pecuária e abastecimento)	SI.....(síndrome intermediária)
MCCH.....(concentração de hemoglobina corpuscular média)	SINDIVEG.....(sindicato nacional da indústria de produtos para defesa vegetal)
MCH.....(concentração corpuscular média)	SINITOX.....(sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas)
MCV.....(volume corpuscular médio)	TETs.....(desmetilase dez-onze proteína de translocação)
MODY.....(diabetes com início na maturidade de jovens)	TOTG.....(teste oral de tolerância à glicose)
MON.....(monócitos)	tto.....(tratamento)
MPV.....(volume plaquetário médio)	T4-BGP.....(enzima T4-β-glicosiltransferase)
mRNA.....(ácido ribonucleico mensageiro)	VLDL.....(lipoproteína de muito baixa densidade)
NDDP.....(grupo nacional de dados sobre diabetes)	WBC.....(concentração de glóbulos brancos)
OMS.....(organização mundial da saúde)	Znt8.....(anticorpo contra o transportador de zinco 8)

Sumário

1. Introdução:	5
2. Referencial Teórico:	7
2.1 Definição e Classificação dos agrotóxicos:	7
2.2 Usos de agrotóxicos no Brasil:	12
2.3 Agrotóxicos Organofosforados e Malathion:	18
2.4 Efeitos Colaterais dos Agrotóxicos Organofosforados:	20
2.5 Modelos Animais como Ferramenta para Avaliação de Desfechos por Intoxicação ou Exposição a Agrotóxicos:	22
2.6 Alterações Metabólicas pela Exposição aos Organofosforados (Malathion):	24
2.7 Classificações do Diabetes <i>mellitus</i> (tipo 1, 2 e gestacional):	26
2.8 Fatores de riscos para o Diabetes mellitus (gestacional):	29
2.9 Influências Pré-natal e Pós-natal no Metabolismo Adulto:	31
3. Objetivos Gerais:	35
3.1 Objetivos Específicos:	35
4. Material e Métodos:	37
4.1 Local de Execução do Projeto	37
4.2 Reservas Éticas	37
4.3 Tamanho Amostral	38
4.4 Animais	38
4.4.1 <i>Piloto 1: definição da formulação do Malathion</i>	38
4.4.2 <i>Piloto 2: definição das doses de Malathion Cheminova[®]</i>	39
4.4.3 <i>Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG</i>	40
4.4.4 <i>Exposição ao Malathion em dose ultra baixa: possível efeito como fator de risco no DMG</i>	41
4.4.4.1 Massa Corpórea	43
4.4.4.2 Glicemia	43
4.4.4.3 Teste de Tolerância a Glicose e Delta Glicêmico	43
4.4.4.4 Teste Intraperitoneal de Tolerância a Insulina	44
4.4.4.5 Eutanásia dos Animais e Descarte	44
4.4.4.7 Análise Hematológica	45
4.4.4.8 Insulinemia	45
4.4.4.9 Perfil Lipídico	46
4.4.4.10 Função Hepática	46
4.4.4.11 Função Renal	46
4.4.4.12 Inibição da Enzima Colinesterase	46
4.4.4.13 Estresse Oxidativo	47

4.4.4.14	Morfologia dos Tecidos Hepáticos e Pancreático e Imunohistoquímica	47
4.4.4.15	Metilação do DNA - Epigenômica	47
4.4.4.16	Expressão Gênica - Genômica	49
4.5	Análises Estatísticas	51
5.	Resultados:	52
5.1	Definição da formulação do agrotóxico Malathion (Piloto 1).....	52
5.2	Definições das doses para o estudo (Piloto 2).....	56
5.3	Alterações murinométricas causadas pela exposição ao Malathion.....	59
5.4	Malathion como um fator de risco para o DMG	61
5.5	Inibição da atividade da enzima ChE e níveis de Insulina em jejum e alimentado.....	64
5.6	Análises quantitativas da massa de células beta por imunofluorescência	66
5.7	Perfil lipídico: triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL).....	68
5.8	Avaliações das funções renal e hepática	72
5.9	Avaliação qualitativa da morfologia hepática (prancha histológica)	74
5.10	Perfil quantitativo de células sanguíneas de ratas expostas ao Malathion	77
5.11	Avaliações qualitativas das células sanguíneas (leucócitos) de fêmeas expostas ao Malathion	79
5.12	Alteração murinométrica (massa corporal) e metabólica (glicose sanguínea) apresentado pelos fetos (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion	81
5.13	Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion	84
5.14	Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion	87
5.14	Morfologia hepática, pancreática e determinação da massa de células β na prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion.....	90
5.15	Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion.....	93
5.16	Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion.....	96
5.17	Alterações murinométricas causadas pela exposição ao Malathion.....	99
5.18	Malathion em dose ultra baixa como um fator de risco para o DMG	101
5.19	Inibição da atividade da enzima ChE e níveis de Insulina no estado alimentado	104
5.20	Perfil lipídico na exposição ao agrotóxico em dose ultra baixa: triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL)	105
5.21	Avaliações das funções renal e hepática em ratas expostas a dose ultra baixa de Malathion	108
5.22	Alteração murinométrica (massa corporal) e metabólica (glicose sanguínea) apresentado pelos fetos (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathionem dose ultra baixa	110

5.23 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	113
5.24 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	116
5.25 Morfologia hepática, pancreática e determinação da massa de células β na prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa.....	119
5.26 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	122
5.27 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa	125
5.28 Resultados sumarizados dos principais parâmetros avaliados nas progenitoras expostas ao Malathion em comparação ao grupo Controle	128
5.29 Resultados sumarizados dos principais parâmetros avaliados nos fetos e na prole (machos e fêmeas) em comparação ao grupo Controle.....	129
6. Discussão:	130
7. Considerações:	145
8. Conclusão:.....	146
9. Referências:	147
10. Anexos:	158

1. Introdução:

A utilização maciça de agrotóxicos, em especial quando o controle da aplicação é débil, oferece sérios riscos ambientais (e.g., contaminação dos solos e das águas superficiais e subterrâneas), apresentando riscos de intoxicação humana pelo consumo de água e alimentos contaminados, assim como intoxicação ocupacional (Spadotto, 2004). Os pesticidas organofosforados (OPs) representam 50% dos agrotóxicos utilizados mundialmente (Lassiter & Brimijoin, 2008). O Malathion é um OP amplamente utilizado no Brasil em áreas rurais e urbanas (e.g., erradicações de insetos, controle do mosquito *Aedes aegypti*). É considerado altamente tóxico para mamíferos - classificação toxicológica - Classe I (ANVISA). Seu consumo, no período entre 1991 e 2001, passou de 1.850 para 7.627 toneladas cúbicas devido às políticas governamentais à agricultura e é um dos agrotóxicos que mais causa intoxicações no Brasil (Faria, 2007). Sua ação tóxica se deve a inibição da acetilcolinesterase: a hidrólise da acetilcolina é comprometida, levando à hiperestimulação dos receptores colinérgicos e sintomas característicos, (e.g., náusea, vômito, lacrimejamento, salivação, bradicardia) e finalmente a morte pode ocorrer por falência respiratória (Rusyniak & Nañagas, 2004). Já a exposição prolongada à OPs, por meio de doses baixas, caracteriza-se pelo surgimento tardio de sintomas, meses ou anos, normalmente envolvendo anormalidades neurocomportamentais (Salvi *et. al.*, 2003). À parte dos efeitos parassimpatomiméticos, os OPs parecem afetar a homeostase glicêmica e contribuir para um quadro de hiperglicemia (Rahimi & Abdollahi, 2007). Neste sentido, foi demonstrada uma correlação positiva entre a concentração sérica de Malathion, circunferência da cintura e resistência à insulina em agricultores não diabéticos (Raafat *et. al.*, 2012). A escalada na incidência/prevalência da obesidade e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) têm intrigado a comunidade científica que começou a considerar a influência dos fatores ambientais (e.g., disruptores endócrinos) em períodos críticos do desenvolvimento (e.g., período pré- e pós-natal). Insultos nestes períodos podem levar à reprogramação metabólica por meio de alterações epigenéticas que resultam em excesso de peso e disfunções cardiometabólicas, que se reflete em períodos tardios da vida e podem ser transmitidas às gerações subsequentes (Valvi *et. al.*, 2012). Alguns estudos epidemiológicos demonstraram associação entre exposição à pesticidas antes da gravidez e o desenvolvimento de diabetes mellitus gestacional (DMG) em mulheres moradoras de áreas agrícolas (Ledda *et. al.*, 2013). DMG é definido como qualquer nível de

intolerância a glicose, resultando em hiperglicemia de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Contudo, os desfechos da DMG nas gestantes, bem como em seus descendentes, não estão bem esclarecidos. Neste sentido, nosso trabalho buscou estabelecer se a exposição ao Malathion por um período que anteceda a fecundação (e.g., mimetizando a exposição ambiental) poderia ser considerado um potencial fator de risco para o desenvolvimento de DMG, bem como os desfechos metabólicos (e.g., homeostase glicêmica e lipídica) nas gestantes no período pós-parto e nas respectivas proles.

2. Referencial Teórico:

As discussões a cerca dos riscos reais que os agrotóxicos representam para as pessoas e o ambiente é um “cabo-de-guerra” entre ambientalistas, agricultores, grandes empresas e a população em geral, que defendem seus interesses, pesando os riscos e os benefícios dos efeitos no curto e longo prazo da sua utilização. O uso de qualquer agrotóxico, seja qual for sua finalidade, apresenta algum nível de risco. Os agrotóxicos são usados em torno de nossas casas, na indústria, na agricultura, no controle epidemiológico em saúde, entre outras aplicações, e estão presentes em plásticos, tintas (contendo fungicidas para evitar mofo), limpadores e desinfetantes de vaso sanitário (com a presença de fumegantes), *commodities* e produtos de mercearia embalados (protegidos da contaminação por insetos pelo uso controlado de inseticidas no processamento, instalações de fabricação e embalagem). Ainda, estes produtos são usados em distintos estabelecimentos para gerenciar insetos e roedores atraídos por alimentos estocados e/ou resíduos alimentares. A afirmação de que o uso adequado de pesticidas melhora nossa qualidade de vida, protege nossa propriedade e permite a produção de *commoditie*, é no mínimo controversa entre os defensores do uso dos agrotóxicos e os ambientalistas. Nós, enquanto cientistas na área biomédica, podemos contribuir procurando compreender o quanto o uso dos agrotóxicos representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças humanas.

2.1 Definição e Classificação dos agrotóxicos:

Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, conforme definido e descrito no Artigo 2º, Inciso I da Lei Federal nº 7.802, de 11 de Julho de 1989 (BRASIL, 1989), e Regulamentada pelo Decreto nº 4.074/02 (BRASIL, 2002). São produtos utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais. Sua utilização visa alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também são considerados agrotóxicos as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Segundo a Lei Federal e seu Decreto nº 4.074/02, tem como objeto ainda todos os componentes e afins, definindo: i) Componentes: "Os princípios ativos, os produtos técnicos, suas matérias primas, os ingredientes inertes e aditivos usados na fabricação de agrotóxicos e afins"; ii) Afins: "Os produtos e os agentes de processos físicos e biológicos que tenham a mesma finalidade dos agrotóxicos, bem como outros produtos químicos, físicos e biológicos, utilizados na defesa fitossanitária e ambiental, não enquadrados no inciso (BRASIL, 2002).

No Brasil, atualmente, são registrados mais de 3.000 tipos de produtos agrotóxicos, encontrados em inúmeras formulações, constituídas de cerca de 509 princípios ativos¹ (BRASIL, 2021). E os pedidos de novas liberações e suas respectivas aprovações pelo Ministério da Agricultura têm alcançado números recordes, para se ter uma idéia, em 2016 o número de novos registros de agrotóxicos foi de 277, em 2019 esse número chegou a 474 e em 2020, mesmo em plena pandemia (causada pelo vírus Sars-CoV-2), 493 novos registros de agrotóxicos foram autorizados e publicados no Diário Oficial da União (BRASIL, 2021). Dada a grande diversidade de produtos é importante conhecer a classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e ao grupo químico a que pertencem, sumarizadas no Quadro 1. Essa classificação também é extremamente necessária para o diagnóstico de intoxicações nas Instituições em Saúde para o tratamento específico, sendo os agrotóxicos classificados como: Inseticidas; Fungicidas; Herbicidas; Raticidas, Acaricidas, Nematicidas, Moluscocidas e Fumigantes (BRASIL, 2021).

Inseticidas possuem ação de combate a insetos, larvas e formigas, sendo estes divididos em quatro grupos químicos distintos:

- Organofosforados (OPs): compostos orgânicos derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico. Exemplo: Folidol, Azodrin, Malathion, Diazinon, Nuvacron, Tamaron, Rhodiatox.

¹ NPIC – National Pesticide Information Center. *Ingredientes ativos* são os produtos químicos que matam, controlam ou repelem pragas. Muitas vezes, os ingredientes ativos constituem uma pequena porção de todo o produto, os rótulos dos agrotóxicos incluem o nome de cada ingrediente ativo e sua concentração no produto. A saber: i) O mesmo ingrediente ativo pode ser encontrado em centenas de agrotóxicos com nomes diferentes; ii) Produtos com marcas semelhantes podem ter diferentes ingredientes ativos; iii) Produtos com o mesmo nome e ingrediente(s) ativo(s) podem ter concentrações diferentes; iv) Alguns ingredientes ativos funcionam em um amplo espectro de pragas, outros são mais direcionados; v) Existem famílias de ingredientes ativos que funcionam da mesma maneira básica. Disponível em: <http://npic.orst.edu/ingred/active.html> acesso em 10 de Janeiro de 2019.

- Carbamatos: derivados do ácido carbâmico. Exemplo: Carbaril, Temik, Zectram, Furadan.

- Organoclorados: compostos à base de carbono, com radicais de cloro, derivados do clorobenzeno, do ciclo-hexano ou do ciclodieno. Foram muito utilizados na agricultura, como inseticidas, porém seu emprego tem sido progressivamente restringido ou mesmo proibido (Bombardi, 2017). Exemplo: Aldrin, Endrin, Hexaclorobenzeno/BHC, Diclorodifeniltricloroetano/DDT, Endossulfan, Heptacloro, Lindane, Mirex.

- Piretróides: compostos sintéticos que apresentam estruturas semelhantes à piretrina, substância existente nas flores do *Chrysanthemum (Pyrethrum) cinerariifolium*. Alguns desses compostos são: aletrina, resmetrina, decametrina, cipermetrina e fenpropanato. Exemplo: Decis, Protector, K-Otrine, Resmetrina/SBP.

Fungicidas, aplicados no combate a fungos, sendo que no Brasil existem muitos fungicidas no “mercado”, são constituídos por diferentes compostos químicos e princípios ativos. Os principais grupos químicos são:

- Etileno-bis-ditiocarbamatos: Maneb, Mancozeb, Dithane, Tiram.
- Trifenil estânico: Duter e Brestan.
- Captan: Ortocide e Merpan.
- Hexaclorobenzeno.

Herbicidas, utilizados no combate a ervas daninhas. Nas últimas duas décadas, esse grupo tem tido uma utilização crescente na agricultura. Seus principais representantes são:

- Paraquat: comercializado com o nome de Gramoxone.
- Glifosato: Round-up.
- Pentaclorofenol
- Derivados do ácido fenoxiacético: 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D) e 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5 T)².
- Dinitrofenóis: Dinoseb, Dinitro-ortho-cresol (DNOC).

² A mistura de 2,4 D com 2,4,5 T representa o principal componente do agente laranja, utilizado como desfolhante na Guerra do Vietnã. O nome comercial dessa mistura é Tordon.

Outros grupos importantes compreendem: Raticidas (Dicumarínicos), utilizados no combate a roedores; Acaricidas cuja ação de combate aplica-se a ácaros diversos; Nematicidas, com ação de combate a nematoides; Moluscocidas, com ação de combate a moluscos, basicamente contra o caramujo da esquistossomose; Fumigantes, aplicado no combate e mitigação da ação de insetos (formigas) e bactérias. São representados por fosfatos metálicos (Fosfina) e brometo de metila (Quadro 1).

Quadro 1: Principais agrotóxicos empregados mundialmente de acordo com o tipo de praga e grupo químico que pertencem

CLASSIFICAÇÃO (natureza de controle)	CLASSIFICAÇÃO (grupo químico)	EXEMPLOS (produto/substâncias/agentes)
Inseticidas (controle de insetos)	Inorgânicos	Fosfato de alumínio, arsenato de cálcio
	Extratos vegetais	Óleos vegetais
	Organoclorados	Aldrin,* DDT,* BHC*
	Organofosforados	Fenitroton, Paration, Malathion , Metilparation
	Carbamatos	Carbofuran, Aldicarb, Carbaril
	Piretróides sintéticos	Deltametrina, Permetrina
	Microbiais	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Fungicidas (combate aos fungos)	Inorgânicos	Calda Bordalesa, enxofre
	Ditiocarbamatos	Mancozeb, Tiram, Metiram
	Dinitrofenóis	Binapacril
	Organomercuriais	Acetato de fenilmercúrio
	Antibióticos	Estreptomina, Ciclo-hexamida
	Trifenil estânico	Duter, Brestam
	Compostos Formilamina	Triforina, Cloraniformetam
Herbicidas (combate às plantas invasoras)	Fentalamidas	Captafol, Captam
	Inorgânicos	Arsenito de sódio, cloreto de sódio
	Dinitrofenóis	Bromofenoxim, Dinoseb, DNOC
	Fenoxiacéticos	CMPP, 2,4-D, 2,4,5-T
	Carbamatos	Profam, Cloroprofam, Bendiocarb
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat, Difenzoquat
	Dinitroanilinas	Nitralin, Profluralin
	Benzonitrilas	Bromoxinil, Diclobenil
Desfoliantes (combate às folhas indesejadas)	Glifosato	Glicina, Round-up
	Dipiridilos	Diquat, Paraquat
Fumigantes (combate às bactérias do solo)	Dinitrofenóis	Dinoseb, DNOC
	Hidrocarbonetos Halogenados	Brometo de metila, cloropicrina
	Geradores de Metil-isocianato	Dazomet, Metam
Rodenticidas/Raticidas (combate aos roedores/ratos)	----	Formaldeídos
	Hidroxicumarinas	Cumatetralil, Difenacum
Moluscocidas (combate aos moluscos)	Indationas	Fenil-metil-pirozolona, pindone
	Inorgânicos (aquáticos)	Sulfato de cobre
Nematicidas (combate aos nematódeos)	Carbamatos (terrestres)	Aminocarb, Metiocarb, Mexacarbato
	Hidrocarbonetos halogenados	Dicloropropeno, DD
	Organofosforados	Diclofention, Fensulfotion
Acaricidas (combate aos ácaros)	Organoclorados	Dicofol, Tetradifon
	Dinitrofenóis	Dinocap, Quinometionato

Fonte: Peres & Moreira. É veneno ou é remédio? Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.

Os agrotóxicos são classificados, ainda, segundo seu poder tóxico. Esta classificação é fundamental para o conhecimento da toxicidade de um produto, do ponto de vista de seus efeitos agudos e crônicos aos seres vivos e ao meio-ambiente. A classificação de segurança, toxicidade e risco é determinada a partir de diferentes aspectos toxicológicos, ecotoxicológicos e agrônômicos.

No Brasil, a classificação toxicológica dos efeitos dos agrotóxicos a saúde humana, estão a cargo do Ministério da Saúde e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, e são classificados segundo seus efeitos tóxicos conforme a escala: Categoria 1 – Extremamente tóxico (tarja vermelha); Categoria 2 – Altamente tóxico (tarja vermelha); Categoria 3 – Moderadamente tóxico (tarja amarela); Categoria 4 – Pouco tóxico (tarja azul); Categoria 5 – Improvável de causar dano agudo (tarja azul); Não Classificado – Produtos não classificados (tarja verde). Os efeitos destes agrotóxicos a saúde, são designados e estabelecidos segundo a dose letal (DL) dos agrotóxicos, em um grau de toxicidade que leva a morte de até 50% dos animais em testes agudos (DL₅₀), e pelos danos causados frente a exposição por diferentes vias: oral, dérmica e inalatória. Estas informações estão sumarizadas no Quadro 2.

Quadro 2: Nova classificação dos agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana segundo a ANVISA

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERADAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	PRODUTO NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde

Fonte: BRASIL, 2019. Ato N° 58, de 27 de agosto de 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-58-de-27-de-agosto-de-2019-213474289> (acesso em janeiro de 2021).

2.2 Usos de agrotóxicos no Brasil:

O Brasil é o maior País da América do Sul e da região da América Latina, sendo o quinto maior País do mundo em área territorial (8.516.000 Km²). A área agrícola ocupa no Brasil, 7,6% da área territorial total (≈639.944,79 Km²), sendo esta majoritariamente composta por monoculturas, visando à produção extensiva de *commodities*³ agrícolas, que em busca de alta produtividade e rendimento utilizam quantidades massivas de agrotóxicos. O Brasil figura, desde 2008, como campeão mundial no uso de agrotóxicos chegando a consumir mais de 20% dos pesticidas comercializados anualmente no mundo (Pelaez *et. al.*, 2015).

No Brasil, o uso intensivo de agrotóxicos tem seu início marcado após o término da Segunda Guerra Mundial, sob incentivo de intensas políticas públicas da “Revolução Verde”⁴, a partir da criação do Sistema Nacional de Crédito Rural em 1965, que vinculava a liberação de créditos agrícolas a compra de insumos químicos pelos agricultores. Na década de 1970, o Banco do Brasil viria a destinar, obrigatoriamente, 15% dos valores de empréstimo para aquisição dos pesticidas. Essas políticas de estímulos ao uso de agrotóxicos só viriam aumentar com a instituição do Programa Nacional dos Agrotóxicos, que em 1975, efetivou a indústria de pesticidas com a criação de empresas nacionais, e majoritariamente, a instalação de multinacionais no País (Valentim *et. al.*, 2013).

Logo, o modelo brasileiro adotado produzia poucas culturas, destinadas quase que exclusivamente à exportação, requerendo para isso o uso de grandes quantidades de insumos agrícolas (agrotóxicos e fertilizantes), ao ponto que no final dos anos 1990 estes produtos se tornaram algumas das principais “*commodities*” de exportação (Quadro 3). Hoje, sete dentre os dez produtos mais exportados (em valores percentuais

³ *Commodities* são ativos tangíveis que vão do trigo ao ouro e ao petróleo. Os EUA definem o termo *commodities* no Commodity Exchange Act de 1936. A lei abrange o comércio de *commodities* agrícolas e recursos naturais, sendo agrupadas em três categorias principais, que são: agricultura, energia e metais. Disponível em: <https://www.cftc.gov/LawRegulation/CommodityExchangeAct/index.htm> acesso em 08 de Janeiro de 2019.

⁴ Em meados de 1950 no México o engenheiro agrônomo Norman Borlaug deu início ao que viria ser uma das grandes revoluções do sistema agrícola global. Norman desenvolveu técnicas químicas capazes de dar maior resistência às plantações de milho e trigo. Os métodos introduzidos foram tão efetivos que em poucos anos o México passou de importador, para exportador de trigo. As novas práticas rapidamente se popularizaram. No Brasil, os métodos foram adotados no final da década de 1960, o que levou o País a se tornar um grande produtor de alimentos e a exportar grandes quantidades de soja. Em 1970, Norman Borlaug recebeu o Prêmio Nobel da Paz, haja vista as grandes consequências humanitárias do seu trabalho em parceria com a Fundação Rockefeller. Estima-se que o trabalho de Norman tenha salvado um bilhão de pessoas da fome (Jain, 2010).

de exportação) advêm do agronegócio: soja, açúcar, carne de frango, farelo de soja, carne bovina, celulose e café em grão, e todos exigem uma alta demanda de agrotóxicos durante sua produção (BRASIL, 2014).

O incentivo governamental carrega parte da “culpa” pelo grande uso de agrotóxicos no Brasil. As isenções fiscais e tributárias concedidas, até hoje, ao comércio destes produtos, através de convênios como o ICMS 100/971. Por exemplo, os governos Estaduais podem conceder redução de até 60% da alíquota de cobrança do ICMS (Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços) a todos os agrotóxicos (Londres, 2011).

Os incentivos também vêm a nível Federal, o Decreto 8.950/16 (BRASIL, 2016), isenta completamente os agrotóxicos da cobrança de IPI (Imposto sobre Produtos Industrializados) e o Decreto 5.630/05 (BRASIL, 2005) isenta esses produtos da cobrança de PIS/PASEP (Programa de Integração Social/ Programa de Formação do Patrimônio do Servidor) e de COFINS (Contribuição para o Financiamento da Seguridade Social) (Quadro 3). Além das isenções federais, há as isenções complementares determinadas pelos estados, que podem chegar a 100%, como no estado do Ceará (Londres, 2011).

Quadro 3: Histórico dos Marcos Legais do uso de agrotóxicos no Brasil

Linha do Tempo – agrotóxicos
1965 - Sistema Nacional de Crédito Rural (destinava de 10 a 15% para compra dos defensivos agrícolas).
1975 - Programa Nacional dos Defensivos Agrícolas - II Plano Nacional de Desenvolvimento (PND). Recursos financeiros para criação de empresas nacional e instalação no País de subsidiárias de empresas transnacional de insumos agrícolas.
1989 - Lei n. 7.802, Lei dos Agrotóxicos - facilitou o registro de centenas de substâncias tóxicas, muitas já proibidas em outros Países.
1990 - Decreto 98.816/90 , regulamenta Lei dos Agrotóxicos.
1997 - Convênio ICMS 100/97 - concessão de isenções fiscais e tributárias e redução de 60% da alíquota a todos os agrotóxicos.
2002 - Decreto n. 4.074 , substituiu o Decreto 98.816/90 , com critérios menos rigorosos para registro de agrotóxicos. Instrução Normativa Interministerial 49 , estabeleceu os parâmetros a serem seguidos para a concessão do registro simplificado por equivalência.
2003 - Lei 10.831 , dispõe sobre a agricultura orgânica. Resolução RDC nº 119 , instituiu o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) que visa avaliar continuamente os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos.
2005 - Decreto 5.630/05 – isenta da cobrança de PIS/ PASEP e do Confins os agrotóxicos classificados na posição 38.08 na Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM) e suas matérias primas (revogou e substituiu o Decreto 5.195/04 que já concedia a isenção de PIS/PASEP e COFINS).
2006 - Decreto 5.981 , simplificou ainda mais o registro de agrotóxicos.

Decreto 6.006/06 , revogado pelo Decreto 8.950/16 , isenta completamente da cobrança de IPI (Imposto sobre Produtos Industrializados) os agrotóxicos.
2007 - Decreto 6.323 , regulamenta a Lei no 10.831.
2008 - Decreto 6.000/08 – Isenta completamente da cobrança de IPI agrotóxicos fabricados a partir de lista com dezenas de princípios ativos.
2012 - Decreto 7.794 instituiu a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica – PNAPO. Instalada a Comissão Nacional da Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica .
2013 - Plano Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (Planapo).
2014 - Aprovação do Programa de Nacional de Redução de Agrotóxicos (Pronara).
2015 - Instrução Normativa nº 13 - Estabelece a estrutura, a composição e as atribuições da Subcomissão Temática de Produção Orgânica (STPOrg) e das Comissões da Produção Orgânica nas Unidades da Federação (CPOrg-UF).
2016 - Lei 13.301/16 libera a pulverização com agrotóxicos inclusive em áreas urbanas, para eliminar os mosquitos vetores da dengue, chikungunya e zika.
2016 - PL 6.299/02 e PL 3.200/15 alteram os artigos 3º e 9º da Lei nº 7.802/89, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins; Propõe a alteração do termo Agrotóxicos para Defensivo Agrícola.
2019 – Ato Nº 58 de 27 de agosto , resolve dar publicidade as alterações das classificações toxicológicas dos produtos formulados agrotóxicos e afins.

Fonte: Adaptado de Araujo (2016). Impacto dos Agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente. Disponível em: <http://www.mobilizadores.org.br/wp-content/uploads/2016/08/Cartilha-Agrotoxicos-final.pdf>, acesso em janeiro de 2021.

Se em 2008 o Brasil alcançava o marco de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (em termos de consumo absoluto), utilizando a incrível marca de 986,5 mil toneladas aplicadas, em 2009 a ampliação e consumo de pesticidas ultrapassou o montante de um milhão de toneladas (Londres, 2011). Atualmente, os dados não podem mais ser consultados na página do SINDIVEG⁵ (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Vegetal); as repercussões destas estatísticas levaram o sindicato a suspender a divulgação dos dados referentes ao uso total de agrotóxicos no Brasil a partir de 2010.

No entanto, segundo o próprio SINDIVEG, em 2017 as culturas de soja foram o destino de 52,2% do montante em vendas de agrotóxicos no Brasil. Dos tipos de agrotóxicos empregados nas lavouras, segundo os dados deste mesmo ano, herbicidas (60%), seguido de inseticidas (15%) e fungicidas (15%), foram os produtos mais utilizados pelos agricultores.

⁵ SINDIVEG é uma entidade formada por 35 empresas do setor de ‘defensivos agrícolas’, que juntas representam 97,3% do mercado brasileiro, atuam sobre o setor de ‘defensivos agrícolas’, também conhecidos como agroquímicos, agrotóxicos, pesticidas, praguicidas ou produtos fitossanitários, em defesa do uso, políticas públicas econômicas e regulatórias. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2018/08/oquevoceprecisabersobredefensivosagricolas.pdf> acesso em janeiro de 2021.

A quantidade média de consumo relativo de agrotóxicos utilizados no Brasil, no período entre 2012 e 2014, foi de 8,33 Kg por hectare (Kg/ha), chegando a ser utilizados entre 12 a 16 Kg/ha em estados como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo e estima-se que o uso de agrotóxicos tenha chegado à marca de 1,7 milhões de toneladas atualmente (Bombardi, 2017). No entanto, segundo a FAO (2019), o consumo relativo é mais alto nas Maldivas (52,6 Kg/ha), Trinidad e Tobago (24,9 Kg/ha), Costa Rica (22,5 kg/ha), Hong Kong (16,6 Kg/ha), China (13,1 Kg/ha) e Japão (11,8 Kg/ha), quando comparados ao consumo do Brasil.

Outro ponto é que dos 509 ingredientes ativos com registro autorizado para uso no Brasil, 150 são proibidos na União Europeia, o que representa 30% dos produtos aplicados em nossas lavouras. Dos dez produtos mais utilizados no Brasil (Glifosato, 2,4-D, Acefato, Óleo Mineral, Clorpirifós, Óleo Vegetal, Atrazina, Mancozebe, Metomil e Diurom), dois são proibidos na União Europeia (Acefato e Atrazina) (Bombardi, 2017).

De acordo com levantamentos feito pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)⁶ junto ao Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - SINITOX⁷, no ano de 2015, foram notificados 7.184 casos de intoxicação por agrotóxicos, uma média de quase 20 pessoas intoxicadas por dia. No entanto, estes números devem ser ainda maiores, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), para cada caso notificado, existem outros 50 que não são identificados junto aos sistemas de notificação. Ocorre aproximadamente um óbito relacionado a intoxicação por agrotóxico a cada 3 dias, totalizando 108 mortes no ano de 2015 (ver SINITOX⁵).

A elevada frequência de contaminação por pesticidas ocorre em virtude de que, diferentemente de outras substâncias químicas, os agrotóxicos possuem a capacidade de se espalhar para o meio ambiente. Como consequência, uma grande parte da população humana pode ser exposta tanto no ambiente em geral ou nas atribuições de trabalho (produtores rurais), embora a exposição ambiental, envolvendo população em geral,

⁶ Disponível em: <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais> acesso em 11 de Janeiro de 2019.

⁷ O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) tem como principal atribuição coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no País. Os registros são realizados pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Ciats), localizados em vários estados brasileiros, parte deles integrantes da Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Renaciat). As notificações são encaminhadas ao SINITOX, responsável pela consolidação e divulgação anual dos dados, em âmbito nacional.

ocorra principalmente devido à ingestão de alimentos contaminados e água, e/ou através de vias respiratórias (Baligar & Kaliwal, 2001).

Em um estudo do perfil de intoxicações ocorridas no Brasil, utilizando dados do banco estatístico do SINITOX, Bochner (2015), constatou que entre os períodos de 2007 a 2011 foram registrados 55.498 casos de intoxicação (agrotóxicos de uso agrícola, agrotóxicos de uso doméstico e raticidas), atingindo a marca de 1030 óbitos, representando 47% do total de óbitos ocorridos no período citado. O grande número de intoxicações por agrotóxicos no Brasil está intimamente ligado ao consumo deste produto no País. Dentre estes, os inseticidas se destacam devido às características climáticas, onde a forte humidade e o calor, facilitam a propagação de insetos, induzindo o uso de OP, por exemplo, (Londres, 2011).

Neste aspecto ainda, figuram dois importantes fatores, a crescente liberação de novas formulações e os avanços tecnológicos que permitem a produção de novas moléculas (FAO, 2019). Se por um lado as novas formulações representam um risco pelo aumento de agrotóxicos disponíveis, por outro, são importantes ferramentas substitutivas de formulações obsoletas que permitem uma maior eficácia e exige uma menor quantidade de aplicações (Hazra & Purkait, 2019). Segundo os autores, as novas formulações buscam a otimização da produção, armazenamento, transporte e aplicação, a fim de obter segurança, métodos convenientes e eficazes de controle de pragas de uma forma econômica. O crescente avanço tecnológico não apenas permite a formulação de moléculas mais seguras, mas também contribui para a maior produtividade das lavouras (BRASIL, 2021).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), os avanços tecnológicos representaram 59% do crescimento do valor bruto da produção agrícola entre 1975 e 2015 no Brasil. Crescimento decorrente da agricultura 4.0, que busca proporcionar o aperfeiçoamento e customização do processo produtivo. No Brasil, isso já é uma realidade nas lavouras por meio do uso de drones, sensores, biotecnologia, sistema de análise climática, telemetria e recursos que utilizam Big Data e a Internet das coisas. Inclusive, o Brasil é visto como referência em inúmeros processos de produção de alimentos. Essas tecnologias permitem coletar e analisar dados relacionados à temperatura, condições do solo, umidade do ar, entre outros. Também permite detectar problemas e falhas no plantio e na irrigação, pragas e doenças nas lavouras; monitorar e gerenciar toda a plantação; aplicar conceitos de automação da

agricultura à colheita; automatizar processos de pulverização; coletar informações geográficas para um planejamento de safra assertivo que reduza o desperdício de insumos agrícolas e recursos naturais (BRASIL, 2021).

Contudo, mesmo com todos os avanços tecnológicos ressalta-se que a utilização de agrotóxicos, tanto em áreas agrícolas como urbanas, oferece sérios riscos ambientais, como contaminação dos solos, das águas superficiais e subterrâneas e dos alimentos. Assim, pode conferir riscos a organismos terrestres e aquáticos bem como de ingestão indireta pelos humanos a partir do consumo de água e alimentos contaminados. Por fim, o risco de intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais (Spadotto, 2004).

A demonstração definitiva de que a exposição a um pesticida em particular causa doença ou outra condição em humanos é um desafio considerável. Não existem grupos na população humana que não sejam expostos a agrotóxicos, e a maioria das doenças é dita de causa multifatorial, dada a considerável complexidade das avaliações de saúde pública. Igualmente, a maioria das pessoas é exposta a uma complexa e variada mistura de compostos, não apenas pesticidas, i.e., substâncias químicas sintéticas utilizadas na produção de solventes e lubrificantes (bifenil policlorinados, bifenil polibrominados, dioxinas), plásticos (bisfenol A), plastificadores (ftalatos), metais pesados (metilmercúrio, cádmio) por meio de diversas vias de exposição. O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos identificou que dos mais de 2000 indivíduos avaliados aleatoriamente, 90% destes deram positivo para inúmeros destes compostos químicos no sangue (Robins, 2011). Ressalta-se, porém, que os estudos sobre os potenciais impactos da exposição a agrotóxicos sobre a saúde humana no Brasil têm avaliado principalmente efeitos agudos e, em menor grau, efeitos neurocomportamentais – em grande parte devido às elevadas incidências tóxicas agudas por agrotóxicos.

2.3 Agrotóxicos Organofosforados e Malathion⁸:

Existem diferentes tipos de agrotóxicos disponíveis e comercializados no mundo todo. Contudo, entre os mais amplamente utilizados destacam-se os OPs, organoclorados e carbamatos. Entre estes, os OPs representam 50% de todo inseticida utilizado a nível global (Casida & Quistad, 2004) e pelo os quais todas as pessoas estão praticamente expostas ao menos indiretamente (Morgan *et. al.*, 2005). Os OPs estão envolvidos em mais de 50% dos casos de intoxicação, ao menos em países em desenvolvimento como o Brasil (Swaminathan, 2013).

OP é um termo genérico utilizado para designar uma ampla variedade de compostos químicos, que podem ser derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico ou fosfínico e geralmente são aplicados como inseticidas. Dentre os mais utilizados no Brasil, destaca-se o Malathion (nome comercial) do éster dietil dimetoxifosfotioil, ou segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dietil 2-dimetoxifosfotioilsulfanilbutanedioato ($C_{10}H_{19}O_6PS_2$). O Malathion pode ser conhecido, dependendo do local do mundo, pelos sinônimos: American Cyanamid 4049, Carbafos, Carbofos, Carbophos, Cythion, Fyfanon, Karbofos, Maldison, Mercaptotion, Prioderm, ou Sadophos. Ressalta-se que são conhecidos mais de 17 nomes comerciais para o Malathion, incluindo Agrothion, Heckthion, Hilmala, Hilthion, Malatox e Tragumaldentre (NCBI, 2019).

Das propriedades químicas do Malathion, destacam-se a sua ligeira solubilidade em água (145 mg/L a 25 °C), sendo melhor solúvel em etanol, benzeno ou éter etílico. É miscível com a maioria dos solventes orgânicos, e.g álcoois, ésteres, cetonas, éteres, hidrocarbonetos aromáticos e alquilados, ou ainda, óleos vegetais. Quanto à estabilidade dos compostos, são relativamente estáveis em meio aquoso tamponado a pH 5,26, mas rapidamente hidrolisado em pH > 7,0 ou < 5,0; a hidrólise produz ácido tiomálico e dimetil tiofosfato; se aquecido ou durante queima, produz fumaça tóxica, incluindo óxidos de fósforo e óxidos de enxofre, reagindo fortemente com oxidantes fortes (NCBI, 2019).

O Malathion é fabricado em 10 países por 49 indústrias, a maioria está localizada na China (22 produtores) e Índia (12 produtores), com outros em Singapura, Estados Unidos, Dinamarca, Egito, Japão, México e Suíça. Em 1978, cerca de 14.000

⁸ Para consulta de registro no Ministério da Agricultura acessar: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em janeiro 2021.

toneladas foram produzidas, no entanto, informações sobre o volume de produção atual não estão disponíveis para consulta. Devido seu amplo espectro de uso, o Malathion tem estado entre os inseticidas OPs genéricos mais vendidos em todo o mundo desde a década de 1980 (FAO, 2019).

Na agricultura são amplamente utilizados para vários alimentos e grãos. Ainda, podem ser empregados nas instalações de armazenamento, gramados, jardins, áreas residenciais, viveiros ornamentais, perímetros de construção, estradas, pastagens e áreas regionais para erradicação de pragas. É aplicado para controlar uma grande variedade de insetos incluindo formigas, pulgões, lagartas, moscas, moscas da fruta, gafanhotos, vespas, mariposas, ácaros, mosquitos, escorpiões, aranhas, vespas e gorgulhos, bem como ectoparasitas de bovinos, cavalos, suínos, aves e animais de estimação (incluindo pulgas em cães e gatos). Nos alimentos, o Malathion é aplicado a uma ampla variedade de produtos, tanto para humanos como para animais, incluindo alfafa, vagem, brócolis, repolho, aipo, frutas cítricas, algodão, soja, alho, forrageiras (feno), verduras, cogumelos, nozes, arroz, tubérculos, abóbora e trigo (NCBI, 2019). Os limites aceitáveis de resíduos do Malathion sobre alimentos, são estabelecidos segundo o DRfA (Dose de Referência Aguda), sendo de 2 mg/kg de massa corpórea (m.c), e a IDA (Ingestão Diária Aceitável) de 0,3 mg/Kg m.c, enquanto nos estudos com roedores a DL₅₀ para exposição oral é de 2.303 mg/Kg m.c (Cheminova, 2021).

O Ministério da Saúde também preconiza o emprego do Malathion para o controle do mosquito *Aedes aegypti*, especialmente em áreas onde o vetor é resistente aos inseticidas piretróides. O Malathion é considerado Produto Improvável de Causar Dano Agudo⁹, com reclassificação toxicológica enquadrada na Categoria 5 (rótulo azul) pelo Ato nº 58, de 27 de agosto de 2019 (BRASIL, 2019).

O emprego de Malathion no Brasil, no período compreendido entre 1991 e 2001, passou de 1.850 para 7.627 toneladas cúbicas, um consumo de aproximadamente 40% de todo o Malathion produzido mundialmente neste período. Devido e extensão da agricultura além da utilização indiscriminada em vários ambientes, o Malathion é um dos OPs que mais causa intoxicações tanto aos animais, quanto para os seres humanos.

⁹ A antiga classificação do Malathion, segundo a portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988, o considerava Extremamente Tóxico para mamíferos e vertebrados, sendo indentificado pelo rótulo vermelho de Classe I.

Isto resulta das características de mobilidade¹⁰ que os agrotóxicos possuem (aplicação em local determinado e destino desconhecido) o que torna a propagação pelo ambiente muito frequente (Delgado, 2006). Devido ao emprego do Malathion para fins de agricultura, saúde pública e do controle residencial de pragas, além dos métodos de aplicação (que incluem pulverização por aeronave ou equipamento terrestre, nebulizador, pulverizador de jato de ar e equipamentos de mão, como pulverizadores mochila), o Malathion pode estar presente no solo, ar, águas¹¹ (superficiais e subterrâneas) e alimentos (Machera *et. al.*, 2003).

As fatalidades e condições de saúde precárias, resultantes das exposições agudas e/ou crônicas aos agrotóxicos OP, também se tornaram um grande problema de saúde pública. As estimativas apontam que mais de 3 milhões de casos de intoxicação aguda por agrotóxicos ocorrem por ano, com mais de 1 milhão de casos sendo atribuídos à exposição ocupacional a longo prazo. Igualmente alarmantes são os dados de que o auto-envenenamento por agrotóxicos em todo o mundo é responsável por mais de 250.000 mortes por ano, o que corresponde a cerca de um terço dos casos de suicídio no mundo (Gunnell *et. al.*, 2007).

2.4 Efeitos Colaterais dos Agrotóxicos Organofosforados:

Os OPs são absorvidos pelo organismo humano por via dérmica, respiratória e digestiva. A absorção por via oral assume importância nas intoxicações digestivas por meio do consumo de alimentos contaminados e, principalmente em crianças, em casos acidentais (Aluigi *et. al.*, 2005).

Há consenso na literatura sustentando a hipótese de que a ação tóxica destes compostos está relacionada à inibição de inúmeras enzimas sendo as esterases as mais afetadas clinicamente (Costa, 2006). A inibição da acetilcolinesterase (AChE), por meio do processo de fosforilação do grupo hidroxila do resíduo de serina da enzima, leva à inativação permanente da mesma (Rusyniak & Nañagas, 2004). Com isso, a hidrólise da

¹⁰ A mobilidade de um agrotóxico, de forma geral, está relacionada aos processos de escoamento superficial e lixiviação, ocorrendo principalmente por fluxo de massa independente das taxas de transporte da água, tendo uma relação direta com a quantidade de chuva, irrigação e evapotranspiração.

¹¹ Limites máximos de 0,1 µg/L, determinado pela resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>; acesso em janeiro de 2021.

acetilcolina será comprometida, levando ao acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses do sistema nervoso central e sistema nervoso periférico.

Em casos de exposição por curtos períodos (i.e., intoxicação aguda) o acúmulo de neurotransmissores na fenda sináptica resulta em hiperestimulação dos receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, desencadeando uma variedade de sinais e sintomas (Van Koppen & Kaiser, 2003). As ações muscarínicas (síndrome parassimpaticomimética, muscarínica ou colinérgica) envolvem sintomas como: vômito, diarreia, cólicas abdominais, broncoespasmo, miose puntiforme e parálitica, bradicardia, hipersecreção (sialorréia/ptialismo, lacrimejamento, broncorreia e sudorese), cefaléia, incontinência urinária e visão borrada. A diaforese severa pode provocar desidratação e hipovolemia graves, resultando em choque. Mais tardiamente, podem ser instalados quadros de síndrome intermediária (SI) que aparece entre 24-96 horas após a exposição. A crise colinérgica aguda é caracterizada por paresia dos músculos respiratórios e debilidade muscular que acomete principalmente a face, o pescoço e as porções proximais dos membros. Também pode haver comprometimento de pares cranianos e diminuição de reflexos tendinosos, podendo prolongar-se por meses após a exposição (Rusyniak & Nañagas, 2004).

Os efeitos nicotínicos (síndrome nicotínica) apresentam sintomas característicos, com a presença de mialgia, hipertensão arterial, taquicardia, fasciculações musculares, tremores e fraqueza, que são, em geral, indicativos de gravidade. Em estados mais severos de intoxicação, pode haver paralisia da musculatura respiratória levando à morte. As ações no sistema nervoso central, síndrome neurológica, incluem como sintomas a ansiedade, agitação, confusão mental, ataxia, depressão de centros cardio-respiratórios, convulsões e coma. Outro quadro possível de apresentação é a neuropatia retardada induzida por OPs que é desencadeada por danos aos axônios de nervos periféricos e centrais, caracterizada por paresias ou paralisias de extremidades, sobretudo inferiores, podendo persistir durante semanas, meses ou anos. São casos raros, após exposições agudas e intensas, que também podem desencadear déficit residual de natureza neuro-psiquiátrica, com comprometimento da memória, concentração e iniciativa (Rusyniak e Nañagas, 2004). Em paralelo, também pode ocorrer picos de secreção de adrenalina pelas adrenais por meio da estimulação colinérgica sobre estas glândulas. Vale a pena ressaltar, que os efeitos vão para além da

exposição aguda e podem estar presentes até mesmo em concentrações que não inibem a colinesterase (Slotkin, 2011).

O Malathion é rapidamente absorvido por mamíferos, incluindo seres humanos, devido às características do composto, uma molécula lipofílica não ionizada, que ocorre por difusão passiva sendo facilmente incorporada pelo organismo frente à exposição dérmica e inalatória, nas exposições ocupacionais, ou oral através da dieta, ingestão acidental ou intencional (Knaak *et. al.*, 2004). No entanto, os dados sobre a extensão da inalação e absorção em humanos escassos, tendo vários casos-relatos de envenenamento acidental ou intencional por meio da ingestão oral de Malathion que indicam pronta absorção no trato gastrointestinal, vez que o produto é encontrado na corrente sanguínea após a morte (Zivot *et. al.*, 1993).

A absorção do Malathion foi avaliada em estudos com humanos (sexo masculino) quando voluntários ingeriram doses orais únicas de Malathion (0,5 e 15 mg/Kg m.c), e observados valores de metabólitos urinários equivalentes a dose ingerida poucas horas após a ingestão (Bouchard *et. al.*, 2003). Em outro estudo no sexo masculino, voluntários ingeriram Malathion diariamente (8, 16 ou 24 mg/Kg m.c) por até 56 dias. O Malathion foi eficientemente absorvido, com base em decréscimos significativos da colinesterase eritrocitária com efeito dose-resposta (Moeller & Rider, 1962). Estudos *in vitro* de Capt e colaboradores (2007), demonstraram que aproximadamente 40% da dose aplicada é potencialmente absorvida através da via dérmica.

O tratamento das intoxicações por OPs, em especial a aguda, depende fortemente do uso de uma oxima para reativar AChE inibida por OP, atropina para bloquear a hiperestimulação de receptores muscarínicos, e benzodiazepínicos para reduzir a incidência e a intensidade de convulsões induzidas por OP e a neuropatologia resultante (Buckley *et. al.*, 2011).

2.5 Modelos Animais como Ferramenta para Avaliação de Desfechos por Intoxicação ou Exposição a Agrotóxicos:

Nas últimas décadas começou a se relacionar os casos de intoxicação por uma série de produtos químicos, poluentes ambientais, incluindo agrotóxicos, sobre a saúde

humana, em especial no sistema reprodutivo feminino e a gestação. Mas apesar de décadas de pesquisa epidemiológica e clínica, ainda há controvérsias sobre os resultados adversos à saúde (Kamel & Hoppin, 2004). Adito a isso, em muitos estudos epidemiológicos, a exposição a classes específicas de agrotóxicos é desconhecida ou não quantificada. Os sinais de toxicidade aguda induzida por OP e agentes nervosos em inúmeros animais variando de pequenos roedores, como camundongos, ratos e porquinhos-da-índia a grandes mamíferos, incluindo primatas não humanos, se assemelham àqueles apresentados por humanos expostos a esses compostos (Despain *et. al.*, 2007).

A exposição de diferentes espécies animais a distintas doses de agentes OP, resulta em crise colinérgica caracterizada por mastigação (roer), secreções profusas, diarreias, fasciculações musculares, inquietação, tremores, convulsões motoras e desconforto respiratório que podem levar à morte (Deshpande *et. al.*, 1986; Kawabuchi *et. al.*, 1989; Albuquerque *et. al.*, 2006; Maxwell *et. al.*, 2006; Despain *et. al.*, 2007).

A DL₅₀ dos OP é invariavelmente a mesma entre as diferentes espécies (Fawcett *et. al.*, 2009). Além disso, a DL₅₀ de diferentes OPs correlacionam-se com a sua IC₅₀ (50% da Concentração Inibitória Máxima), para inibir *in vitro* a atividade da AChE em extratos de cérebro de ratos e cobaias. Assim, como nos seres humanos, a inibição da AChE é um importante determinante da toxicidade aguda dos agentes OP em modelos animais de intoxicação (Sivam *et. al.*, 1984). Por esta razão, os animais de laboratório (ratos e camundongos) destacam-se como modelos animais apropriados para avaliação da intoxicação por OP. Especificamente, a sensibilidade aos compostos OP assemelha-se muito à dos seres humanos, por exemplo, o DL₅₀ intravenosa de Sarin em roedores (24 µg/kg) é apenas 1,7 vezes maior do que o relatado para seres humanos (Spruit *et. al.*, 2000). Além disso, muitas características anatômicas do cérebro humano e da fisiologia endócrina estão intimamente relacionadas às de roedores, os tornando modelos robustos e de fácil manutenção para o estudo de desfechos multidimensionais de relevância direta para os seres humanos (Lee *et. al.*, 2014).

A maioria dos estudos de toxicidade aguda e crônica induzidos por diferentes níveis de compostos OPs são realizadas em ratos e camundongos. O tamanho relativamente pequeno, o tempo de gestação curto e o tempo de vida acelerado de ratos e camundongos ajudam a manter o espaço e o tempo necessários para a realização de estudos comparativos. Além disso, anticorpos contra milhares de proteínas estão

comercialmente disponíveis para ambas as espécies, permitindo aos cientistas explorarem como as doses de exposição, sejam elas altas ou baixas, funcionam na saúde ou na doença (Boverhof *et. al.*, 2011).

Estudos envolvendo a exposição aos OPs nas fases intra-uterinas têm se mostrado muito relevantes nas últimas décadas. Um número crescente de estudos epidemiológicos tem fornecido evidências de que a exposição intra-uterina aos pesticidas OP está associada ao aumento da prevalência de transtorno de déficit de atenção, hiperativa, transtorno invasivo do desenvolvimento, e redução do quociente de inteligência entre crianças (Rosas & Eskenazi, 2008). Um estudo recente, utilizando ressonância magnética, também revelou anormalidades estruturais significativas nos cérebros de crianças expostas ao OP Chlorpyrifos no período pré-natal (Rauh *et. al.*, 2012). No entanto, estudos com foco nos desfechos metabólicos e hormonais são escassos ou direcionados à alterações de base genética.

2.6 Alterações Metabólicas pela Exposição aos Organofosforados (Malathion):

Os OPs são ésteres de ácido fosfórico e seus derivados, cuja estrutura química geral compreende um átomo central de fósforo (P) e a ligação característica envolvendo um grupo fosforila ($P = O$), ou um grupo tiofosforila ($P = S$) ou um grupo selenofosforila ($P=Se$) (Eleršek & Filipič, 2011). A taxa de inibição da AChE depende do grupo de saída, onde, maior tendência de saída resulta em maior afinidade do inibidor para a enzima. No agente laranja, utilizado durante a guerra do Vietnã, o grupo de saída contém flúor, que tem alta tendência à hidrólise e, portanto, afinidade extremamente alta com a enzima, ao ligar-se por substituição nucleofílica com o oxigênio da serina da AChE (Gupta, 2006). O OP Malathion possui a ligação thion ($P = S$), nesse caso, a ativação metabólica com a enzima citocromo P450 deve metabolizar primeiro o grupo thion para um grupo oxon, somente então o OP pode atuar como um inibidor da AChE (Gupta, 2006).

A metabolização ocorre principalmente no fígado e, em menor grau, também nos pulmões e intestino. Compreendem duas fases: *i*) as enzimas metabólicas na fase I ativam grupos funcionais, nos quais podem ocorrer reações de fase II; *ii*) as enzimas da

fase II ligam vários grupos hidrofílicos, como ácido glicurônico, sulfato, glicina, ácido glutâmico, permitindo a excreção do metabólito (Josephy & Mannervik, 2006). Nestes processos ocorrem a oxidação e hidrólise dos compostos, sendo a oxidação a reação mais importante na ativação do grupo thion para formar os inibidores ativos da AChE. Com o auxílio da enzima citocromo P450, o átomo de enxofre na forma thion (Malathion) liga um átomo de oxigênio, resultando em um intermediário instável que se desintegra ao metabólito oxon (Malaoxon), este por vez é um inibidor mais potente da AChE, sendo responsável pela maioria dos efeitos tóxicos causados por este OP. A hidrólise do Malaoxon ocorre após a oxidação, com o auxílio da enzima esterase A, também chamada paraoxonase, reação importante para os processos de desintoxicação. A paraoxonase cliva o Malaoxon em dialquilfosfato inativando o composto (Gupta, 2006).

O mecanismo primário da toxicidade do Malathion envolve a inibição da enzima AChE, que é encontrada nas membranas sinápticas. A AChE degrada, por meio de sua atividade hidrolítica, o neurotransmissor acetilcolina (ACh), produzindo colina e acetato, uma reação importante para a regulação da atividade sináptica no sistema nervoso central e periférico. A inibição da AChE causa o acúmulo de ACh no sistema sináptico resultando nos efeitos neurotóxicos, tais como paralisia neuromuscular por todo o corpo (Gupta, 2006).

É amplamente aceito que a inibição irreversível da AChE é o principal mecanismo subjacente à toxicidade aguda dos pesticidas OPs. No entanto, o fato de a prevalência dos vários sinais de toxicidade aguda variar entre diferentes compostos OPs em humanos e em modelos animais, sugere fortemente que as interações diretas desses compostos com outros alvos moleculares contribuem para sua toxicidade aguda (Xie *et al.*, 2000). Entre outros alvos moleculares que não a AChE, para compostos OPs, estão os receptores nicotínicos e muscarínicos (Albuquerque *et al.*, 1985; Silveira *et al.*, 1990; Jett *et al.*, 1991; Bomser & Casida, 2001).

Interações diretas de compostos OPs com receptores nicotínicos na junção neuromuscular levam à dessensibilização do receptor que pode contribuir para a fraqueza e paralisia muscular observada na fase aguda da intoxicação (Albuquerque *et al.*, 1985). Contudo, os OPs podem alcançar todos os tecidos levando eventualmente a vários agravos patológicos. Devido a sua natureza lipofílica e sua assimilação intestinal simples e rápida, os OPs podem causar: insuficiência do sistema imunológico (Handy

et. al., 2002), pancreatite (Gokalp *et. al.*, 2005), doenças hepáticas (Franco *et. al.*, 2009; Kalender *et. al.*, 2005), alterações hematológicas (Kalender *et. al.*, 2010), lesão renal (Afshar *et. al.*, 2008), diminuição da fertilidade e incapacidade de reprodução (Selmi *et. al.*, 2015).

Os inseticidas OPs afetam o metabolismo da glicose podendo atuar como fator risco para o diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 (Akyildiz *et. al.*, 2009; Kumar & Nayak, 2011). Em seres humanos expostos acidentalmente ao Malathion (exposição ocupacional) foi observada hiperglicemia (Ramu *et. al.*, 1973; Sungur & Güven, 2001), e estudos de correlação clínica relataram o aparecimento de um quadro diabetogênico (aumento de glicose e insulina no sangue) de agricultores expostos a OPs (Meller *et. al.*, 1981). As mesmas observações foram descritas por outro estudo nos EUA, onde a prevalência de diabetes aumentou em trabalhadores licenciados para a aplicação de agrotóxicos OPs (Montgomery *et. al.*, 2008).

No estudo realizado por Saldana e colaboradores (2007) os autores observaram que as incidências de diabetes gestacional aumentaram entre as mulheres expostas a OPs. Raafat *et. al.* (2012) analisaram agricultores sem diabetes, e demonstraram que houve aumento significativo nos valores médios da concentração de Malathion no sangue destes trabalhadores quando comparados com um grupo controle da população não envolvida no trabalho agrícola. Houve uma correlação positiva entre o Malathion e os quadros de resistência à insulina, avaliados pelo modelo de homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR). Os autores concluíram que a exposição à OP como o Malathion em agricultores parece favorecer um quadro diabetogênico com o aparecimento de resistência à insulina e complicações tardias como o DM.

2.7 Classificações do Diabetes *mellitus* (tipo 1, 2 e gestacional):

Em 2015, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) estimou que 8,8% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 7,2 a 11,4) da população mundial com 20 a 79 anos de idade (415 milhões de pessoas) vivia com diabetes (SBD, 2020). A projeção da Associação Americana de Diabetes (ADA) para 2040 é que mais de 640 milhões de

peessoas estejam com DM, com uma incidência maior em países em desenvolvimento onde esse crescimento será maior nas próximas décadas (ADA, 2021).

O DM pode ser definido como uma desordem do metabolismo de carboidratos em que uma relativa ou absoluta deficiência de insulina resulta em hiperglicemia (Drury, 1979). Segundo Foss (1991), as anormalidades metabólicas vão além de alterações no metabolismo de carboidratos, incluindo-se alterações no metabolismo de lipídios e proteínas.

A classificação etiológica dos distúrbios glicêmicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o DM é: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) e DM gestacional (DMG) (Baker, 1997). Atualmente essa classificação abrange quatro classes assim distribuídas: DM tipo 1 (1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células β comprovada por exames laboratoriais; 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática), DM tipo 2 (perda progressiva da secreção de insulina combinada com a presença de resistência periférica à insulina), DM gestacional (hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio), Outros tipos de diabetes envolvem ainda: Monogênicos (MODY¹²); Diabetes neonatal; Secundário a endocrinopatias; Secundário a doenças do pâncreas exócrino; Secundário a infecções; Secundário a medicamentos (ADA, 2021).

Segundo a ADA (2021), o DM tipo 1 é uma doença autoimune, poligênica, decorrente de destruição das células β pancreáticas, ocasionando deficiência quase que absoluta na produção de insulina. As estimativas apontam que mais de 30 mil brasileiros sejam portadores de DM1 e que o Brasil ocupe o terceiro lugar em prevalência de DM1 no mundo segundo a IDF (IDF, 2015). Mesmo com o aumento da prevalência de DM1 no mundo, esse tipo de diabetes atinge entre 5 a 10% dos casos de DM, é mais frequentemente diagnosticado em crianças, adolescentes e, em alguns casos, em adultos jovens, afetando igualmente homens e mulheres (Skyler *et. al.*, 2017). É subdividido em DM tipo 1A e DM tipo 1B, segundo a presença ou ausência de um ou mais autoanticorpos circulantes.

O DM tipo 1A é a forma mais frequente de DM1, confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos, os marcadores mais conhecidos de autoimunidade são: autoanticorpo anti-ilhota (*islet cell antibody*, ICA), autoanticorpo anti-insulina (*insulin*

¹² Do inglês: *Maturity-Onset Diabetes of the Young*.

autoantibody, IAA), autoanticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65), anticorpo antitirosina-fosfatase IA-2 e IA-2B e autoanticorpo antitransportador de zinco (Znt8) (ADA, 2021). Geralmente, esses autoanticorpos precedem a hiperglicemia por meses a anos, durante um estágio pré-diabético (Skyler *et al.*, 2017). Embora sua fisiopatologia não seja totalmente conhecida, envolve, além da predisposição genética, fatores ambientais que desencadeiam algum gatilho para a resposta autoimune. Entre as principais exposições ambientais associadas ao DM1 estão infecções virais, componentes dietéticos e desequilíbrios da composição da microbiota intestinal, conforme aponta a Sociedade Brasileira de Diabetes (SDB, 2020). Já para a DM tipo 1B, ou idiopático, a presença de autoanticorpos não são detectáveis na circulação e pode ser confundida com outras formas de DM diante da negatividade dos autoanticorpos circulantes. Neste caso também requer insulino terapia plena. Uma minoria de pacientes com DM1 está nesta categoria, sendo predominantemente encontrados em indivíduos de ascendência africana ou asiática (ADA, 2021).

O DM2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de DM (ADA, 2021). Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e ambientais. Geralmente, o DM2 acomete indivíduos a partir da quarta década de vida, embora em alguns países, indivíduos jovens e até crianças têm apresentado a doença (Rao, 2015). Em síntese, é uma doença poligênica, com forte herança familiar, ainda não completamente esclarecida, cuja ocorrência tem contribuição significativa de hábitos dietéticos e inatividade física, que contribuem para a obesidade (SDB, 2020). A hiperglicemia se manifesta a partir de algumas alterações metabólicas que incluem a resistência periférica à insulina, redução da ação das incretinas, deficiência na síntese ou secreção de insulina pelas células β pancreáticas bem como maior secreção de glucagon pelas células α pancreáticas. Com isso, se observa aumento da produção hepática de glicose com redução na captação periférica de glicose (hiperglicemia) e aumento da esterificação de ácidos graxos (hipertriacilgliceridemia) (DeFronzo, 2009). Na maioria das vezes, a doença é assintomática ou oligossintomática por longo período, sendo o diagnóstico realizado por dosagens laboratoriais de rotina (glicemia de jejum) ou manifestações das complicações crônicas. Com menor frequência, indivíduos com DM2 apresentam sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento inexplicado) (ADA, 2021). Possui uma forte associação com o DMG,

vez que muitas mulheres desenvolvem o DM2 após apresentarem quadro de DM na gestação (Metzger *et. al.*, 2010).

A gestação é uma condição fisiológica diabetogênica, haja vista que a placenta produz hormônios, como o lactogênio placentário e o fator de crescimento placentário, que atenuam a sensibilidade periférica à insulina com aumento compensatório na função das células β (secreção de insulina e massa de células β) (Negrato & Montenegro, 2016). O DMG é caracterizado por uma intolerância à glicose de faixa variável, que se inicia durante a gestação, traz riscos tanto para a mãe quanto para o feto e/ou neonato, sendo geralmente diagnosticado no segundo ou terceiro trimestres da gestação (ADA, 2021). Para diagnóstico da doença, idealmente na primeira consulta pré-natal, sugere-se investigar DM preexistente por meio dos exames habituais (ex., glicemia de jejum). Vale ressaltar que o valor de corte da glicemia em jejum durante a gestação difere do considerado normal para não gestantes sendo considerado normal os valores menores que 92 mg/dL a partir da transição do segundo para o terceiro trimestre da gestação (ADA, 2021).

Entre 24 e 28 semanas de gestação (início do último trimestre gestacional), todas as gestantes devem ser submetidas ao teste oral de tolerância a glicose (TOTG), com a ingestão de 75 g de glicose após jejum calórico mínimo de 8 horas, com coleta de glicose em jejum, 1 e 2 horas após ingestão, sendo consideradas portadoras de DMG quando: glicemia em jejum ≥ 92 mg/dL; glicemia 1 hora após sobrecarga ≥ 180 mg/dL; glicemia 2 horas após sobrecarga ≥ 153 mg/dL (SBD, 2020). Vale ressaltar que o DMG pode ser transitório ou persistir após o parto, caracterizando-se como importante fator de risco independente para desenvolvimento futuro de DM2 e sua prevalência varia de 1 a 14% a depender da população estudada (Metzger *et. al.*, 2010).

2.8 Fatores de riscos para o Diabetes mellitus (gestacional):

Há uma série de fatores de risco estabelecidos para o DMG, dentre os quais o índice de massa corporal (IMC), onde, um maior IMC pré-gestação e o IMC na 28^a semana estão fortemente correlacionados ao aumento da resistência à insulina (Metzger *et. al.*, 2008). Durante a gestação o tecido adiposo e a placenta se configuram como os principais tecidos endócrinos moduladores da resposta glicêmica. O tecido adiposo,

produz uma grande quantidade de adipocinas diabetogênicas, especialmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que a placenta também produz, e desempenha um papel importante nas vias de resistência à insulina (Kirwan *et. al.*, 2002). A placenta expressa virtualmente todas as citocinas conhecidas, incluindo resistina e leptina, que também são produzidas pelas células adiposas e a descoberta de que algumas dessas adipocinas são atores-chave na regulação da ação da insulina sugere possíveis interações entre a placenta e o tecido adiposo na compreensão da resistência à insulina observada durante a gestação (Desoye & Mouzon, 2007).

As ascendências étnicas também parecem desempenhar um papel importante. Berkowitz e colaboradores (1992) relataram que os americanos nativos, asiáticos, hispânicos e mulheres afro-americanas têm um risco maior de DMG em comparação com mulheres brancas não hispânicas. Além disso, estudos mostraram que as mulheres da Ásia estão em risco muito alto de desenvolver DMG e o surgimento da resistência à insulina é observado em indivíduos com faixas de IMC menores quando comparado com mulheres europeias. Em outro trabalho, pesquisadores relataram que o IMC pré-gestacional das mulheres asiáticas tem uma influência maior na resistência à insulina relacionada à gravidez do que nas mulheres caucasianas (Retnakaran *et. al.*, 2010).

A idade materna acima de 25 anos e o DMG anterior (em gestações antecedentes) estão fortemente associados ao desenvolvimento de DMG em uma nova gestação (Cypriak *et. al.*, 2008). Além disso, síndrome do ovário policístico, multiparidade, gestação gemelar e histórico familiar de DM são fatores de risco bem conhecidos que podem afetar diretamente o desenvolvimento do feto com eventuais desfechos de aborto, malformação fetal, macrossomia, ou até a hipoglicemia pós-parto no neonato (Callesen *et. al.*, 2012).

Muitos estudos têm procurado identificar novos fatores de risco, não convencionais, para o DMG e apontam que insultos hormonais (i.e., glicocorticóides), nutricionais (i.e., desnutrição proteica), emocionais (traumas psicológicos) e químicos/ambientais (i.e., bisfenol A) nestes períodos críticos do desenvolvimento, podem levar a uma reprogramação metabólica por meio de alterações epigenéticas que resultam em excesso de peso e disfunções cardiometabólicas (síndrome metabólica, DM2, hipertensão), bem como alterações neurocomportamentais, que se refletem em períodos tardios da vida e podem ser transmitidas à gerações subsequentes (Newbold *et. al.*, 2007; Valvi *et. al.*, 2012).

No contexto de fatores químicos, os agrotóxicos OP parecem fortes candidatos para o desenvolvimento do DMG. Alguns estudos epidemiológicos demonstraram associação entre exposição à agrotóxicos, incluindo o Malathion, antes e/ou durante a gravidez e o desenvolvimento de DMG em mulheres moradoras de áreas agrícolas (Saldana *et. al.*, 2007; Saldana *et. al.*, 2009; Ledda *et. al.*, 2013). Contudo, não há evidências suficientes que demonstrem o potencial efeito da exposição aos agrotóxicos como fator de risco para DMG, muito menos seus desfechos clínicos bem como os mecanismos pelos quais se dariam.

2.9 Influências Pré-natal e Pós-natal no Metabolismo Adulto:

A hiperglicemia do DMG pode levar a alterações no desempenho reprodutivo materno e no desenvolvimento embrionário (Jarrett, 1993). Uma das complicações diabéticas mais devastadoras é a embriopatia diabética, na qual a prole de uma mãe com DMG apresenta malformações congênitas, o que pode afetar vários sistemas e órgãos, incluindo o cérebro e medula espinhal, coração, vasos sanguíneos, rins, estruturas intestinais e músculos (Baker, 1997; Kanaka-Gantenbein, 2010).

O DM na gestação pode causar danos celulares resultando em diferenciação dos tecidos do embrião. Além disso, pode ocorrer malformação porque a sinalização causada pela glicose no metabolismo fetal se origina com a morfogênese dos tecidos e estas alterações quando ocorrem no primeiro estágio do desenvolvimento embrionário têm um impacto sobre a pré e pós-implantação (Wyman *et. al.*, 2008). Neste contexto a insulina materna parece ser o grande influenciador destes desfechos (Mihajlik *et. al.*, 1998). Além disso, o aumento da glicose circulante na gestante afeta a distribuição de células embrionárias, podendo resultar em menor número de células internas, enquanto causa um aumento no número de células externas, ectoderme, do trofoblasto (Fraser *et. al.*, 2007). Isso justificaria as baixas taxas de implantação e o aumento das perdas por malformações embrionárias na DMG. Outro efeito observado, em testes com animais, é que à medida que a hiperglicemia se assevera, os embriões aumentam a taxa de apoptose, resultando em redução no número de fetos vivos, índice de viabilidade fetal e aumento do número de mortes embrionárias (Bueno *et. al.*, 2014).

Outra alteração decorrente do DMG é a elevação do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de radicais livres é maior que a capacidade do sistema de defesa antioxidante, este estado é caracterizado por danos moleculares e estruturais nas células, em membranas, no DNA, em lipídios e/ou proteínas. Estudos mostraram que a hiperglicemia e a gravidez induzem aumento na produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) e de espécies de nitrogênio (Brownlee, 2001). A primeira linha de defesa contra o dano oxidativo são os antioxidantes enzimáticos endógenos: superóxido dismutase (SOD), catalase e sistema glutaciona, entre eles a glutaciona redutase (GSH-Rd) e a glutaciona peroxidase (GSH-Px). Existem também antioxidantes não enzimáticos que são lipossolúveis (tocoferóis, carotenóides, quinonas e bilirrubina) ou hidrossolúveis (ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas) (Damasceno *et. al.*, 2013; Halliwell & Gutteridge, 1999).

O diabetes está relacionado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e à isquemia tecidual que podem interativamente ou independentemente contribuir para a miopatia causada por disfunções do músculo esquelético (Mastrocola *et. al.*, 2008; Andersen, 1998). Está bem estabelecido, que as fibras musculares são capazes de alterar suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com o estímulo ao qual são submetidas, refletindo na quantidade ou no tipo de proteínas musculares e essas alterações são geralmente associadas ao metabolismo da glicose, diabetes e/ou obesidade (Andersen *et. al.*, 1996). Complicações vasculares também estão associadas à progressividade do diabetes, com aumento significativo dos vasos sanguíneos em ratas gestantes diabéticas (Chen *et. al.*, 2011).

Para o feto, o crescimento e desenvolvimento no ambiente intrauterino são completamente dependentes dos nutrientes fornecidos pela mãe e o requerimento materno de carboidratos, proteínas e lipídios aumentam consideravelmente durante a gestação (Aerts & Van-Assche, 2006; Rudge *et. al.*, 2000). Martin e colaboradores (1985), durante seus estudos, fizeram uma alerta apontando para os efeitos transgeracionais observados no seu modelo animal de hiperglicemia. Neste estudo, ratos Wistar (fêmeas) receberam estreptozotocina (30 mg/kg) no dia do acasalamento, e observou-se que estes ratos apresentaram uma média de glicose no sangue de 250 mg/dL no final da gestação. Os autores descobriram que a hiperglicemia materna prejudicou o metabolismo da glicose nas gerações subsequentes. Os fetos de primeira geração apresentaram hiperglicemia e, na idade adulta (100 dias), apresentaram

alterações hematológicas (anemia) e alterações na morfologia endócrina do pâncreas (Martin *et. al.*, 1985).

Utilizando o mesmo modelo animal, Aerts e colaboradores (1989) demonstraram que ao administrar glicose (infusão de glicose), em animais da primeira geração, os animais apresentaram intolerância à glicose e DM durante a gestação. Em outro estudo transgeracional, realizado pelo autor, concluiu-se que a geração subsequente foi afetada pelo ambiente intrauterino materno desfavorável, e seus fetos (geração F2) apresentaram hiperplasia de ilhotas pancreáticas, hiperatividade de células β , hiperinsulinemia e macrosomia (Aerts & Van-Assche, 1977).

Segundo alguns autores, o efeito transgeracional do diabetes afeta as gerações pela por meio da epigenética (Lassiter *et. al.*, 2008). É cada vez mais evidente que, devido às influências das interações gene-ambiente, os mecanismos epigenéticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de quadros patológicos. A epigenética se refere a mudanças hereditárias na expressão gênica e fenotípica sem mudanças na sequência de DNA. Estas alterações epigenéticas incluem metilação de citosina de DNA, modificações pós-tradução de histonas (PTMs) na cromatina e RNAs não codificantes (ncRNAs), que afetam a expressão gênica individualmente ou cooperativamente e modulam os estados de doença (Kato & Natarajan, 2014). As alterações nos estados do epigenoma têm um efeito profundo na regulação do gene e nos resultados biológicos e, portanto, estão associadas à patogênese de vários distúrbios, como o DM (Kato & Natarajan, 2014). Outro ponto importante citado pelos autores, é que as modificações epigenéticas persistem por muito tempo após a remoção dos estímulos originais, podendo então contribuir para doenças crônicas, como complicações diabéticas tardias.

Fatores ambientais podem influenciar os mecanismos epigenéticos em adultos e descendentes, levando à expressão anormal de genes envolvidos em distúrbios metabólicos. A natureza hereditária das marcas epigenéticas predispõem as gerações futuras às anormalidades metabólicas, tornando estas, suscetíveis à complicações diabéticas mais tarde na vida adulta (Ling & Groop, 2009).

A exposição ambiental a OP pode alterar a expressão gênica e alterar a suscetibilidade à doenças por meio de modificações epigenéticas (Tian & Marsit, 2018). Entretanto, muitos fatores parecem convergir para estabelecer o conjunto de alterações observadas tanto na mãe quanto na prole. Na literatura, muitos fatores de risco

potenciais, como os fatores químicos/ambientais (agrotóxicos OPs), não permitem nenhuma conclusão precisa acerca do desenvolvimento do DMG. Evidências experimentais e epidemiológicas apontam para a exposição a agrotóxicos (principalmente OPs) como potenciais agentes que contribuem para a etiologia do DM2. Tal fato levou há inúmeros estudos clínicos e, especialmente pré-clínicos, voltados para os desfechos metabólicos, reprodutivos, cardiovasculares e neurocomportamentais em indivíduos/proles oriundos da exposição in útero e/ou pós-natal precoce aos agrotóxicos (Sharara *et al.*, 1998; Somm *et al.*, 2009; Frye *et al.*, 2011; Robins *et al.*, 2011; Ünüvar & Büyükgebiz, 2012; Schug *et al.*, 2011). Entretanto, pouco se sabe sobre o impacto da exposição a agrotóxicos OPs sobre a homeostase glicêmica e lipídica ao longo da gestação com o foco na gestante. Portanto, não sabemos quais são as alterações bioquímicas e/ou morfofisiológicas decorrentes da exposição à OPs no período que antecede à concepção e menos ainda sobre os impactos dessa pré-exposição sobre os descendentes em sua fase adulta.

Considerando a relevância do DMG para a saúde da mulher e a infindável quantidade de fatores ambientais que possam a vir desempenhar alguma influência sobre a gestação, buscamos investigar o possível papel do OP Malathion como um fator de risco ao desenvolvimento de DMG e os seus desfechos na prole.

3. Objetivos Gerais:

Investigar, por meio de estudo em roedores, se a exposição subcrônica ao pesticida OP Malathion, em um período que antecede a gestação, é um fator de risco ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* gestacional, bem como os desfechos metabólicos pós-parto nas mães e na prole.

3.1 Objetivos Específicos:

Verificar se a exposição ao pesticida OP Malathion, em três concentrações distintas (equivalentes a $\frac{1}{23.000}$ da DL₅₀ [0,1 mg/Kg]; $\frac{1}{164,5}$ da DL₅₀ [14 mg/Kg]; e $\frac{1}{16,4}$ da DL₅₀ [140 mg/Kg])¹³, predispõe à:

i) Alterações na atividade da enzima colinesterase plasmática após exposição e durante a gestação;

ii) Alterações na homeostase glicêmica (glicemia, insulinemia e tolerância à glicose) nas progenitoras após exposição, durante a gestação e no período pós-termo, bem como, na prole adulta;

iii) Alterações na homeostase lipídica (triacilglicerol e colesterol total plasmáticos e frações) nas progenitoras após exposição, durante a gestação, no pós-termo e na prole adulta;

iv) Alterações hepáticas (marcadores bioquímicos de função: alanina aminotransferase ALT–TGP, aspartato aminotransferase AST–TGO) nas progenitoras e na prole, e alterações renais (creatinina e uréia) nas progenitoras;

v) Alterações murinométricas (massa corpórea, nº de nascidos, distribuição de sexos) e bioquímicas (glicemia) nos fetos e/ou recém-nascidos;

vi) Alterações morfológicas (tecido hepático e pancreático) nas progenitoras, nos fetos e na prole;

vii) Alterações murinométricas (massa corpórea e distribuição do tecido adiposo) nas progenitoras após exposição, durante a gestação, no pós-termo e na prole adulta;

¹³ Concentrações calculadas com base na toxicidade do Malathion, a partir da Dose Letal estimada para matar 50% dos animais de laboratório em teste agudo. DL₅₀ de 2.303 mg/Kg de massa corporal (Cheminova, 2021).

viii) Alterações hematológicas (perfil das células sanguíneas) nas progenitoras após exposição, durante a gestação e no período pós-termo;

ix) Alterações epigenômicas do DNA (metilação) na prole adulta.

4. Material e Métodos:

4.1 Local de Execução do Projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas – LIDoC 1 e LIDoC 3 (Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas – CCB da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis – SC)), no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia – LAMEB (Centro de Ciências Biológicas – CCB da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC (Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis – SC)) e no Laboratório de Biologia Funcional e Molecular (Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicabada, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Campinas – SP)). As imunofluorescências foram realizadas no centro Andaluz de Biologia Molecular e Medicina Regenerativa – CABIMER, Sevilha, Espanha.

4.2 Resalvas Éticas

Todos os procedimentos desse estudo estavam de acordo com a Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, que estabelecem os procedimentos para o uso científico de animais, instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA de 20 de setembro de 2013. As metodologias experimentais (manipulação e *EUTANÁSIA*) seguiram as normas éticas brasileiras, dos procedimentos e métodos adotados conforme a resolução N° 1000, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 11 de maio de 2012, Art. 4° do Capítulo I que estabelecem os princípios básicos norteadores destes procedimentos, assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais do Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC), registro de número: 5095181116, conforme apresentado em Anexo.

4.3 Tamanho Amostral

O número de animais para cada grupo experimental foi o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo. Neste contexto, o tamanho das amostras foi calculado para detectar a menor diferença esperada entre os grupos (de acordo com a literatura 109 ± 20 mg/dL para a principal variável crítica do estudo, a glicemia em animais expostos ao agrotóxico Malathion (Basiri *et al.*, 2007; Panahi *et al.*, 2006) para o cálculo, ainda utilizamos os valores de referência da glicemia controle, animais sem tratamentos ou intervenção, que segundo dados prévios do nosso grupo foi de 90 ± 5 mg/dL. Para o cálculo amostral, consideramos um poder estatístico de 80-90% para um nível de significância de $p < 0,05$ na base de dados da Universidade de Boston, link: http://www.bu.edu/researchsupport/files/2017/08/Statistical_Explanation_Sample_Spreadsheet_0817.xls, sendo considerado para esse parâmetro o número de 9-12 animais por grupo.

No total 245 animais foram utilizados, destes, 186 fêmeas e 59 machos. Esse número foi necessário para suprir a demanda experimental haja vista que as taxas de fecundação durante os procedimentos serem de $\approx 50\%$ e as análises dos testes ser realizado em distintos momentos da vida do animal (antes da gestação (Nulíparas), na gestação (Gestantes) e após a gestação (Pós-Termo)).

4.4 Animais

Ratos (machos e fêmeas) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais com aproximadamente 35 dias de vida foram recebidos e mantidos em gaiolas coletivas e em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (06:00-18:00 hs claro, 18:00-06:00 hs escuro), com livre acesso à comida (Nuvilab[®] CR-1; Nuvital, PR, Brasil,) e água. Por volta do 80º dia de vida dos animais, iniciamos a exposição orogástrica ao agrotóxico Malathion, seguindo os protocolos de experimentos conforme descrito a seguir.

4.4.1 Piloto 1: definição da formulação do Malathion

Duas formulações químicas do inseticida a base de Malathion foram testadas para definir o produto formulado a serem usadas nos experimentos, formulações estas

disponíveis no Brasil, sendo estes, Dipil[®] e Cheminova[®]. Para o teste 20 machos adultos foram expostos ao Malathion (Cheminova) e Malathion (Dipil) em duas distintas doses (70 e 140 mg/Kg m.c) através de via intra-gástrica (gavagem) usando óleo de milho como veículo, por um período de 30 dias¹⁴. Grupos experimentais definidos como M-70, M-140, D-70 e D-140. Os parâmetros avaliados foram glicemia, tanto em jejum, como na sobrecarga glicêmica intraperínea (teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT) [2 g/Kg m.c]), estabelecido pelo delta entre o minuto “zero” e trinta minutos após sobrecarga. Avaliação murinométrica da massa corporal, e da massa dos tecidos excisados (fígado, baço, glândulas adrenais e tecido adiposo (omental, gonadal e retroperíneo)). Avaliação toxicológica: inibição da ação da enzima Colinesterase (ChE); alanina aminotransferase (ALT-TGP) e aspartato aminotransferase (AST-TGO). A metodologia das análises é descrita com detalhe a seguir.

4.4.2 Piloto 2: definição das doses de Malathion Cheminova[®]

Três doses foram testadas para definir as concentrações do inseticida a base de Malathion a serem usados posteriormente nos demais experimentos. No piloto 20 fêmeas¹⁵ foram divididas em 4 grupos. Doses de 14, 70 e 140 mg/Kg de m.c, grupos nomeados e identificados pela concentração do agrotóxico durante exposição, e grupo controle “zero” mg/Kg de agrotóxico e [1 mL/Kg m.c] de óleo de milho utilizado como veículo, através de via intra-gástrica (gavagem), durante 30 dias. Grupos experimentais definidos como Controle, M-14, M-70 e M-140. Os parâmetros avaliados foram glicemia, tanto em jejum, como na sobrecarga glicêmica ipGTT [2 g/Kg m.c] estabelecido pelo delta entre o minuto “zero” e trinta minutos após sobrecarga. Avaliação murinométrica da massa corporal, da massa dos tecidos excisados (fígado, baço, glândulas adrenais e tecido adiposo (omental, gonadal e retroperíneo)). Avaliação toxicológica: inibição da ação da enzima Colinesterase (ChE); alanina aminotransferase (ALT-TGP) e aspartato aminotransferase (AST-TGO).

¹⁴ Período estabelecido, segundo dados da literatura, que nortearam o desenho experimental temporal a fim de replicação de dados (Flehi-Slim *et al.*, 2015).

¹⁵ O uso de fêmeas no Piloto 2 foi em razão de que nos demais desenhos experimentais, apenas fêmeas seriam expostas ao agrotóxico Malathion, e na literatura os dados disponíveis, em sua maioria, são de machos.

4.4.3 Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG

Nesta estapa experimental, foram utilizados 121 animais, 96 fêmeas e 25 machos. Ao atingirem 80 dias de vida (fêmeas adultas) iniciamos o tratamento (tto) com exposição ao Malathion 1000 EC Cheminova [malationa 1000 g/L (100% m/v) + outros ingredientes 191 g/L (19,1 % m/v)], por meio de gavagem intra-gástrica, diluído em óleo de milho, entre 7:00 e 9:00 hs, por 21+5 dias consecutivos¹⁶ (após 21 dias de exposição as fêmeas foram pareadas com machos, e a exposição ao OP foi mantida até aconstatação da cópula, período máximo adicional de até 5 dias). Duas doses foram avaliadas: 14 mg/kg m.c. (M-14) e 140 mg/kg m.c. (M-140). Estas doses correspondem a $\frac{1}{164,5}$ da DL₅₀ e $\frac{1}{16,4}$ da DL₅₀, respectivamente, para ratos, que é de aproximadamente 2.303 mg/kg m.c (Malathion 1000 EC Cheminova, 2021). O grupo Controle recebeu apenas óleo de milho, veículo utilizado na administração do agrotóxico [1 mL/Kg m.c.].

Detalhamentos: a partir do 21º dia de exposição, grupos de 3 fêmeas foram alocadas com um macho até que se verificou a presença de sêmen no esfregaço vaginal. A exposição ao Malathion ocorreu unicamente durante os 21+5 dias pré-gestação, ou seja, um período máximo de até 26 dias. Nosso estudo previa avaliar os efeitos da exposição ao longo do tempo de desenvolvimento da gestação e eventualmente no pós-termo (60 dias após o parto), contudo devido ao grande número de animais que não acasalaram incluímos neste estudo também as fêmeas virgens. Assim, as avaliações ocorreram em três momentos distintos, a saber: i) após 26 dias de exposição ao Malathion (Nulíparas); ii) durante a gestação (Gestante); iii) após 60 dias do parto (Pós-termo).

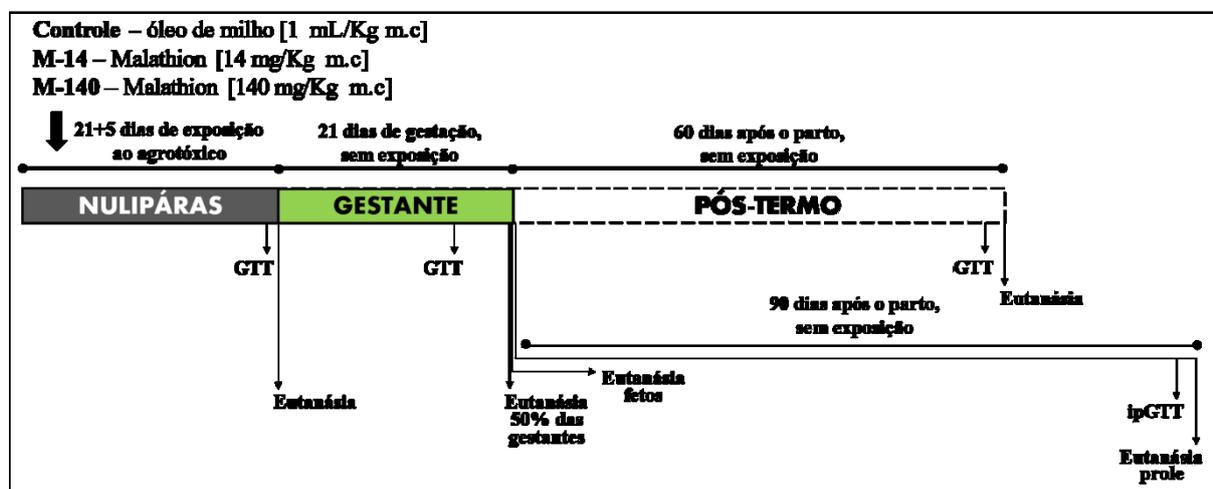
Os parâmetros avaliados nestas fases, foram: massa corpórea, glicemia (AccuChek[®]), resposta à sobrecarga oral de glicose - GTT [2 g/kg, m.c.], perfil lipídico (Biotécnica[®]), insulinemia (PerkinElmer – AlphaLISA), atividade sérica da enzima colinesterase (Analisa[®]), função hepática das enzimas AST-TGO e ALT-TGP (LabTest[®]), função renal através dos níveis de creatinina e uréia plasmática (Biotécnica[®]), perfil hematológico, massa hepática, pancreática e adiposa (tecido

¹⁶ A exposição por 21+5 dias, um período menor do que utilizado nos Piloto I e II, foi realizado como uma forma de garantia, uma vez que segundo nossos ensaios durante este período (30 dias) a glicemia de jejum não era alterada pelo agrotóxico.

adiposo omental, gonadal e retroperíneo), morfologia hepática e pancreática e imuno-histoquímica do pâncreas.

Das ratas gestantes, metade das prenhes foram eutanasiadas no 20º dia de gestação (DG), enquanto a outra metade das prenhes, foi acompanhada até o 60º dia pós-termo (DPT) e a prole foi restrita a 8 neonatos por mãe, 4 machos e 4 fêmeas com pesos próximos ao peso mediano (Franko *et al.*, 2010). Os fetos dos grupos de fêmeas gestante, foram removidos por cesárea, e imediatamente eutanasiados por decaptação. Os fetos tiveram sua massa corpórea e glicemia (AccuChek®) aferidas e as proles adultas (3 meses), dos grupos experimentais, foram avaliadas quanto aos parâmetros: massa corpórea, glicemia (AccuChek®), resposta à sobrecarga oral de glicose - GTT [2 g/kg, m.c.], perfil lipídico de triglicérides, colesterol total e frações circulantes (LabTest®), função hepática das enzimas AST-TGO e ALT-TGP (LabTest®), estresse oxidativo hepático (lipoperoxidação e catalase), morfologia hepática e pancreática e perfil de metilação do DNA (epigenômica). O organograma experimental é representado no Quadro 4, abaixo.

Quadro 4: Organograma do desenho experimental de *Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG*



4.4.4 Exposição ao Malathion em dose ultra baixa: possível efeito como fator de risco no DMG

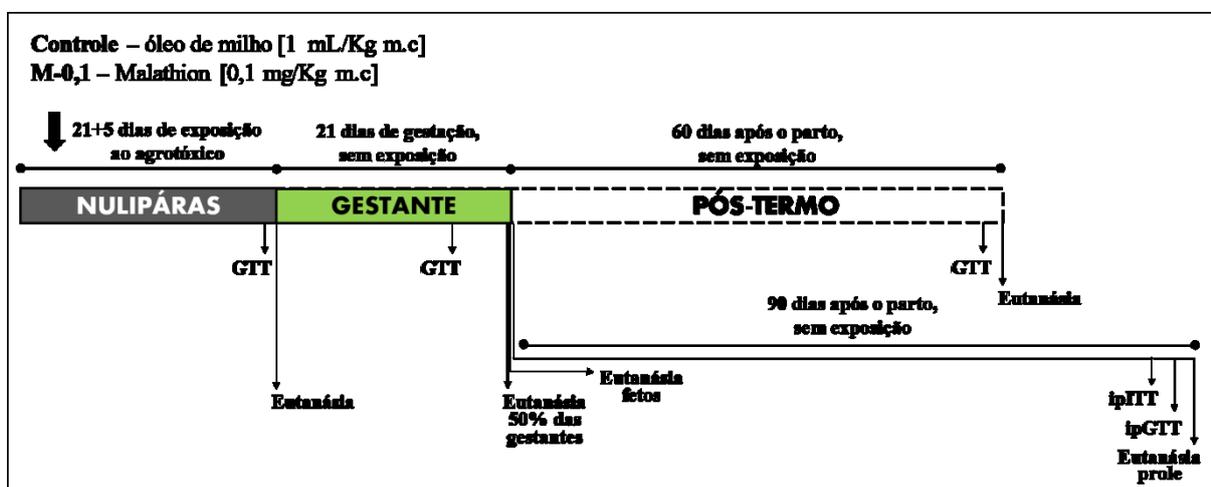
Nesta etapa experimental, foram utilizados 84 animais, 70 fêmeas e 14 machos. Ao atingirem 80 dias de vida (fêmeas adultas) iniciamos o tratamento (tto) com

exposição ao Malathion 1000 EC Cheminova [malationa 1000 g/L (100% m/v) + outros ingredientes 191 g/L (19,1 % m/v)], por meio de gavagem intra-gástrica, diluído em óleo de milho, entre 7:00 e 9:00 hs, por 21+5 dias consecutivos (após 21 dias de exposição as fêmeas foram pareadas com machos, e a exposição ao OP foi mantida até a constatação da cópula, período máximo adicional de até 5 dias). A dose avaliada nesta etapa foi de 0,1 mg/kg m.c. (M-0,1), esta dose corresponde a $\frac{1}{23.030}$ da DL₅₀ para ratos, que é de aproximadamente 2.303 mg/kg m.c. (Cheminova, 2021). O grupo Controle recebeu apenas óleo de milho, veículo utilizado na administração do agrotóxico [1 mL/Kg m.c.].

Detalhamentos: a partir do 21º dia de exposição, grupos de 3 fêmeas foram alocadas com um macho até que se verificou a presença de sêmen no esfregaço vaginal. A exposição ao Malathion ocorreu unicamente durante os 21+5 dias pré-gestação, ou seja, um período máximo de até 26 dias. As avaliações ocorreram em três momentos distintos, a saber: i) após 26 dias de exposição ao Malathion (Nulíparas); ii) durante a gestação (Gestante); iii) após 60 dias do parto (Pós-termo).

Os procedimentos e parâmetros avaliados nas genitoras e suas respectivas proles, foram os mesmos do item anterior, conforme já descrito, ver sessão '4.4.3 Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG', com adição do teste de resposta à sobrecarga de insulina - ITT [1 UI/kg, m.c.] e teste de comportamento. O organograma experimental é representado no Quadro 5, abaixo.

Quadro 5: Organograma do desenho experimental de *Exposição ao Malathion: possível efeito como fator de risco no DMG*



4.4.4.1 Massa Corpórea

A determinação da massa corpórea ocorreu do início da exposição ao Malathion até o momento da eutanásia dos animais. A frequência de aferição deste parâmetro, foi semanal e durante a exposição ao agrotóxico foram realizados ajustes das doses conforme o ganho ou perda da massa global do animal. Parâmetros determinados em balança eletrônica digital (TECNAL, SP, Brasil).

4.4.4.2 Glicemia

A glicemia foi determinada por meio do sistema de fitas (monitor digital) Accu-Check Performa[®] (ROCHE, Brasil), a partir da segunda gota de sangue obtida da ponta da cauda do animal.

4.4.4.3 Teste de Tolerância a Glicose e Delta Glicêmico

Após jejum¹⁷ de 8 horas, os animais tiveram sua glicemia aferida (tempo ‘zero’) e em seguida receberam a administração, de uma solução de D-glicose 50% (m/v) em solução fisiológica (0,9% de NaCl) a 36°C [2 g/Kg de m.c). A glicemia novamente foi aferida à 30, 60 e 120 minutos após a administração da sobrecarga de glicose. Para os ‘*Pilotos 1 e 2*’ o teste foi realizado apenas com os tempos ‘zero’ e 30 minutos após a sobrecarga, sendo as análises expressas como delta glicêmico deste período. Para os ensaios de avaliação de ‘*possível efeito como fator de risco no DMG*’ foram utilizados todos os tempos descritos e as análises expressas também com a determinação da área sob a curva (AUC), calculada pela lei de formação da integral de uma função no plano cartesiano (método de quadratura do trapézio), excluindo-se do cálculo as áreas abaixo da linha de jejum (valores basais). O teste foi aplicado após 24 horas da finalização de exposição oral ao agrotóxico Malathion nos *Pilotos 1 e 2*, e ratas Nulíparas. A avaliação nas gestantes ocorreu no 14º dia de gestação, período equivalente ao último trimestre da gestação humana, enquanto, para os animais Pós-termo o teste ocorreu no 60º dia após o nascimento dos filhotes. A prole adulta, teve o

¹⁷ Jejum realizado na fase clara do ciclo de fotoperíodo dos animais, os ratos de laboratório possuem hábitos noturnos, assim ao apagar das luzes (18:00 hs) estes animais procuram ativamente por alimento. Ao realizar a remoção da ração dos animais na primeira hora da fase do ciclo claro (06:00 hs), momento em que os animais reduzem as suas atividades, tínhamos a garantia que todos os animais estavam alimentados tornando o tempo de jejum entre os animais equitativo. Todos os procedimentos que exigiram jejum foram realizados desta maneira.

teste realizado no dia que antecedeu a eutanásia destes animais. A administração da glicose nos Pilotos 1 e 2 e nas proles adultas (machos e fêmeas) foi realizado por via intraperitoneal, enquanto que para as genitoras (nulíparas, gestantes e pós-termo) foi executado por via intragástrica (oral/gavagem).

4.4.4.4 Teste Intraperitoneal de Tolerância a Insulina

Após o período de jejum de 8 horas, os animais tiveram sua glicemia aferida (tempo ‘zero’) e em seguida receberam a administração, via intraperitoneal, de uma solução de insulina (*Insulina Humalog Regular* - Lilly® 100 UI/mL), preparada em solução fisiológica (0,9% de NaCl) a 10% (m/v) a 36°C [1 UI/Kg de m.c). A glicemia foi monitorada nos tempos 15 e 30 minutos após a administração da insulina. A análise do teste foi realizada pela determinação da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (^KITT (%/min)), que indica o grau de sensibilidade à insulina. O teste foi aplicado no dia que antecedeu o teste de ipGTT. Teste realizado apenas na prole adulta do ensaio de *‘Exposição ao Malathion em dose ultra baixa: possível efeito como fator de risco no DMG’*.

4.4.4.5 Eutanásia dos Animais e Descarte

Após jejum de 8 horas, a eutanásia dos animais foi realizada, para isso houve a exposição previa dos animais à câmara de CO₂, seguido por decapitação em guilhotina para roedores, para coleta de sangue troncular. o sangue do tronco foi coletado em 2 tubos de ensaio de vidro, capacidade 5 mL, previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante E.D.T.A ou Fluoreto de Sódio (Hemstab/Glistab – Labtest®; Lagoa Santa, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 10 min a 4 °C (Eppendorf 5810R) e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -20 °C para posterior análises, alíquotas sobressalientes foram acondicionadas em ultrafreezer -80 °C. A sala onde ocorreu a eutanásia era distinta da sala onde ficavam os demais animais. O ambiente possui exaustão e a sala é composta de mesa central para coleta de material e de bancada lateral com pia. Entre os procedimentos realizados em um animal e outro, a guilhotina, a pia e todo o restante do material foram completamente higienizados com água, detergente e álcool, evitando-se assim, maior estresse para os animais.

Os descartes das carcaças dos animais foram realizados conforme protocolo institucional. Em resumo, foram colocados em sacos plásticos (branco/leitoso) identificados com o símbolo de risco biológico e congelados em freezer (-20°C) destinado para este objetivo no próprio Laboratório. Através de cronograma passado pelo Biotério Central – UFSC, este material biológico foi encaminhado, nas mesmas condições de armazenamento anteriormente especificadas para aguardar coleta.

4.4.4.6 Massa dos Órgãos

Imediatamente após eutanasia dos animais (jejum de 12–14 h), os órgãos de interesse (pâncreas, fígado, tecido adiposo omental, gonadal e retroperitoneal) foram cuidadosamente excisados e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL).

4.4.4.7 Análise Hematológica

Para avaliação de alteração no perfil de células sanguíneas 2 mL de sangue foram coletados separadamente com heparina (Hepamax) e as amostras foram analisadas em leitor hematológico automatizado (Micros 60). Extensões sanguíneas foram realizadas em lâminas para acompanhar e confirmar o percentual de leucócitos (contagem de 100 células por lâmina). O tecido sanguíneo das extensões foi corado com Panótico Rápido (LabTest[®]) a fim de evidenciar os elementos figurados presentes nas amostras, protocolo de coloração seguido de acordo com recomendações do fabricante.

4.4.4.8 Insulinemia

Os níveis de insulina circulantes, foram determinados por meio do kit AlphaLISA[®] (AL204C) (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o plasma dos animais. E mensurado apenas para os grupos experimentais do ensaio de *'possível fator de risco para o DMG'* nos períodos compreendidos: Nulíparas, Gestantes e Pós-termo. A avaliação foi determinada tanto em jejum como no minuto 15 do teste de sobrecarga glicêmica (GTT).

4.4.4.9 Perfil Lipídico

O plasma aliquotado e armazenado a -20 °C foi utilizado para a execução das análises dos níveis de colesterol total, triglicérides e lipoproteínas de alta de densidade circulante (HDL-c), de acordo com instruções do fabricante (Labtest[®] - Lagoa Santa, MG, Brasil). As lipoproteínas circulantes de baixa densidade (LDL-c) e de muito baixa densidade (VLDL-c) foram calculadas segundo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica – SBPC, através da calculadora de lipoproteínas, programa computacional que utiliza como base a equação de Friedewald, disponível através do link: sbpc.org.br/upload/conteudo/InstaladorCalculadora.zip (acesso em janeiro de 2020).

4.4.4.10 Função Hepática

Ensaio cinético foi realizado para determinar a ação enzimática das atividades de AST-TGO e ALT-TGP, através do kit LabTest[®]. A absorbância foi lida a 340 nm, e monitorada fotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ação enzimática da amostra. Os procedimentos foram executados de acordo com instruções do fabricante, e o plasma de todos os animais, com exceção dos fetos, foi utilizado nas análises.

4.4.4.11 Função Renal

Níveis plasmático de uréia e creatinina foram utilizados como forma indireta de determinar a atividade renal. O ensaio foi realizado utilizando Kit colorimétrico Biotécnica[®] seguindo instruções do fabricante. Determinamos a função renal apenas para os grupos experimentais do ensaio de *‘possível fator de risco para o DMG’* nos períodos compreendidos: Nulíparas, Gestantes e Pós-termo.

4.4.4.12 Inibição da Enzima Colinesterase

O plasma aliquotado foi utilizado para determinar a ação plasmática da enzima colinesterase (pseudocolinesterase ou colinesterase II) por espectrofotometria colorimétrica, kit Analisa[®], teste cinético contínuo decrescente. A análise foi executada

no plasma de todos os animais com exceção dos fetos e da prole adulta. Os valores foram expressos em Kat/L.

4.4.4.13 Estresse Oxidativo

Fragmentos hepáticos foram utilizados para a determinação do estresse oxidativo na prole adulta. Foram empregados os métodos de avaliação da atividade de Catalase e Lipoperoxidação. A atividade da catalase foi medida pelo método de Aebi (1974), a reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H₂O₂ e a taxa de consumo do peróxido de hidrogênio foi mensurada através de espectrofotometria a 240 nm. A lipoperoxidação lipídica do tecido hepático foi determinada pela reação ao ácido tiobarbitúrico, e produção de malondialdeído, leitura em 535 nm (Buege & Aust, 1978). Os resultados foram normalizados pela proporção de proteínas presentes nos tecidos.

4.4.4.14 Morfologia dos Tecidos Hepáticos e Pancreático e Imunohistoquímica

Fragmentos dos tecidos hepáticos e pancreáticos foram coletados de cada animal dos grupos experimentais no dia da eutanásia e fixados em formalina tamponada 10% para posterior inclusão em parafina e coloração em Eosina e Hematoxilina. A avaliação da morfologia celular geral dos tecidos foi feita para observação de possíveis danos ou alterações estruturais nos órgãos supracitados, análise qualitativa. A análise da massa de células β , seguiu-se o protocolo descrito por Rafacho *et. al.*, 2008. A massa de células β relativa e absoluta, bem como o número de ilhotas por área pancreática, foram determinados pela morfometria de contagem de pontos em cada seção de pâncreas imunomarcada para insulina, análise quantitativa (Rafacho *et. al.*, 2008; Rafacho *et. al.*, 2010). Os grupos experimentais que passaram por estes testes foram os compreendidos pelo ensaio: '*possível fator de risco para o DMG*' nos períodos temporais Nulíparas, Gestantes e Pós-termo e suas respectivas proles adultas.

4.4.4.15 Metilação do DNA - Epigenômica

Obtenção do DNA - Para obtenção do DNA genômico (gDNA) o tecido hepático foi homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3.0; 0,5% de

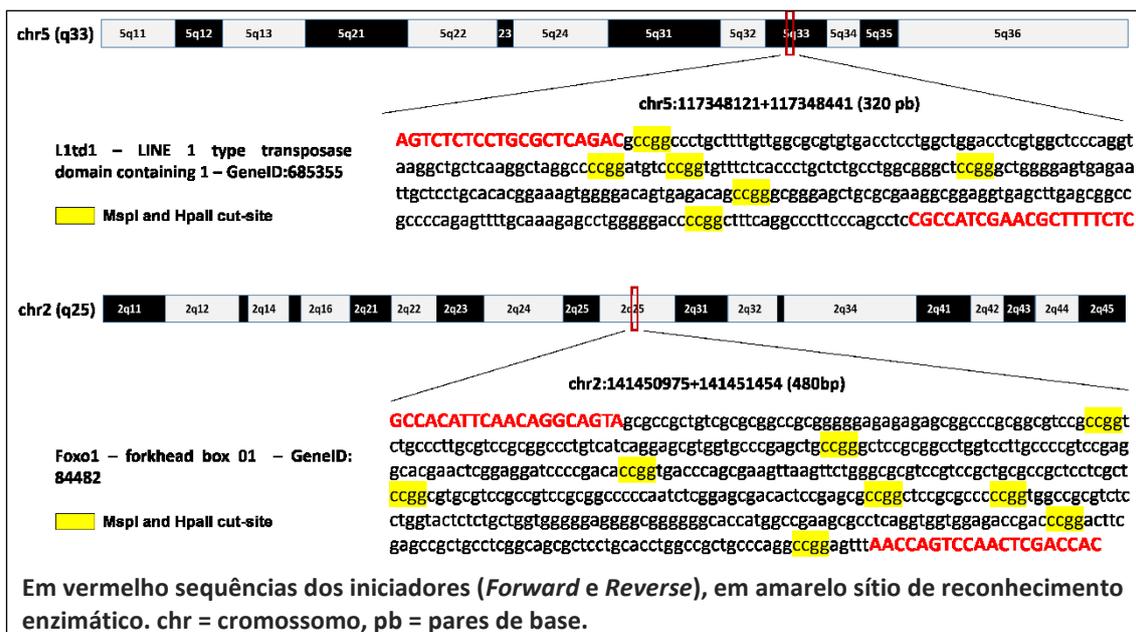
SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteínase K (20 mg/mL) por 16 h a 56°C. Em seguida o DNA foi isolado utilizando o método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Tratamento do DNA – Inicialmente, o DNA genômico foi tratado com a enzima T4- β -glicosiltransferase (T4-BGT) que adiciona glicose ao grupo hidroxil da 5-hidroximetilcitosina pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina, o qual bloqueia a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas. Para isso cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37°C por 2h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4-BGT em reação com volume final de 20 μ l. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina. Este produto bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo integras as regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promove a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μ l a 37°C por 2 horas.

Determinação do padrão de metilação – O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora do gene *Foxo1* (forkhead box O1 – ID: 84482) [F: (5'- GCC ACA TTC AAC AGG CAG TA -3'), R: (5'- GTG GTC GAG TTG GAC TGG TT -3')] e do gene *LITD1* (*LITD1 – LINE1 type transposase domain containing 1* - ID: 685355) [F: (5'- AGT CTC TCC TGC GCT CAG AC -3'), R: (5'-

GAG AAA AGC GTT CGA TGG CG -3')] foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (12,5 µl) 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µl (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhadas em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição (Quadro 6) utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0). A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foram analisadas pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). As análises foram expressas a partir dos valores percentuais referentes à metilação e hidroximetilação de cada gene.

Quadro 6: Representação gráfica da localização cromossômica e fragmento amplificado



4.4.4.16 Expressão Gênica - Genômica

Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) total – O RNA total foi isolado do tecido hepático utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização do tecido em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da

centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados e a fase precipitada desprezada. Em seguida o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em 20 µL de água DEPC, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a -80°C.

Síntese de DNA complementar (cDNA) – O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50° C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/µl e armazenado a -20°C.

Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR) - Para o estudo do padrão de expressão gênica das enzimas implicada nos processos de metilação do DNA [DNA metiltransferase (DNMT1), (DNMT3A) e (DNMT3B)] e desmetilação do DNA [dioxigenases dependentes de 2-oxoglurato (2OG) e ferro II (TET1), (TET2) e (TET3)] e dos genes *Foxo1* e *Line1* as reações foram realizadas com iniciadores específicos (Tabela 1) e tiveram como controle endógeno o gene *18S*. Todas as reações tiveram volume final de 10 µL; contendo 5 µL de SYBR Green I Master, 0,4 µM de iniciadores específicos, 1 µL do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct dos controles utilizados,

resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em triplicata.

Tabela 1: Sequência de Primers utilizado para determinação da Expressão Gênica

Gene (ID)	Iniciador	Condições de reação	Tamanho do fragmento	
Dnmt1 (84350)	Forward	AGG ACC CAG ACA GAG AAG CA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	201 pb
	Reverse	GTA CCG GAA TGC TGA GTG GT		
Dnmt3A (444984)	Forward	AGG AAG CCC ATC CGG GTG CTA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	225 pb
	Reverse	AGC GGT CCA CTT GGA TGC CC		
Dnmt3b (444985)	Forward	TCG ACT TGG TGG TTA TTG TCT G	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	129 pb
	Reverse	TCG AGC TAC AAG ACT GCT TGG		
Tet1 (309902)	Forward	GCC CCT CTT CAT TAC CAA GTC	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	211 pb
	Reverse	CGC CAG TTG CTT ATC AAA ATC		
Tet2 (310859)	Forward	GGT GCC TCT GGA GTG ACT GT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	245 pb
	Reverse	GGA AAA TGC AAG CCC TAT GA		
Tet3 (680576)	Forward	GGC CAG GTC CTG AAA GCT	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	198 pb
	Reverse	CGC CTC ACA GGA GAC AAT C		
Line1 (685355)	Forward	CAA GTC TTC CGC CTT CTG AG	95°C - 10s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	177 pb
	Reverse	GIT TTG CGG GAA CAC ATC TT		
Foxo1 (83618)	Forward	GTGAAC ACC ATG CCT CAC AC	95°C - 10s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	211 pb
	Reverse	CAC AGT CCA AGC GCT CAA TA		
Rn18s (100861533)	Forward	CGG ACA GGA TTG ACA GATT GAT AGC	95°C - 10s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	118 pb
	Reverse	TGC CAG AGT CTC GIT CGT TAT CG		

4.5 Análises Estatísticas

Os dados foram organizados e registrados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2010 com dupla entrada. A análise estatística dos dados foi realizada no programa estatístico graphpad prism v.8.0 (Graphpad Inc.; La Jolla, USA). As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em média e desvio padrão da média (DP) se a distribuição for simétrica ou em mediana e intervalo interquartil se for assimétrica. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A análise de variância de uma via (one way - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey para comparação múltipla de valores paramétricos, ou Kruskal-wallis com *post test* de Dunn, se as variáveis forem assimétricas. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 95% ($p < 0,05$). Particularidades das análises foram apresentadas nas legendas das figuras.

5. Resultados:

5.1 Definição da formulação do agrotóxico Malathion (Piloto 1)

A primeira parte de nosso trabalho buscou estabelecer, através de uma procura em sites da internet, as formulações do agrotóxico Malathion disponíveis para consumo no Brasil. Dos produtos mais comercializados figuraram o Malathion Cheminova 1000 CE, e o Malathion Dipil 500 CE. A fim de reproduzir os efeitos relatados em estudos científicos, visando observar os efeitos clássicos dos OP, estabelecemos um estudo piloto utilizando 20 ratos machos da linhagem *Wistar*, adultos (90 dias), que foram expostos aos agrotóxicos via intra-gástrica (gavagem) em duas distintas doses 70 mg/Kg e 140 mg/Kg de peso corpóreo para cada um dos produtos formulados de Malathion, utilizando como veículo na administração óleo de milho. A exposição ao agrotóxico ocorreu por 30 dias.

Após o período de exposição, não observamos alterações nos níveis basais de glicose (jejum de 8 horas) (Fig. 1A), tampouco na resposta metabólica a sobrecarga intraperitoneal de glicose [2 g/Kg m.c] determinada pelo delta do tempo zero e trinta minutos após a administração de glicose (Fig. 1B). A glicemia avaliada durante o período de exposição, em intervalos de 10 dias, também não alterou entre os grupos (Fig. 1C). No entanto, foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) no desempenho do ganho de massa corporal, relação massa inicial-final, ao término do tratamento, onde os animais expostos ao Malathion formulação Dipil apresentaram menores índices de ganho de massa (Fig. 1E) (D-70: $15,2 \pm 25$ e D-140: $-3,8 \pm 19$ g) quando comparados aos animais que receberam Malathion Cheminova (M-70: $47,8 \pm 11,7$ e M-140 $36,6 \pm 7,8$ g).

A dosagem da atividade da enzima ChE ocorreu antes do início da exposição ao agrotóxico (dia 0) e ao término dos 30 dias de tratamento. Observamos uma inibição na atividade da enzima, que é dependente da dose, quanto maior a dose maior é o efeito inibitório do OP (Fig. 1F) (M-70: $8,640 \pm 0,77$ vs M-140: $7,109 \pm 0,76$ Ktal/L ($p < 0,05$); D-70: $7,956 \pm 0,75$ vs D-140: $6,095 \pm 0,73$ Ktal/L ($p < 0,01$)).

Os tecidos internos: fígado, tecido adiposo omental, tecido adiposo gonadal e tecido adiposo retroperitoneal, glândulas adrenais e baço (expresso como massa lineal) excisados e analisados em seus aspectos macroscópico, não apresentaram quaisquer alterações morfológicas seja no seu aspecto ou na sua massa (Fig. 1I, 1J, 1K e 1L).

A fim de determinar um provável efeito tóxico para a função hepática, avaliamos nos animais os níveis de transaminases AST-TGO e ALT-TGP circulantes no plasma (Fig. 1H). A exposição ao agrotóxico elevou as concentrações plasmáticas de AST-TGO entre os grupos M-70 e D-70 quando comparamos aos grupos M-140 e D-140. Valores de: $24,8 \pm 5,2$ U/L para M-70; $33,2 \pm 10,5$ U/L para D-70; $50,77 \pm 19,8$ U/L para M-140; $111,8 \pm 11,6$ U/L para D-140. Doses elevadas, representaram maior efeitos tóxicos, com significativo efeito do D-140 vs M-140.

Com base nos resultados e tendo em vista que parte das alterações observadas foram significativamente maiores quando utilizado o Malathion da formulação Dipil, definimos que os demais experimentos deveriam seguir utilizando-se o agrotóxico da formulação Cheminova. Levantamos a hipótese de que em parte os resultados observados, em especial o efeito tóxico sobre a enzima AST-TGO, tenha ocorrido pela presença de solvente na formulação do Malathion Dipil 500 CE.

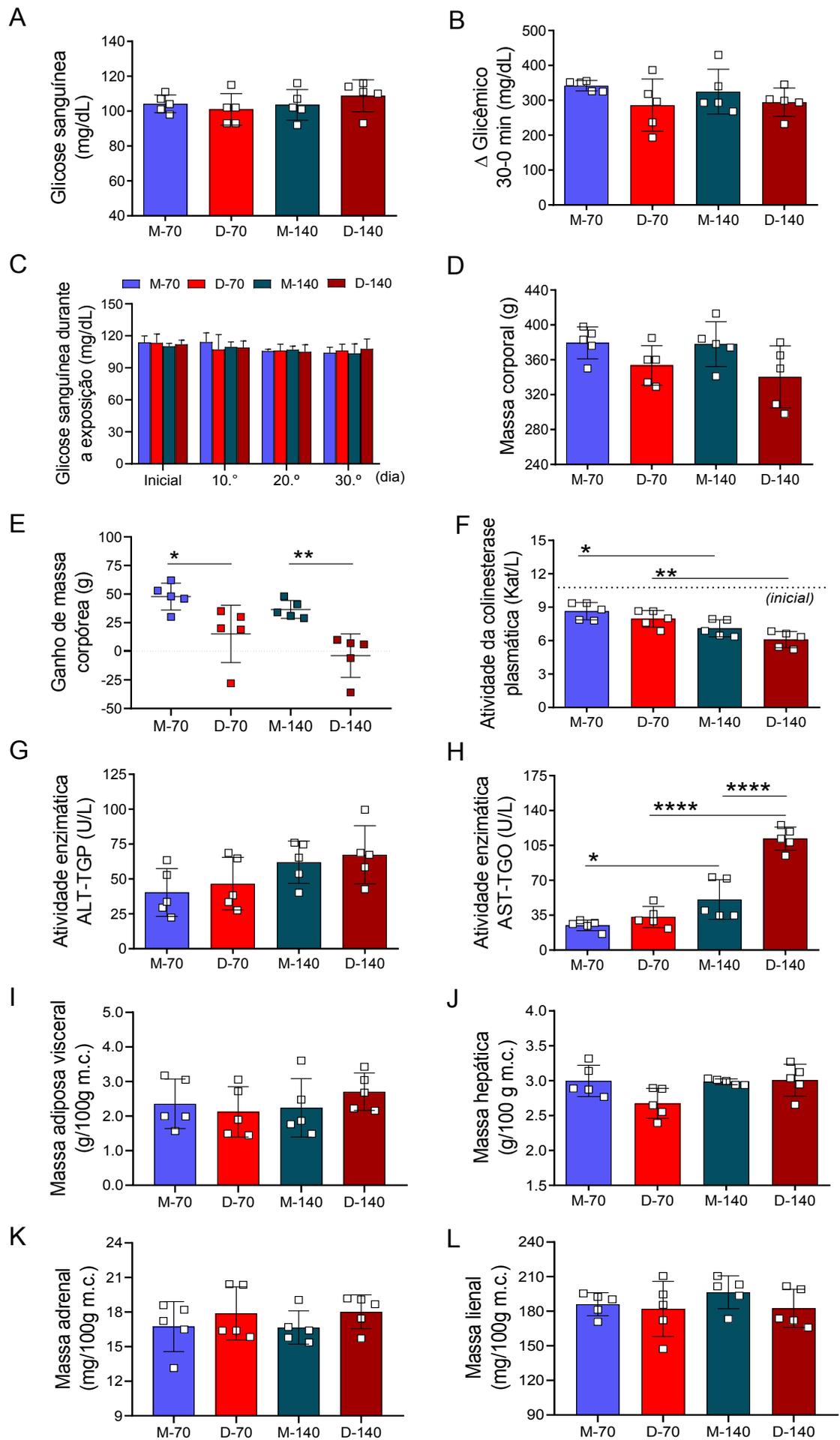


Figura 1: Súmula de dados dos testes de formulações do Malathion – Malathion Dipil[®] e Malathion Cheminova[®], testado em ratos machos adultos (*Wistar*) para parâmetros glicêmicos: A) Glicose sanguínea ao final da exposição, B) Δ glicêmico (0' / 30') sobrecarga de glicose [2 g/Kg de m.c] e C) Glicose sanguínea ao longo da exposição; parâmetro murinométrico: D) massa corporal no final da exposição e E) Δ do massa inicial/final do período de exposição; parâmetro bioquímico: F) atividade enzimática da acetilcolinesterase (ChE); função hepática: G) atividade da enzima ALT-TGP, H) atividade da enzima AST-TGO; e massa dos tecidos internos: I) adiposo visceral (omental, gonadal e retroperitoneal), J) hepático, K) adrenal e L) lineal. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-70 [70 mg/Kg m.c] e M-140 [140 mg/Kg m.c]) e Malathion Dipil (D-70 [70 mg/Kg m.c] e D-140 [140 mg/Kg m.c]). Dados expressos em média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo. Prisma 8.0, ANOVA *post hoc* Tuckey's, * p<0,05 ** p<0,01 **** p<0,0001.

5.2 Definições das doses para o estudo (Piloto 2)

Após a determinação da formulação do Malathion a ser usado, seguimos com um novo estudo para definir as doses de trabalho. Para tanto, 20 ratas adultas (90 dias) da linhagem *Wistar*, foram divididas em quatro grupos experimentais, em três doses distintas, a saber, Malathion 14, 70 e 140 mg/Kg de massa corpórea (grupos experimentais M-14, M-70 e M-140 respectivamente). A exposição ao agrotóxico ocorreu pelo período de 30 dias, através de via intra-gástrica (gavagem) usando óleo de milho como veículo. Grupo Controle recebeu 0 mg/Kg de agrotóxico e óleo de milho 1 mL/Kg de massa corpórea.

Os resultados apontaram não haver quaisquer alterações na homeostase glicêmica em jejum das ratas expostas no final de 30 dias (Fig. 2A) ou quando estas foram submetidas a sobrecarga glicêmica intraperitoneal [2 mg/Kg m.c] (Fig. 2B). As diferentes doses de exposição, também, não alteraram o ganho de massa corpórea (Fig. 2C). Já a inibição sobre a atividade da enzima ChE plasmática, o agrotóxico causou efeito de dose resposta, onde observamos um maior nível de inibição da enzima ($p < 0,0001$) relacionada com o gradativo aumento da concentração do Malathion (Fig. 2D) valores de $12,59 \pm 0,54$ Kat/L para Controle, $10,38 \pm 0,34$ Kat/L para M-14, $8,49 \pm 0,31$ Kat/L para M-70 e $7,22 \pm 0,28$ Kat/L para M-140.

Para os parâmetros de função hepática, avaliados em nosso estudo, os animais expostos a maior dose (140 mg) apresentaram aumento ($p < 0,0001$) das enzimas circulantes ALT-TGP ($96,2 \pm 7,9$ U/L) e AST-TGO ($336,4 \pm 32,1$ U/L), quando comparados aos grupos Controles, M-14 e M-70 (Fig. 2E e 2F). Para a enzima ALT-TGP (Fig. 2E) os grupos M-14 e M-70 apresentaram aumento equivalente quando comparados ao grupo Controle, no entanto este aumento foi menor do que o apresentado pelo grupo M-140 mg. Para a enzima AST-TGO (Fig. 2F) a dose de 14 mg não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos da transaminase quando comparado com os níveis apresentado pelo grupo Controle, já o grupo M-70 ($82,6 \pm 9$ U/L) apresentou este aumento ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo Controle ($34,8 \pm 1,6$ U/L).

A avaliação da massa dos tecidos excisados apontou que houve aumento ($p < 0,001$) da massa hepática na dose de 140 mg de Malathion quando comparado ao grupo Controle (Fig. 2G), e a massa adiposo visceral foi maior ($p < 0,01$) no grupo M-140 e ($p < 0,05$) no grupo M-14 quando comparados ao grupo Controle. A massa adrenal e lineal não alterou (Fig. 2I e 2J).

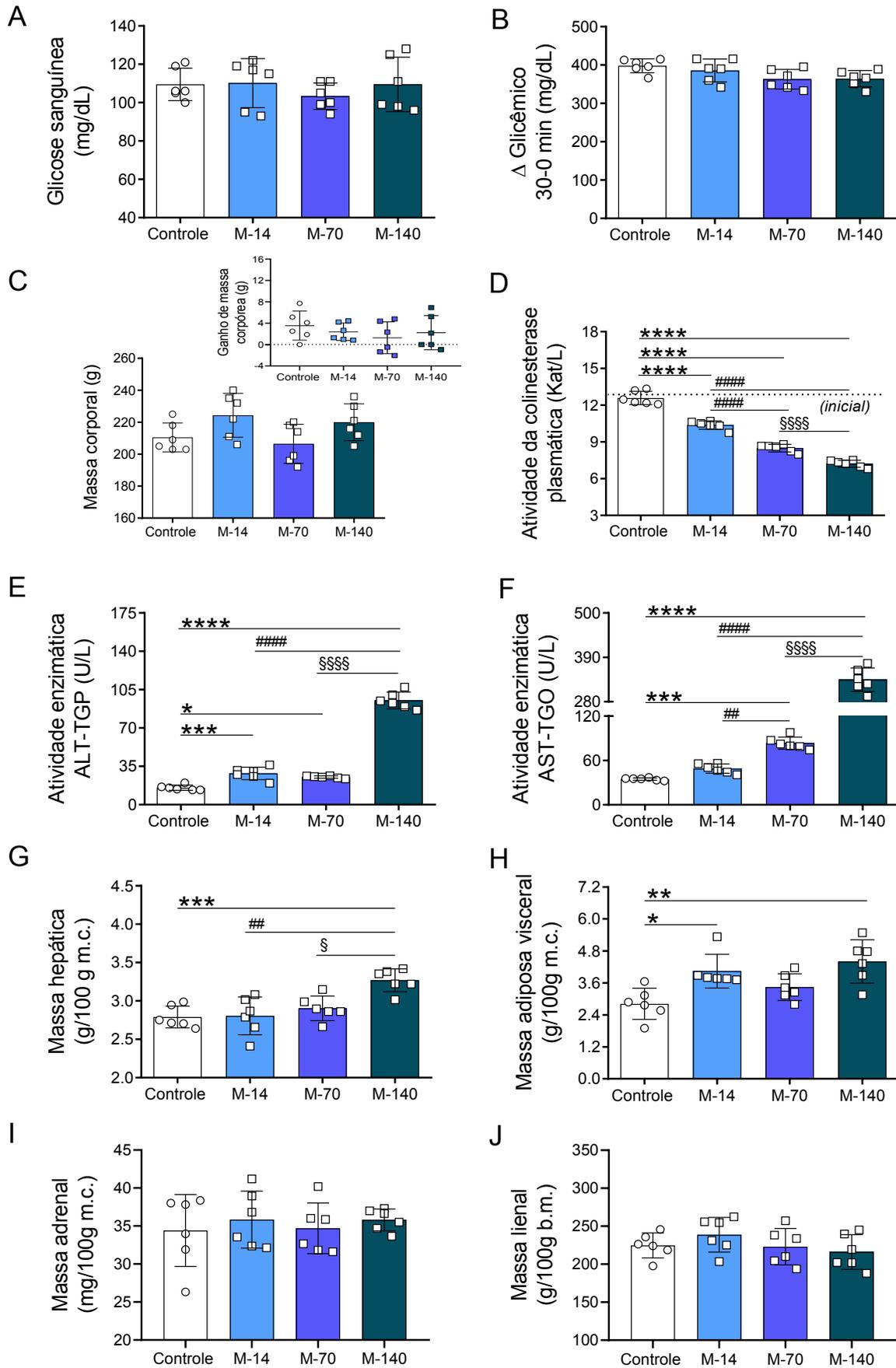


Figura 2: Súmula de dados da definição das doses do Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) para parâmetros glicêmicos: A) Glicose sanguínea, B) Δ glicêmico (0' / 30') sobrecarga de glicose [2 g/Kg m.c]; parâmetro murinométrico: C) massa corporal ao final da exposição (em detalhe Δ do peso inicial/final); parâmetro bioquímico: D) atividade enzimática da colinesterase plasmática (ChE); função hepática: E) atividade da enzima ALT-TGP, F) atividade da enzima AST-TGO; e massa dos tecidos internos: G) hepático, H) adiposo visceral (omental, gonadal e retroperitoneal), I) adrenal, J) lineal. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg m.c], M-70 [70 mg/Kg m.c] e M-140 [140 mg/Kg m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n=5 animais por grupo. Prisma 8.0, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001), Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (##p<0,01 e ####p<0,0001) e Sinal de Corte (§) indica diferença vs M-70 (§p<0,05 e §§§§p<0,0001).

Após análise dos resultados e frente a similaridade das alterações causadas pela exposição entre as doses de 14 e 70 mg, definimos para os grupos de trabalho as doses de Malathion Cheminova de 14 mg/Kg de m.c e a dose de 140 mg/Kg de m.c.

Dos ensaios de possível efeito como fator de risco para o DMG

5.3 Alterações murinométricas causadas pela exposição ao Malathion

Uma vez definidas as doses, os demais experimentos seguiram utilizando ratas expostas as concentrações de 14 e 140 mg/Kg de massa corpórea, acompanhadas do grupo Controle. No total 121 animais foram utilizados, 96 fêmeas e 25 machos (utilizados para a fase de reprodução). As fêmeas foram distribuídas nos grupos experimentais, sendo que 26 animais constituíram o grupo Controle (08 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo), 32 animais o grupo M-14 (14 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo) e 34 animais o grupo M-140 (16 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo). Após 21 dias de exposição ao Malathion as fêmeas foram pareadas com machos por até cinco dias, e separadas mediante constatação do plug vaginal ou presença de sêmen no esfregaço vaginal. Durante os dias de cruzamento os animais continuaram sendo expostos ao agrotóxico. A partir de agora com os três grupos experimentais, a saber, grupo Controle, M-14 e M-140, nas três distintas fases de vida destas fêmeas: Nulíparas, Gestantes e Pós-termo.

A exposição ao Malathion não alterou o ganho de massa corporal em nenhuma das fases de vidas das ratas (Fig. 3D, 3E e 3F) os gráficos também demonstram a massa corporal dos animais antes da exposição ao agrotóxico (Fig. 3A, 3B e 3C). Nas fêmeas nulíparas não foram observadas alterações de massa adiposa e hepática (Fig. 3G e 3J, respectivamente), entretanto no 20° DG os animais expostos ao OP apresentaram aumento ($p < 0,05$) da massa adiposa quando comparado ao grupo Controle (Fig. 3H). Já no 60° DPT, a exposição ao Malathion durante o período que antecedeu a gestação, promoveu o aumento hepático no grupo M-140 ($3,02 \pm 0,15$ g/100g m.c) quando comparados com o grupo Controle ($2,82 \pm 0,09$ g/100g m.c) (Fig. 3L). A massa adiposa foi elevada, tanto na gestação quanto no pós-termo, nos grupos expostos ao agrotóxico quando comparados com fêmeas sem exposição (Fig. 3H e 3I).

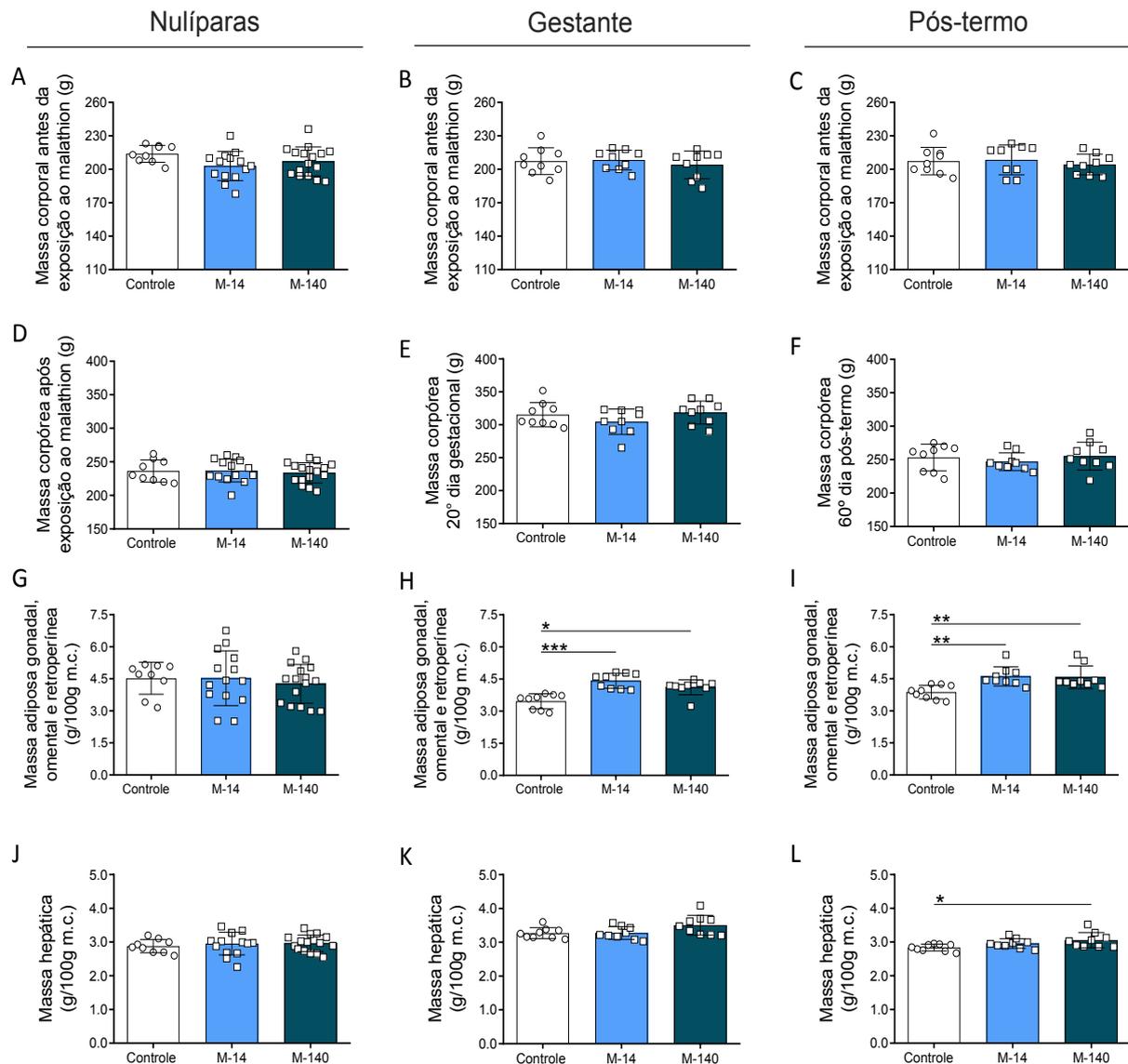


Figura 3: Alterações murinométricas de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) para parâmetros murinométricos de massa corporal antes da exposição ao OP: A) Nulíparas, B) 20° DG e C) 60° DPT e após a exposição D) Nulíparas, E) 20° DG e F) 60° DPT; Massa adiposa (omental, gonadal e retroperitoneal): G) Nulíparas, H) 20° DG e I) 60° DPT; Massa hepática: J) Nulíparas, K) 20° DG e L) 60° DPT; Onde 20° DG = vigésimo dia de gestação, 60° DPT = sexagésimo dia pós-termo. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, n=8-16 animais por grupo. Prisma 8.0, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

5.4 Malathion como um fator de risco para o DMG

A determinação de que se o OP Malathion poderia ser um fator de risco para o DMG, se deu por exposição previa ao agrotóxico por 21+5 dias antes do concepto. Os resultados apontaram não haver alterações na glicemia em jejum nos animais, em nenhum dos estágios avaliados durante o estudo (Fig. 4D, 4E e 4F). Quando os animais foram submetidos ao teste de sobrecarga glicêmica (Fig. 4A, 4B e 4C) observamos que a gestação foi um insulto determinante para redução da capacidade de resposta a sobrecarga de glicose, pois as ratas Nulíparas não apresentam diferenças na performance do teste GTT (Fig. 4A) complementado pela AUC (Fig. 4M). Os gráficos de 60 e 120 minutos (Fig. 4G e 4J) evidenciam a similaridade da resposta entre os grupos. Contudo na Gestação e no Pós-termo a intolerância é observada de forma dose dependente (Fig. 4B e 4C) detalhes evidenciados na AUC (Fig. 4N e 4O). O GTT, no 14° DG, é um teste similar utilizado por gestantes (em humanos) para diagnóstico do DMG (75 g de solução de glicose via oral) no último trimestre gestacional, e apontou que o grupo M-140 apresentou DMG, conforme observado pelos valores de glicemia 60 minutos após a sobrecarga de glicose ($276 \pm 73,2$ mg/dL) (Fig. 4H), a manutenção da elevação glicêmica em valores que ultrapassam 180 mg/dL, 60 minutos após a sobrecarga, é critério para este diagnóstico. A tolerância reduzida também esteve presente no grupo M-14 tanto 60 como em 120 minutos (Fig. 4H e 4K) após o teste. É interessante notar que os efeitos sinérgicos (exposição+gestação) perduram no Pós-termo.

Em suma, estes resultados denotam a importância do efeito gestacional no balanço glicêmico e determina o OP Malathion como um fator de risco para o DMG quando estes animais são expostos a altas doses [140mg/Kg de m.c] do agrotóxico por um período que antecede a prenhez destes animais.

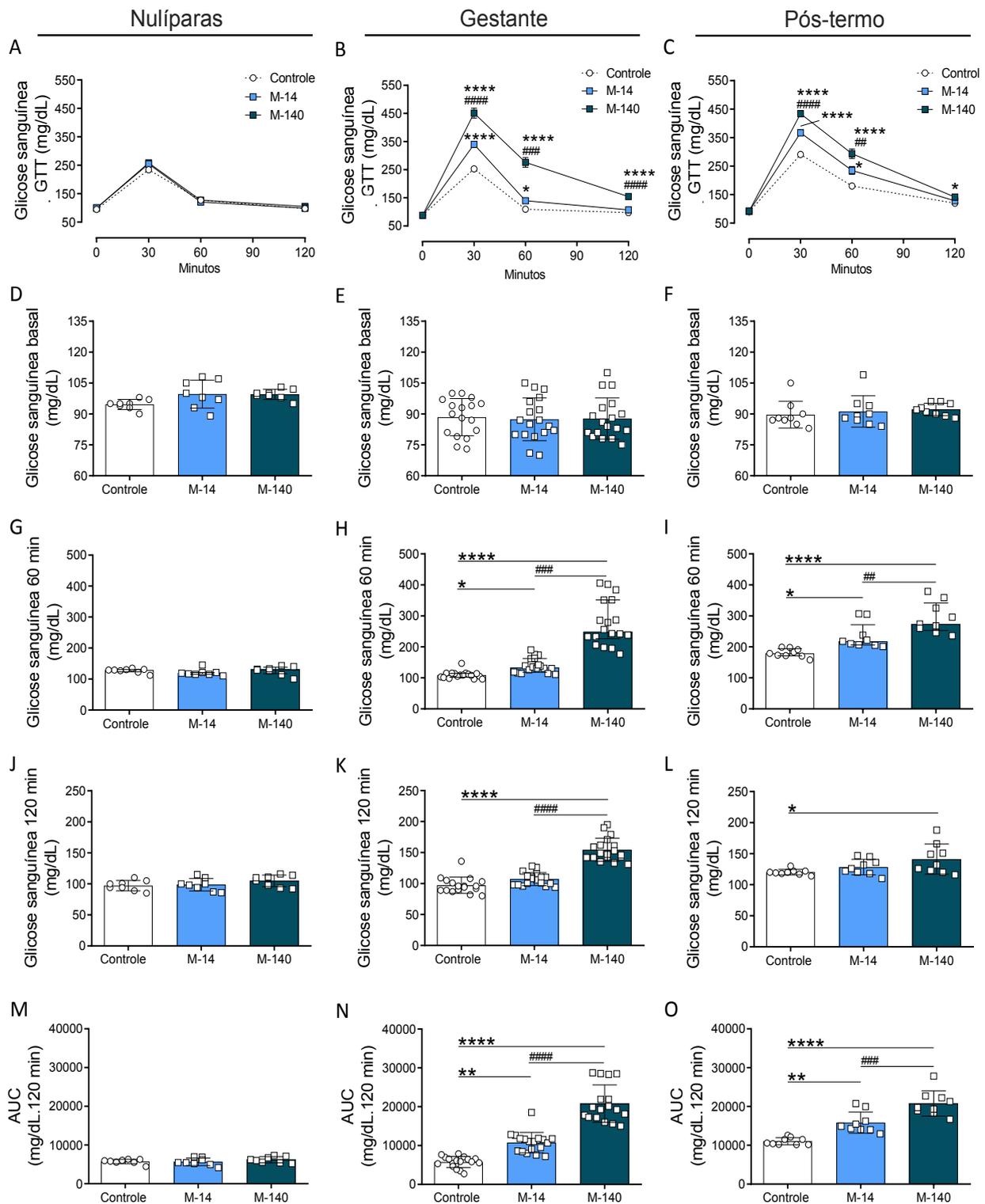


Figura 4: Níveis glicose sanguínea durante o teste de sobrecarga de glicose em ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Performance geral do GTT: A) Nulíparas, B) Gestantes 14^o DG e C) 60^o DPT; Glicose sanguínea basal (jejum, 8 horas): D) Nulíparas, E) Gestantes e F) Pós-termo; Glicemia 60 minutos após sobrecarga intraperitoneal de glicose: G) Nulíparas, H) Gestantes e I) Pós-

termo; Glicemia 120 minutos após sobrecarga intraperitoneal de glicose: J) Nulíparas, K) Gestantes e L) Pós-termo; Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (GTT): M) Nulíparas, N) Gestantes e O) Pós-termo. Onde 14° DG = décimo quarto dia de gestação, 60° DPT = sexagésimo dia pós-termo. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A, B, C, D, E, F, J, K, L, M, N e O. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em G, H e I. Prisma 8.0, n=8-16 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e ****p<0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (##p<0,01, ###p<0,001 e ####p<0,0001).

5.5 Inibição da atividade da enzima ChE e níveis de Insulina em jejum e alimentado

Para validação do modelo de exposição ao OP, foi avaliada a atividade da enzima ChE no plasma, os resultados reproduziram os dados apresentados no Piloto 2 (Fig. 2D). As fêmeas nulíparas (Fig. 5A), expostas ao Malathion (M-14 e M-140) apresentaram reduções significantes ($p<0,01$ e $p<0,0001$) na atividade enzimática, a inibição foi dose dependente quando comparado ao grupo Controle. Durante a gestação não houve alterações nas atividades desta enzima (Fig. 5B). Entretanto, no período de 60 dias pós-termo observamos um aumento na atividade enzimática da ChE no grupo Controle (de $10,9\pm 0,6$ para $16,6\pm 1,8$ Kat/L) quando comparado aos animais expostos ao Malathion (grupos M-14 e M-140) como apresenta a Figura 5C. Os animais expostos a dose de 14 mg (M-14) também apresentaram um aumento ($p<0,001$) da atividade enzimática ($13,2\pm 0,5$ Kat/L) quando comparado ao grupo M-140. O grupo M-140 foi incapaz de manter a atividade da enzima no período Pós-termo (Fig. 5C), já que na Gestação, tanto o grupo M-14 quanto o M-140 reestabeleceram a atividade enzimática (Fig. 5B e 5C).

As concentrações de insulina circulante (plasma) em jejum (8 horas) também foram investigadas, e não alterou entre os grupos após a exposição ao agrotóxico (Fig. 5D), na Gestação (Fig. 5E) ou no Pós-termo (Fig. 5F). Durante o GTT (minuto 15), amostras de plasma foram coletadas e analisadas para determinação da concentração de insulina em estado alimentado (sobrecarga glicêmica). Após a exposição ao Malathion (Nulíparas), não observamos alterações das concentrações de insulina em estado alimentado nos animais do grupo Controle e M-14, contudo, o grupo M-140 (Fig. 5G) apresentou maiores ($p<0,05$) índices de insulina quando comparado com o grupo M-14. Durante a Gestação, as concentrações de insulina circulante, em estado alimentado, estavam reduzidas ($p<0,05$) no grupo M-140 ($306,7\pm 187,3$ pg/mL) quando comparadas com o grupo Controle ($572,7\pm 188,1$ pg/mL) (Fig. 5H). No Pós-termo, a insulina em estado alimentado, foi elevada no grupo M-14 ($p<0,05$) na comparação com o Grupo Controle e grupo M-140 (Fig. 5I).

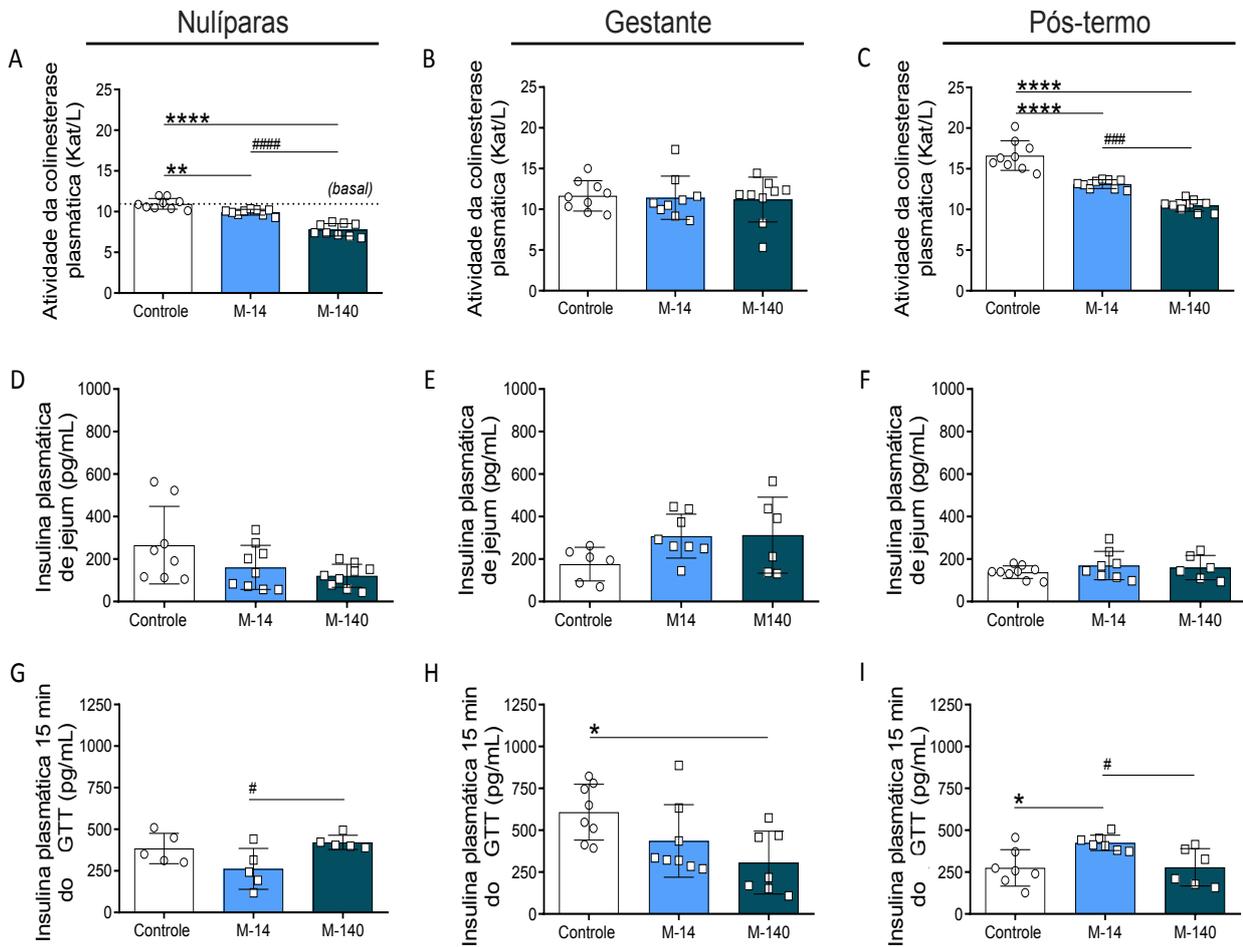


Figura 5: Atividade enzimática da ChE e concentrações de insulina em jejum e no estado alimentado de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion – Malathion Cheminova®, testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Atividade plasmática da enzima ChE: A) Nulíparas, B) Gestantes e C) Pós-termo; Concentrações de insulina em jejum (8 horas): D) Nulíparas, E) Gestantes e F) Pós-termo; Concentrações plasmática de insulina no estado alimentado (GTT) durante o minuto 15 após a sobrecarga glicêmica - GTT [2 g/Kg m.c]: G) Nulíparas, H) Gestantes e I) Pós-termo. Onde GTT = teste de tolerância a glicose. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=5-9 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (* p <0,05, ** p <0,01 e **** p <0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (# p <0,05, ### p <0,001 e #### p <0,0001).

5.6 Análises quantitativas da massa de células beta por imunofluorescência

A fim de entender as alterações das concentrações de insulina no estado alimentado, ocorridas durante a gestação (Fig. 5H), e a intolerância apresentada durante o desempenho do GTT na gestação (Fig. 4B) e no pós-termo (Fig. 4C), avaliamos quantitativamente a massa de células beta nestes dois períodos para os grupos estudados.

As análises imuno-histoquímicas por fluorescência, micrografias apresentadas na Figura 6A, revelaram que a massa de células beta não alterou na gestação ou no período Pós-termo. As massas relativas de célula beta são graficamente apresentadas na Figura 6B, a massa absoluta de células beta na Figura 6C e a massa absoluta de células beta normalizado por 100g de peso corpóreo são demonstrados na Figura 6D. A massa relativa de células beta (área - %) não foi alterada, na Gestação e Pós-termo, contudo, a massa absoluta (mg) destas células reduziu ($p=0,041$) no período Pós-termo nos animais Controles quando comparamos estes animais com os Controles na Gestação (*teste t-Student*) (Fig. 6C). Quando estes dados são normalizados pela massa corpórea (mg/100 g de m.c) a diferença não é mais observada e revela-se um aumento ($p=0,007$) na massa absoluta das células beta nas fêmeas expostas ao Malathion (M-14), na Gestação quando comparamos este grupo com o Pós-termo (Fig. 6D).

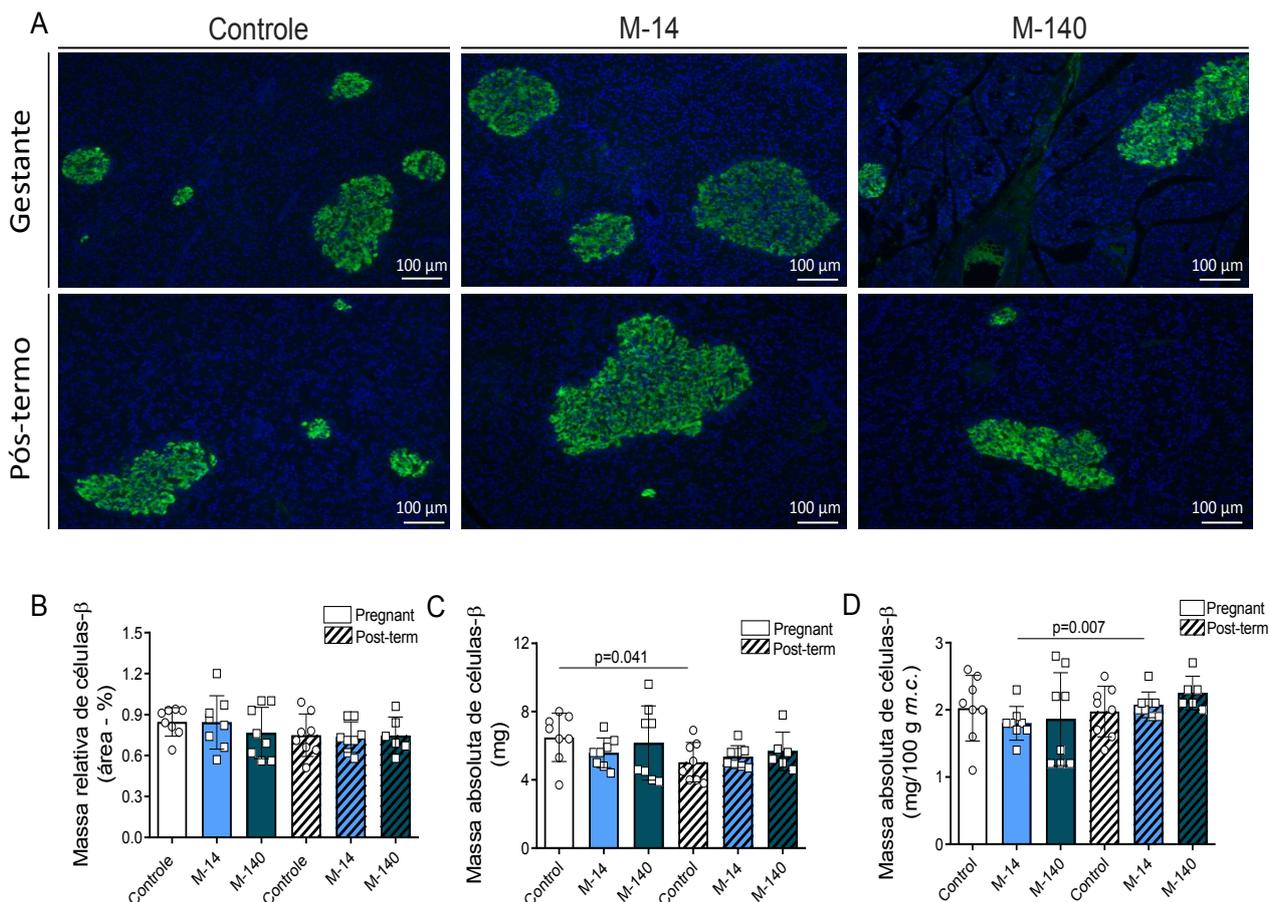


Figura 6: Análise quantitativa por imunofluorescência das células beta pancreática, em Gestantes e no Pós-termo, em pâncreas de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova®, testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. A) Fotomicrografia representativas da imunofluorescência, marcação para células beta (produtoras de insulina) dos grupos Controle, M-14 e M-140 na Gestação e no Pós-termo; B) Massa relativa de células beta, Gestação vs. Pós-termo, para os grupos Controle, M-14 e M-140; C) Massa absoluta de células beta, Gestação vs. Pós-termo, para os grupos Controle, M-14 e M-140; D) Massa absoluta de células beta normalizadas por 100g de m.c, Gestação vs. Pós-termo, para os grupos Controle, M-14 e M-140. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's para análise entre as diferentes doses e teste *t-Student* não pareado para análise da dose: Gestação vs. Pós-termo. Prisma 8.0, n=6-8 animais por grupo. Diferença estatística indicada pelo valor de 'p' nos gráficos.

5.7 Perfil lipídico: triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL)

A exposição ao Malathion levou a um aumento nos depósitos de tecido adiposo (omental, gonadal e retroperitoneal) na gestação e no período pós-termo (Fig. 3H e 3I). Em vista disto, avaliamos o perfil lipídico dos grupos experimentais a fim de identificar quaisquer alterações nas frações plasmáticas de lípidos circulantes nos diferentes períodos de vida das ratas (Nulíparas, Gestantes e Pós-termo). As concentrações de triglicérides não alteraram entre os grupos após a exposição ao Malathion (Fig. 7A).

Durante a gestação as concentrações de triglicérides aumentam de forma fisiológica, como uma resposta a este período do desenvolvimento, entretanto, observamos que neste período as ratas expostas ao agrotóxico (M-14 e M-140) apresentaram um aumento significativo nas concentrações ($369,9 \pm 72$ e $396,5 \pm 66,2$ mg/dL) quando comparados com o grupo Controle ($266,3 \pm 52$ mg/dL), não exposto ao OP (Fig. 7B), este aumento ocorreu independente da dose de exposição.

No período Pós-termo observamos que os valores decrescem e a diferença significativa apresentada pelos grupos expostos ao agrotóxico desaparece (Fig. 7C).

As concentrações de colesterol total aumentaram ($p < 0,01$) no grupo M-140 ($270,2 \pm 58,2$ mg/dL), logo após a exposição ao OP, quando comparado ao grupo Controle ($150,9 \pm 29,3$ mg/dL) (Fig. 7D). Este aumento, perdurou na gestação ($p < 0,01$), M-140 comparado aos grupos Controle e M-14, conforme demonstrado na Figura 7E, Colesterol total de $333,5 \pm 61,4$ mg/dL para o grupo M-140. No período Pós-termo (Fig. 7F) nenhuma alteração nas concentrações deste lipídeo foi constatada.

As frações de colesterol HDL foram avaliadas nos três períodos de vida destas ratas, e somente logo após a exposição ao agrotóxico o grupo M-140 apresentou elevação ($p < 0,05$) das concentrações desta fração lipídica ($85,2 \pm 11,6$ mg/dL) quando comparado com o grupo experimental M-14 ($66,8 \pm 14,2$ mg/dL) (Fig. 7G).

A avaliação da fração LDL do colesterol revelou ser um risco para os animais expostos ao Malathion, nossos dados demonstraram que após a exposição com o agrotóxico, as ratas (M-14 e M-140) apresentaram elevação nas concentrações desta fração lipídica em comparação ao Controle, conforme apresentado no gráfico da Figura 7J, valores respectivos de ($129,2 \pm 61,8$ e $158,9 \pm 49,9$ mg/dL), grupo Controle apresentando valores de $62,5 \pm 34,1$ mg/dL. Durante a gestação as concentrações de

colesterol LDL foram elevadas somente no grupo M-140 ($204,6 \pm 54,6$ mg/dL) quando comparado com o grupo M-14 (Fig. 7K). Já no período Pós-termo, não observamos alterações na fração de colesterol LDL circulante (Fig. 7L).

As frações de VLDL também foram calculadas, e somente durante a gestação, foram observadas elevação nas concentrações destes lipídes nos animais expostos ao Malathion (M-14 e M-140 ($72,6 \pm 14,1$ e $77,7,2 \pm 13,2$ mg/dL)) quando comparados com o grupo Controle (Fig. 7N ($52,7 \pm 9,8$ mg/dL)). Conforme é possível observar nas Figuras 7M e 7O, a exposição ao OP não alterou as concentrações do colesterol plasmático (fração VLDL).

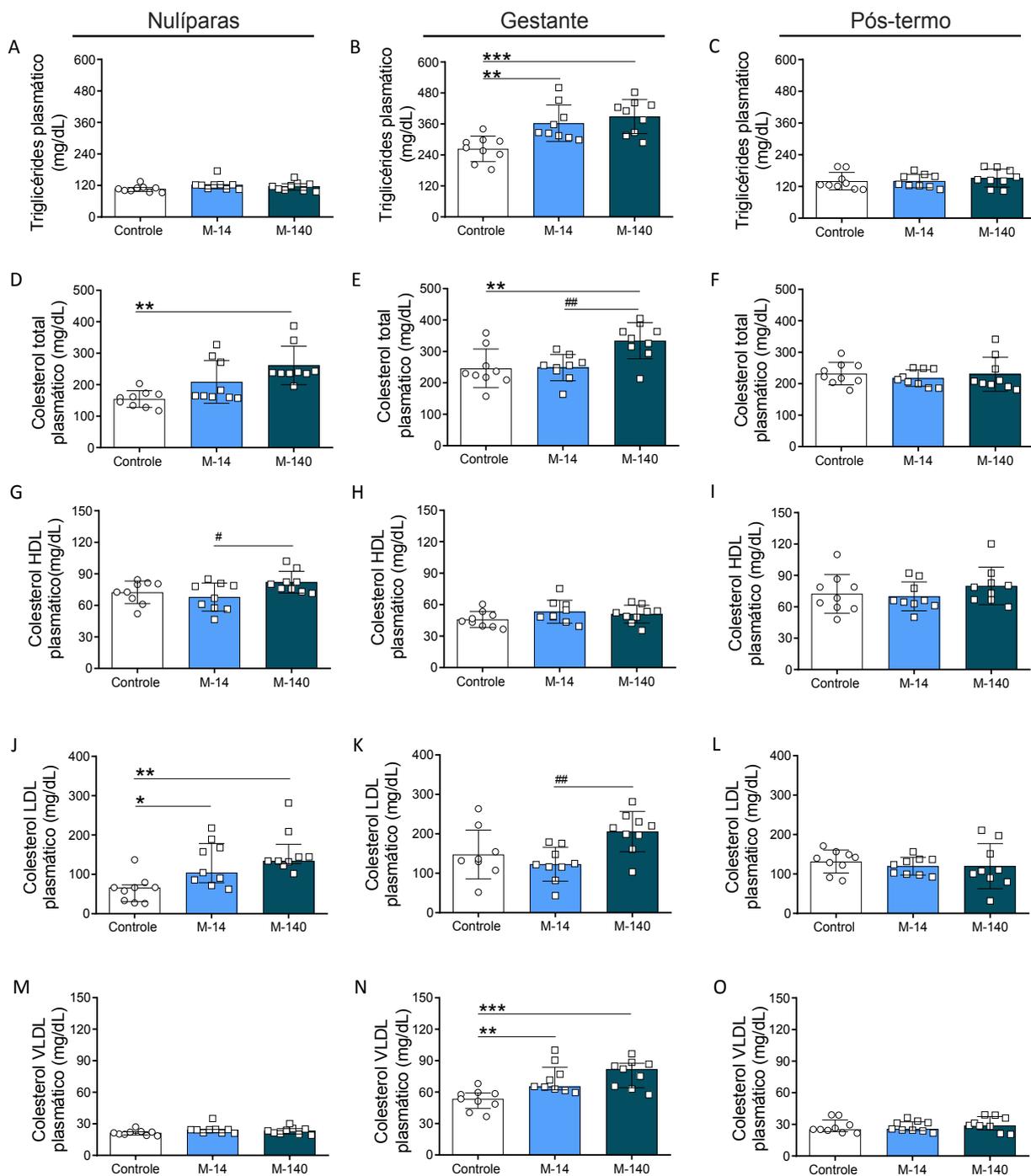


Figura 7: Determinação das concentrações plasmática de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias, avaliações realizadas após o tratamento em animais Controle, M-14 e M-140. Concentrações de Triglicérides: A) Nulíparas; B) Gestantes; C) Pós-termo. Concentrações de Colesterol total: D) Nulíparas; E) Gestantes; F) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração HDL: G) Nulíparas; H) Gestantes; I) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração LDL: J) Nulíparas; K) Gestantes; L) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração VLDL: M) Nulíparas; N) Gestantes; O) Pós-termo. Onde HDL = lipoproteínas de alta densidade, LDL = lipoproteínas de baixa densidade, VLDL = lipoproteínas de muito baixa densidade. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo

de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A, B C, D, E, F, G, H, I, K, L, M e O. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em J e N. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Amostra plasma. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (^{##}p<0,01).

5.8 Avaliações das funções renal e hepática

A metabolização e eliminação de componentes tóxicos ao organismo envolvem diretamente o fígado e os rins, quanto maior o efeito tóxico, maior o dano causado a estes tecidos, levando a alterações na função dos mesmos. Para determinar a integridade da função renal avaliamos as concentrações plasmática de uréia e de creatinina, os resultados apontaram não haver prejuízos causados às funções deste tecido nos grupos Controle, M-14 e M-140 em todos os períodos avaliados, após a exposição: nulíparas, gestação ou pós-termo (Fig. 8A, 8B, 8C, 8D, 8E e 8F).

A função hepática foi determinada pela concentração enzimática das transaminases glutâmica oxalacética (aspartato aminotransferase) e pela atividade da enzima transaminase glutâmica pirúvica (alanina aminotransferase) no plasma. Essas enzimas são liberadas no sangue em grandes quantidades quando há dano à membrana do hepatócito. A avaliação realizada após a exposição ao agrotóxico apontou que quanto maior a dose de exposição, maior é a concentração plasmática da enzima, o grupo M-140 apresentou as maiores concentrações de ALT-TGP ($335,2 \pm 47,8$ U/L) quando comparados com os grupos Controle e M-14 (Fig. 8G), e o grupo M-14 ($94,7 \pm 24,9$ U/L) apresentou elevação significativa quando comparado ao grupo Controle ($43,4 \pm 6,0$ U/L). No entanto, na gestação, as concentrações desta enzima no grupo M-14 ficaram equiparada ao do grupo Controle, destacando a elevação significativa do grupo M-140 ($325,5 \pm 142,0$ U/L) quando comparados aos demais grupos experimentais (Controle e M-14), conforme a Figura 8H. No pós-termo, a exacerbação do efeito dose dependente voltou a aparecer, conforme pode ser observado pelas concentrações dos grupos M-14 e M-140 ($84,6 \pm 11,0$ e $219,1 \pm 24,8$ U/L) quando comparados com o grupo Controle ($28,4 \pm 5,9$ U/L), e a significativa diferença entre os grupos expostos ao Malathion (M-14 vs M-140) onde uma maior concentração da enzima foi apresentada pelo grupo M-140 (Fig. 8I).

As avaliações após exposição (fêmeas nulíparas), durante a gestação (no vigésimo dia) e no pós-termo, apontaram que para a enzima AST-TGO houve um aumento nas concentrações circulantes no grupo exposto a maior dose (M-140) quando comparados aos grupos Controle e M-14 (Fig. 8J, 8K e 8L). É possível observar nas nulíparas (Fig 8J) que o aumento enzimático foi dose dependente frente à exposição de Malathion, entre os grupos estudados (Controle $11,9 \pm 2,5$; M-14 $36,0 \pm 2,9$; M-140 $161,5 \pm 28,3$ U/L).

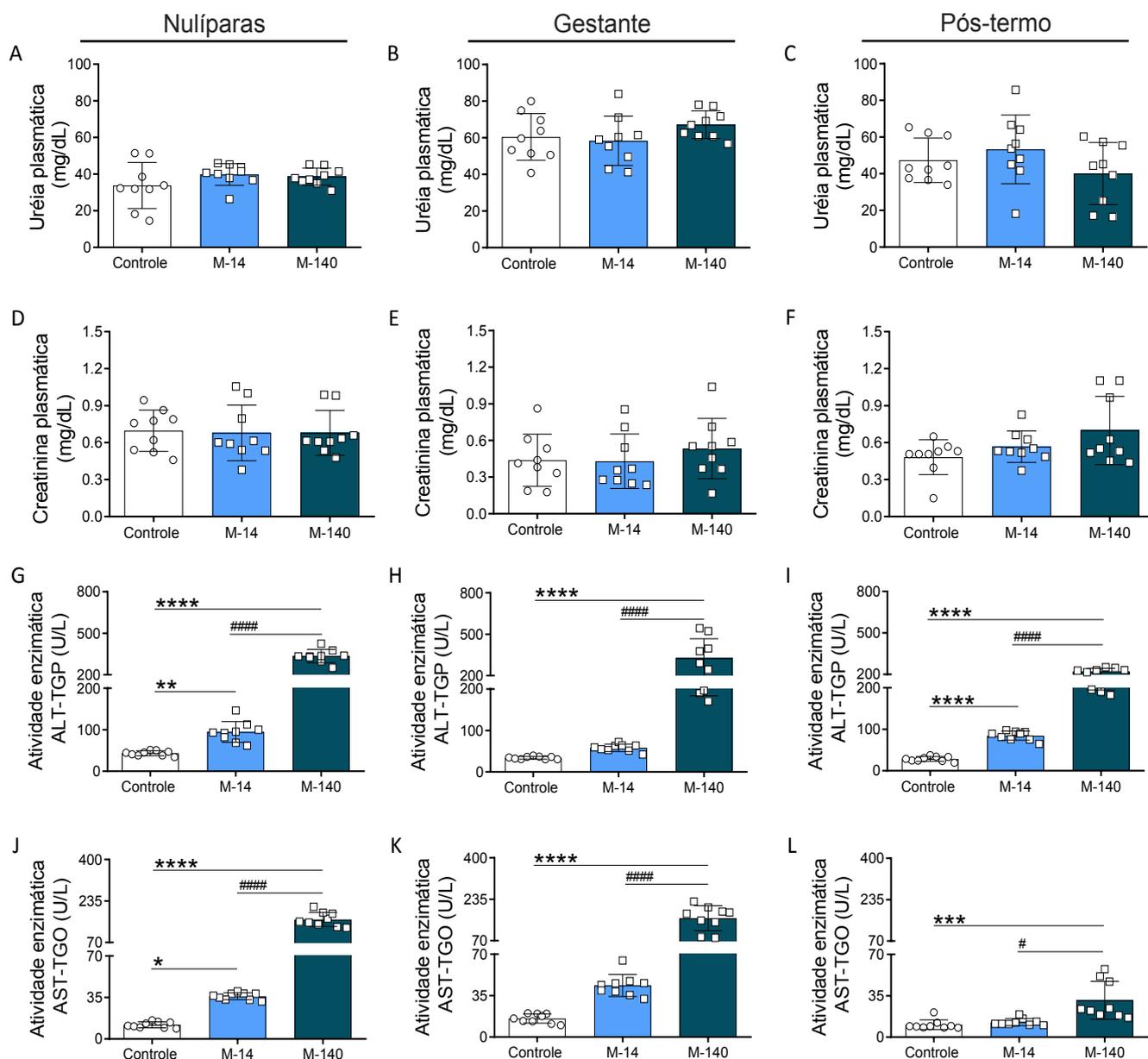


Figura 8: Avaliação da função renal e hepática pelas concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética – TGO e transaminase glutâmico pirúvica- TGP, de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias, avaliações realizadas após o tratamento em animais Controle, M-14 e M-140. Concentrações de Uréia: A) Nulíparas; B) Gestantes; C) Pós-termo. Concentrações de Creatinina: D) Nulíparas; E) Gestantes; F) Pós-termo. Concentrações da enzima ALT-TGP: G) Nulíparas; H) Gestantes; I) Pós-termo. Concentrações da enzima AST-TGO: J) Nulíparas; K) Gestantes; L) Pós-termo. Amostras plasmáticas. Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (#p<0,05 e #####p<0,0001).

5.9 Avaliação qualitativa da morfologia hepática (prancha histológica)

Devido às alterações da função hepática observadas nas avaliações indiretas das concentrações circulantes de AST-TGO e ALT-TGP, realizamos microtomia do fígado para avaliar qualitativamente eventuais danos a morfologia deste tecido. A partir das secções histológicas coradas em HE montamos a prancha apresentada na Figura 9 onde são apresentados nas colunas os três grupos experimentais: Controle, M-14 e M-140; E nas linhas os períodos avaliados em aumentos de 200X e 600X: Nulíparas; Gestantes; Pós-termo.

A observação microscópica do fígado dos grupos Controle, nos três estágios avaliados (nulíparas, gestantes e pós-termo), mostrou o parênquima tecidual com configuração regular e compacta com células hepáticas bem organizadas e estrutura central (veia) em estado normal (setas amarelas), os sinusoides aparecem como áreas claras entre os cordões de células. As secções histológicas dos grupos expostos ao Malathion (grupos M-14 e M-140) apresentaram alterações morfológicas nos três períodos avaliados (nulíparas, gestação e pós-termo). É possível observar danos no tecido hepático, indicados pela seta preta, evidenciando aumento proeminente da veia central, dilatação dos sinusoides e hepatócitos com citoplasma abundante e claro, devido a entrada de água (degeneração hidrópica) condizente com o grau de injúria hepatotóxica do OP administrado (Fig. 9).

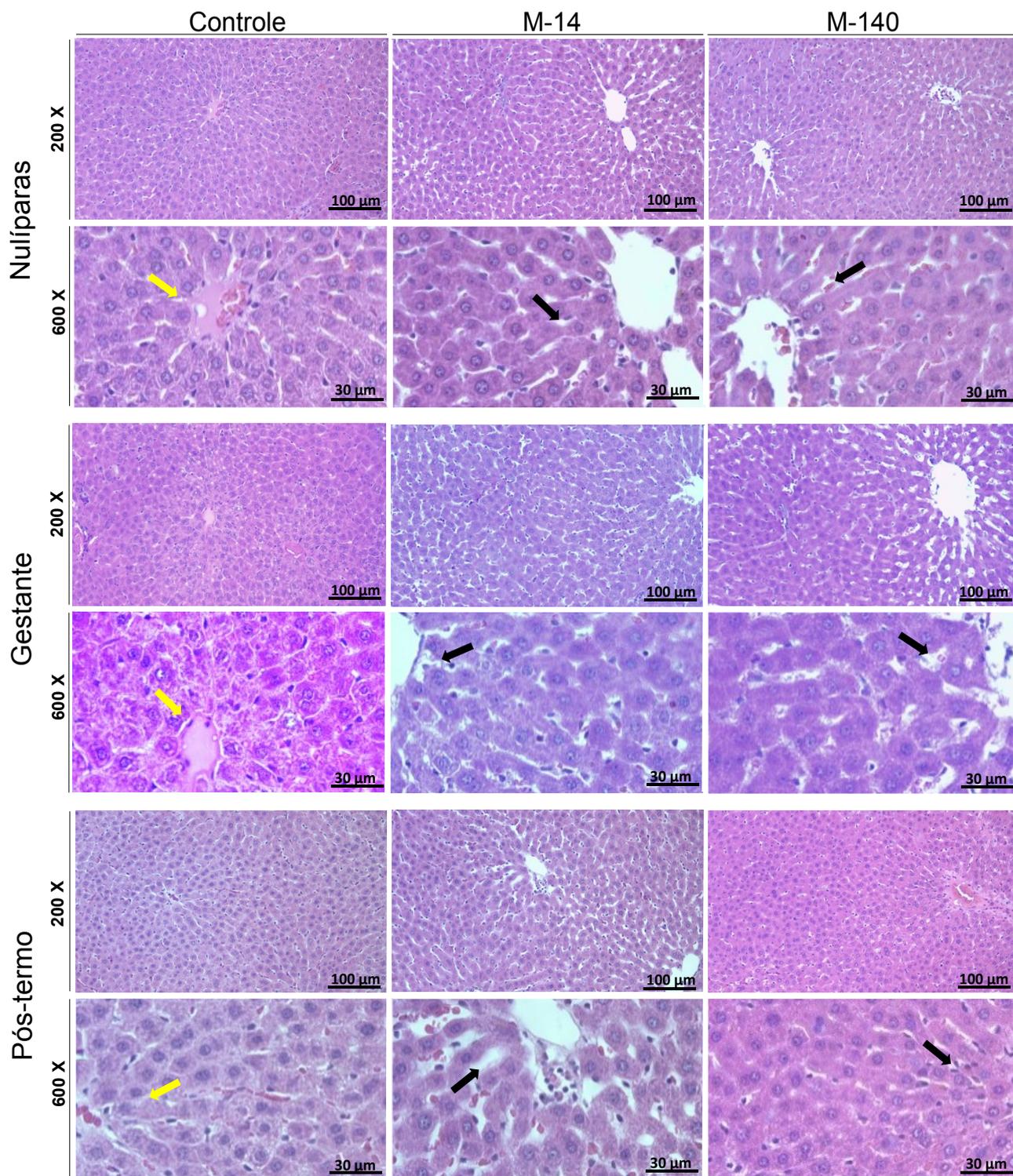


Figura 9: Avaliação qualitativa da morfologia hepática de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova®, testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Fotomicrografia dos cortes histológicos apresentando nas colunas os grupos experimentais: Controle, M-14 e M-140. Nas linhas são representados os períodos avaliados (Nulíparas, Gestantes e Pós-termo) em fotomicrografias de 200X e 600X de aumento. Setas amarelas indicam nos grupos Controle padrão normal do parênquima hepático, com distribuição celular normal, estruturas compactas e veia central definida, sinusoides estreitos entre os cordões celulares com aparência normal. Setas pretas indicando aumento proeminente da veia central, dilatação dos sinusoides e injúria tecidual por degeneração hidrópica. Grupos

experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle (Ctl [0mg/Kg de m.c]) veículo – óleo de milho. Coloração HE.

5.10 Perfil quantitativo de células sanguíneas de ratas expostas ao Malathion

O perfil hematológico foi avaliado nos grupos experimentais (Controle, M-14 e M-140) nas ratas imediatamente após exposição (fêmeas Nulíparas), nas Gestantes (vigésimo dia da gestação) e no Pós-termo (sexagésimo dia após o parto). Foram determinadas as concentrações celulares de WBC (concentração de glóbulos brancos), RBDC (concentração/distribuição de glóbulos vermelhos), HGB (hemoglobina), HCT (hematócrito), MCV (volume corpuscular médio), MCH (concentração corpuscular média), MCCH (concentração de hemoglobina corpuscular média), MPV (volume plaquetário médio), RDW (distribuição de glóbulos vermelhos), LYM (linfócitos), MON (monócitos) e GRAN (granulócitos) dados apresentados na Tabela 1.

A análise do sangue apontou um aumento significativo nas concentrações de HGB após a exposição ao Malathion (nulíparas) nos grupos M-14 e M-140. Entretanto, esse aumento somente foi observado nesta fase de avaliação. As concentrações de WBC foram alteradas com significativas elevações ($p < 0,05$) do perfil de células brancas (defesa) nos diferentes períodos avaliados para os grupos expostos. Nas fêmeas nulíparas esse perfil celular elevou-se de forma dose dependente contribuindo em especial o número de linfócitos encontrados no grupo M-140 quando comparados ao demais (M-14 e Controle). No grupo M-14, o aumento ($p < 0,05$) na contagem de células brancas ocorreu com contribuição especial da presença de linfócitos e granulócitos.

Quando avaliamos o perfil celular sanguíneo na gestação, observamos que a exposição ao Malathion manteve elevadas as contagens de glóbulos brancos tanto no grupo M-14 quanto no grupo M-140, quando comparados com o Controle. A contribuição na contagem de células nesta fase se deu em especial ao aumento de linfócitos, granulócitos e monócitos ($p < 0,05$) no grupo M-14 e linfócitos e granulócitos no grupo M-140. Este efeito nos grupos M-14 e M-140 foi robusto e perdurou até o período Pós-termo.

Tabela 2: Perfil de células hematológicas (análise quantitativa) de ratas expostas ao agrotóxico Malathion

	Nulíparas			Gestante			Pós-termo		
	Controle	M-14	M-140	Controle	M-14	M-140	Controle	M-14	M-140
<i>WBC</i> ($.10^9$ /L)	4.48±0.87	6.56±0.36*	8.02±0.5*	2.87±0.6	6.98±2.4*	6.70±1.3*	2.95±0.2	4.58±1.0*	5.82±1.8*
<i>RBDC</i> ($.10^{12}$ /L)	5.82±0.81	5.83±0.63	6.06±0.7	3.95±1.0	4.93±1.4	4.17±1.3	3.92±0.6	4.73±2.1	5.26±1.6
<i>HGB</i> (g/dL)	8.70±1.63	9.94±2.04*	10.98±2.3*	6.78±1.7	8.07±1.6	6.82±0.5	7.17±2.7	7.27±2.9	7.63±3.3
<i>HCT</i> (%)	32.80±4.26	35.00±9.90	42.97±5.2	21.70±5.67	28.20±8.4	23.45±6.8	26.22±10.8	27.45±12.4	30.40±10.2
<i>MCV</i> (fL)	56.67±1.75	55.29±2.1	56.67±1.9	55.50±1.0	56.50±1.6	57.17±4.8	56.17±1.6	57.33±1.5	57.67±2.1
<i>MCH</i> (pg)	15.25±3.58	15.79±2.2	14.45±2.2	17.68±1.7	16.95±3.1	17.85±5.8	15.57±1.1	15.13±1.2	14.00±3.7
<i>MCCH</i> (g/dL)	26.97±6.22	28.56±4.1	25.37±3.6	31.72±2.9	30.20±5.8	31.05±8.4	27.78±2.2	26.27±1.9	24.32±6.2
<i>MPV</i> (fL)	6.85±0.29	6.89±0.2	6.93±0.1	6.67±0.3	6.93±2.5	7.37±1.1	6.70±0.3	6.60±0.3	6.78±0.3
<i>RDW</i> (%)	12.98±0.35	12.87±0.4	13.13±0.2	13.57±0.6	13.35±0.3	14.25±1.3	13.65±0.9	14.07±1.0	14.43±0.8
<i>LYM</i> (%)	58.53±5.93	59.50±6.0	65.32±5.3	53.18±11.4	46.43±9.1	49.93±5.4	61.08±5.8	67.63±5.9	63.75±9.4
<i>MON</i> (%)	13.23±6.52	11.30±3.6	12.63±3.1	11.78±4.3	12.28±3.0	9.10±3.1	14.50±3.6	11.97±2.3	10.62±1.8
<i>GRAN</i> (%)	28.23±7.74	29.20±8.4	22.05±3.3	35.03±12.8	41.28±8.4	40.97±7.6	24.42±5.2	20.40±7.1	26.42±10.7 [#]
<i>LYM</i> ($.10^3/mm^3$)	2.60±0.70	3.83±0.5*	5.20±0.4* [#]	1.48±0.4	3.37±1.5*	3.30±0.9*	1.75±0.1	3.03±0.6*	3.55±1.1* [#]
<i>MON</i> ($.10^3/mm^3$)	0.57±0.39	0.69±0.2	0.98±0.2*	0.28±0.1	0.77±0.3*	0.57±0.4	0.38±0.1	0.48±0.1	0.53±0.2
<i>GRAN</i> ($.10^3/mm^3$)	1.32±0.29	2.04±0.5*	1.83±0.3	1.10±0.4	2.85±0.7*	2.83±0.4*	0.82±0.1	1.07±0.4	1.73±0.8* [#]

Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Nas linhas são apresentados os tipos celulares analisados. Nas colunas expõem-se os grupos experimentais nos diferentes períodos analisados, fêmeas Nulíparas: Controle, M-14 e M-140; Fêmeas Gestantes (20° DG) grupos: Controle, M-14 e M-140; e fêmeas no Pós-termo (60° DPT) grupos: Controle, M-14 e M-140. Onde 20° DG = vigésimo dia de gestação, 60° DPT = sexagésimo dia pós-termo, WBC = concentração de glóbulos brancos, RBDC = concentração/distribuição de glóbulos vermelhos, HGB = hemoglobina, HCT = hematócrito, MCV = volume corpuscular médio, MCH = concentração corpuscular média, MCCH = concentração de hemoglobina corpuscular média, MPV = volume plaquetário médio, RDW = distribuição de glóbulos vermelhos, LYM = linfócitos, MON = monócitos, GRAN = granulócitos. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo controle (Controle [0mg/Kg de m.c]) veículo – óleo de milho. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (#p<0,05).

5. 11 Avaliações qualitativas das células sanguíneas (leucócitos) de fêmeas expostas ao Malathion

As contagens de células hematológicas foram confirmadas por distensão sanguínea coradas com panótico rápido. As micrografias são apresentadas na Figura 10, nas colunas são apresentados os grupos experimentais Controle, M-14 e M-140. Nas linhas apresentamos os períodos tem porais avaliados (Nilíparas, Gestantes e Pós-termo) nas resoluções de 200X e 400X.

Nas imagens (resolução de 400X), as setas amarelas indicam a frequência de distribuição dos leucócitos por campo para os animais do grupo Controle, enquanto, as setas pretas apontam o aumento na frequência de distribuição, por campo, dos leucócitos para os grupos expostos ao Malathion (M-14 e M-140).

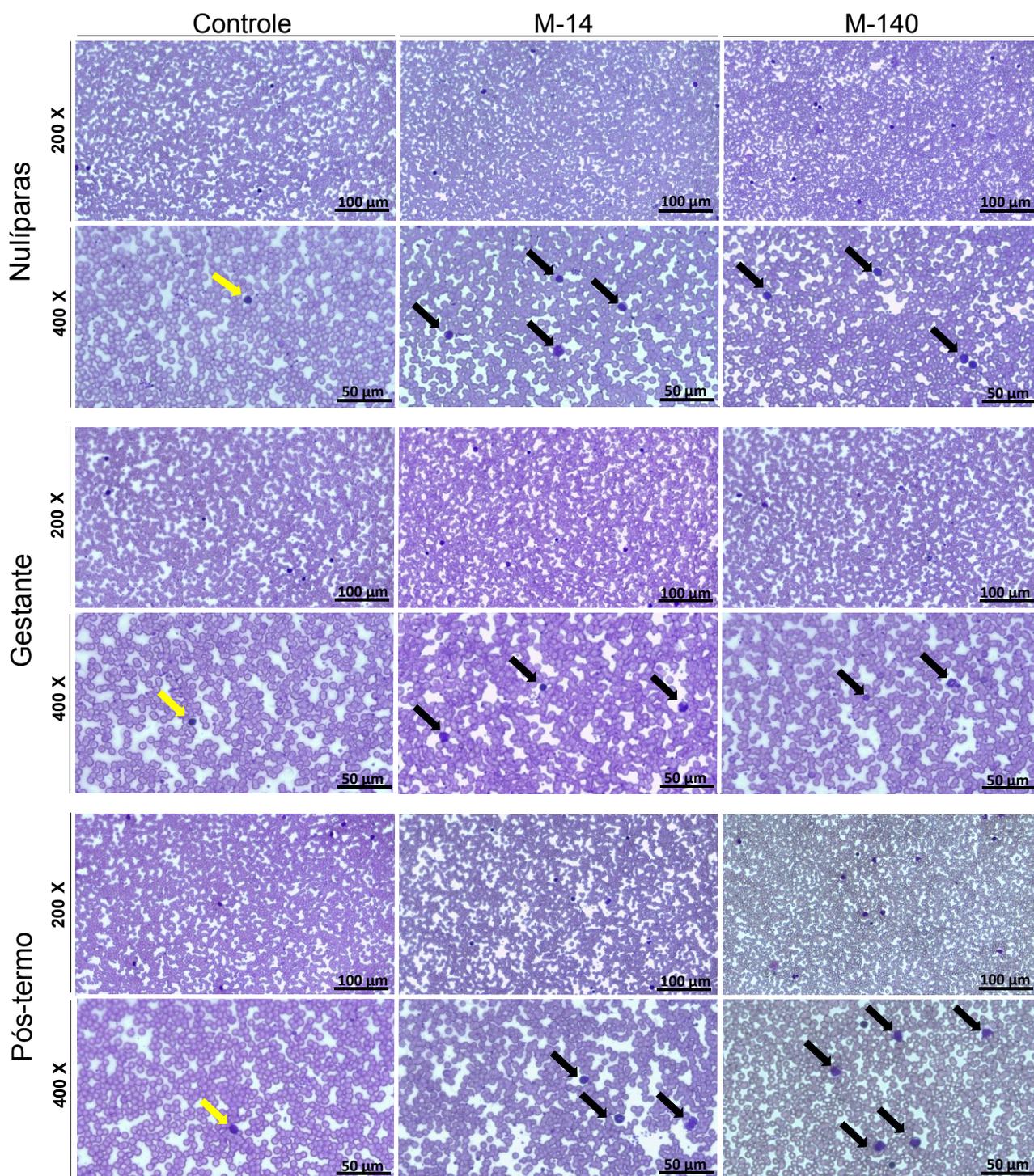


Figura 10: Avaliação qualitativa de células brancas sanguíneas (leucócitos) de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova®, testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Fotomicrografia das distenções sanguíneas apresentando nas colunas os grupos experimentais Controle, M-14 e M-140. Nas linhas são representadas as resoluções das imagens, fêmeas Nulíparas Gestante e Pós-termo com imagens em resolução de 200X e 400X. Setas amarelas indicam frequência da distribuição dos leucócitos por campo para o grupo Controle. Setas pretas indicam frequência e distribuição de leucócitos para os grupos expostos ao OP (M-14 e M-140). Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo controle (Controle [0mg/Kg de m.c]) veículo – óleo de milho.

5.12 Alteração murinométrica (massa corporal) e metabólica (glicose sanguínea) apresentado pelos fetos (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion

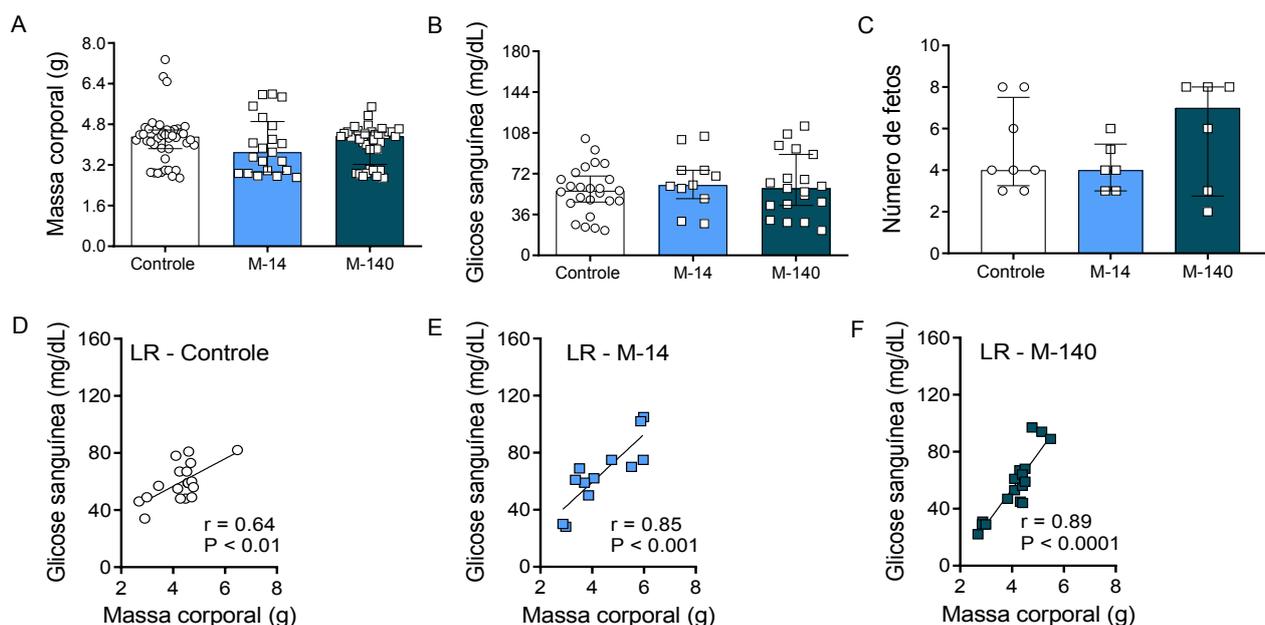
As ratas eutanasiadas no vigésimo dia da gestação, tiveram seus fetos sexados e avaliados para determinação de eventuais distúrbios no desenvolvimento e metabolismo da glicose.

Os fetos, machos e fêmeas, de ratas expostas ao OP, apresentaram um desenvolvimento corporal padrão (massa corporal), equivalente aos fetos das ratas sem contato com o agrotóxico (grupo Controle), figura 11A e 11G.

A glicose sanguínea nos fetos machos não apresentou alteração entre os grupos avaliados, contudo, os fetos fêmeos de genitores expostos a dose 140 mg, figura 11H, apresentaram elevação dos níveis de glicose sanguínea circulante ($p < 0,05$), quando comparados aos demais grupos (M-14 e Controle).

As correlações entre massa corporal e glicose sanguínea foram estabelecidas para cada grupo experimental e seus respectivos gêneros (correlação de Pearson (r)). Já é sabido que uma maior massa está correlacionada com níveis elevados de glicemia (Fig. 11D e 11J) conforme apresentaram os fetos Controle (valor de $r = 0,64$ para machos e $r = 0,66$ para fêmeas). No entanto os fetos de ratas expostos ao OP, figuras 11E, 11F, 11K e 11L, apresentaram correlações maiores para estes fatores (M-14 com valor de $r = 0,85$ para machos e $r = 0,80$ para fêmeas; M-140 com valor de $r = 0,89$ para machos e $r = 0,88$ para fêmeas).

Machos



Fêmeas

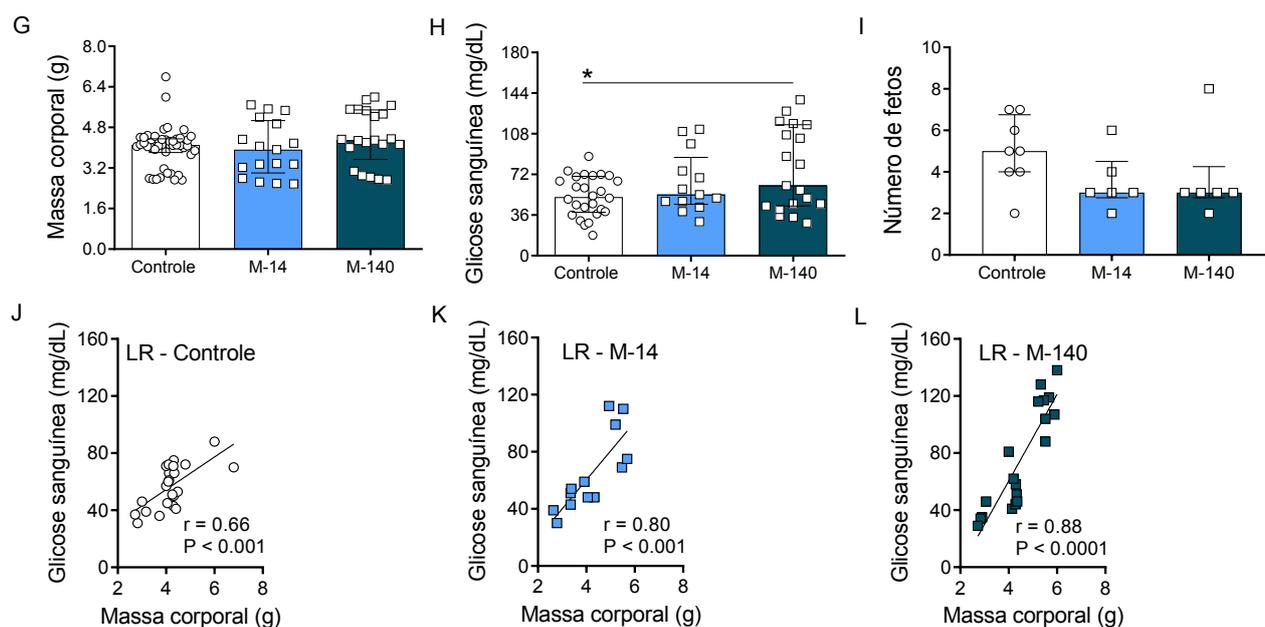


Figura 11: Massa corporal, glicose sanguínea e sua correlação em fetos de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], avaliações realizadas nos fetos (vigésimo dia de desenvolvimento) de genitoras expostas ao OP por um período de 21+5 dias antes da gestação. Fetos machos: A) Massa corporal (Controle, M-14 e M-140); B) Glicose sanguínea (Controle, M-14 e M-140); C) Número de fetos (Controle, M-14 e M-140); D) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos Controle; E) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-14; F) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-140. Fetos fêmeas: G) Massa corporal (Controle, M-14 e M-140); H) Glicose sanguínea (Controle, M-14 e M-140); I) Número de fetos (Controle, M-14 e M-140); J)

Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos Controle; K) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-14; L) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-140. Fetos oriundos de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A, B, G e H. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em C e I. Regressão linear – Correlação de Pearson em D, E, F, J, K e L (valores de 'p' indicados no gráfico). Prisma 8.0, n=8-46 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05).

5.13 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion

Uma parte do gupo de fêmeas gestantes veio a termo e os progenitores foram acompanhados até a fase adulta (90 dias). Durante o seu desenvolvimento, a glicose sanguínea foi avaliada aos 30 e 60 dias de vida (sob jejum), e um teste de ipGTT foi aplicado aos 90 dias. O acompanhamento no desenvolvimento da prole de machos demonstrou não haver diferenças nos níveis glicêmicos aos 30 dias de vida, contudo aos 60 dias de vida observamos que os animais oriundos de genitoras expostas ao Malathion apresentam uma elevação ($p < 0,05$) na glicose sanguínea basal, quando comparado com animais filhos de ratas não expostas (Fig. 12B), efeito geracional.

A prole de machos, quando submetidos ao ipGTT [2g/Kg de m.c], apenas os filhos de mães expostas a dose [14mg/Kg de m.c] (M-14), apresentaram intolerância a glicose quando comparado aos demais grupos (Fig. 12C). A significância do resultado ($p < 0,05$) pode ser observada com melhores detalhes na análise da área sob a curva - AUC apresentado graficamente na figura 12D. Embora no minuto 30, os animais do grupo M-140 também apresentassem uma elevação na glicemia quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$), essa elevação não se sustentou no perfil de intolerância ao longo do teste.

Os níveis de triglicérides (Fig. 12E) e de colesterol total plasmático circulante (Fig. 12F) foram mensurados e nenhuma alteração nestes padrões foram encontrados nos animais.

Na função hepática determinada pelas concentrações plasmáticas das transaminases, apenas para a enzima AST-TGO (Fig. 12H) observamos alterações, com elevação na atividade desta enzima, indicando um maior nível circulante nos filhos de ratas expostas, quando comparados ao grupo Controle (Controle $58,6 \pm 20,1$; M-14 $148,1 \pm 62,8$ e M-140 $122,1 \pm 48,7$ U/L).

Os padrões de estresse oxidativo foram analisados pela oxidação de lipídios (lipoperoxidação) e pela atividade enzimática da catalase (Fig. 12I e 12J), e nenhuma alteração foi encontrada na prole de machos.

Machos

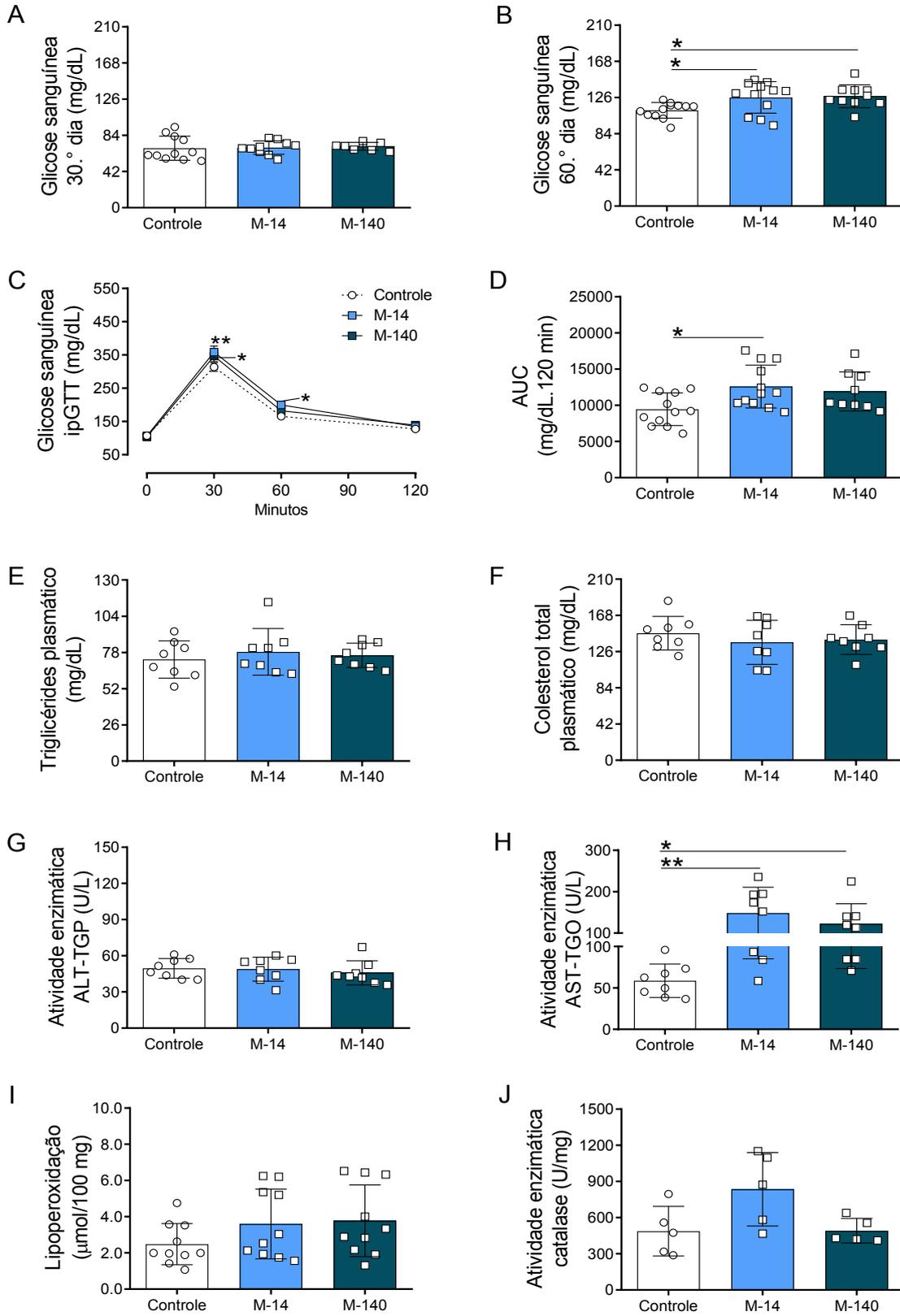


Figura 12: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, triglicérides, colesterol total, função hepática e estresse oxidativo) da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion. Prole de machos de ratas expostas ao OP Malathion por um período de 21+5 dias. A) Glicose sanguínea no 30° dia; B) Glicose sanguínea no 60° dia; C) Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT); D) Área sob a curva (AUC) do teste intraperitoneal de tolerância à glicose; E) Triglicérides; F) Colesterol total; G) Atividade enzimática ALT-TGP; H) Atividade enzimática AST-TGO; I) Lipoperoxidação; J) Atividade da enzima catalase. Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 filhos de ratas expostas à [14 mg/Kg de m.c], M-140 filhos de ratas expostas à [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle, filhos de ratas expostas à [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA post hoc Tuckey's. Prisma 8.0, n=5-12 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01).

5.14 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion

A prole (fêmeas) também foi acompanhada no seu desenvolvimento até a fase adulta (90 dias). E demonstrou não haver perturbações nos níveis glicêmicos aos 30 dias de vida, apesar disso, aos 60 dias de vida observamos que as progenitoras de ratas expostas ao Malathion (M-14 e M-140) apresentaram elevações significantes na glicose sanguínea (Fig. 13B) se comparados com as concentrações de glicose nos filhotes de ratas Controle. Independente da dose de exposição, os filhotes de mães expostas apresentaram maior glicemia ($p < 0,05$).

As fêmeas, quando submetidos ao ipGTT [2g/Kg de m.c], apresentaram intolerância a sobrecarga de glicose ($p < 0,0001$) quando comparamos os grupos M-14 e M-140 com o grupo Controle (Fig. 13C). Esta intolerância glicose foi observada tanto no minuto 30 do teste, como também no minuto 60. A área sob a curva - AUC evidência está diferença (Fig. 13D) demonstrando inclusive que a intolerância no grupo M-140 foi mais robusta ($p < 0,01$).

Os níveis de triglicérides (Fig. 13E) foram maiores ($p < 0,01$) no grupo M-14 quando comparados aos demais grupos experimentais. Já as concentrações de colesterol total plasmático (Fig. 13F) não apresentaram alteração nestes animais.

Na função hepática determinada pelas concentrações plasmáticas, assim como os machos, as fêmeas apresentaram alterações de transaminases apenas para a enzima AST-TGO (Fig. 13H), com elevação na atividade desta enzima, indicando um maior nível circulante nos filhos de ratas expostas, quando comparados ao grupo Controle (Controle $59,5 \pm 19,6$; M-14 $112,5 \pm 30,1$ e M-140 $94,0 \pm 28,2$ U/L).

A análise do estresse oxidativo na prole (fêmeas) apontou haver lipoperoxidação no grupo M-140 quando comparado aos demais animais (Fig. 13I), enquanto a atividade enzimática da catalase (Fig. 13J) foi elevada apenas no grupo M-14 quando comparado com os Controles ($p < 0,05$) ou ao grupo M-140 ($p < 0,01$).

Fêmeas

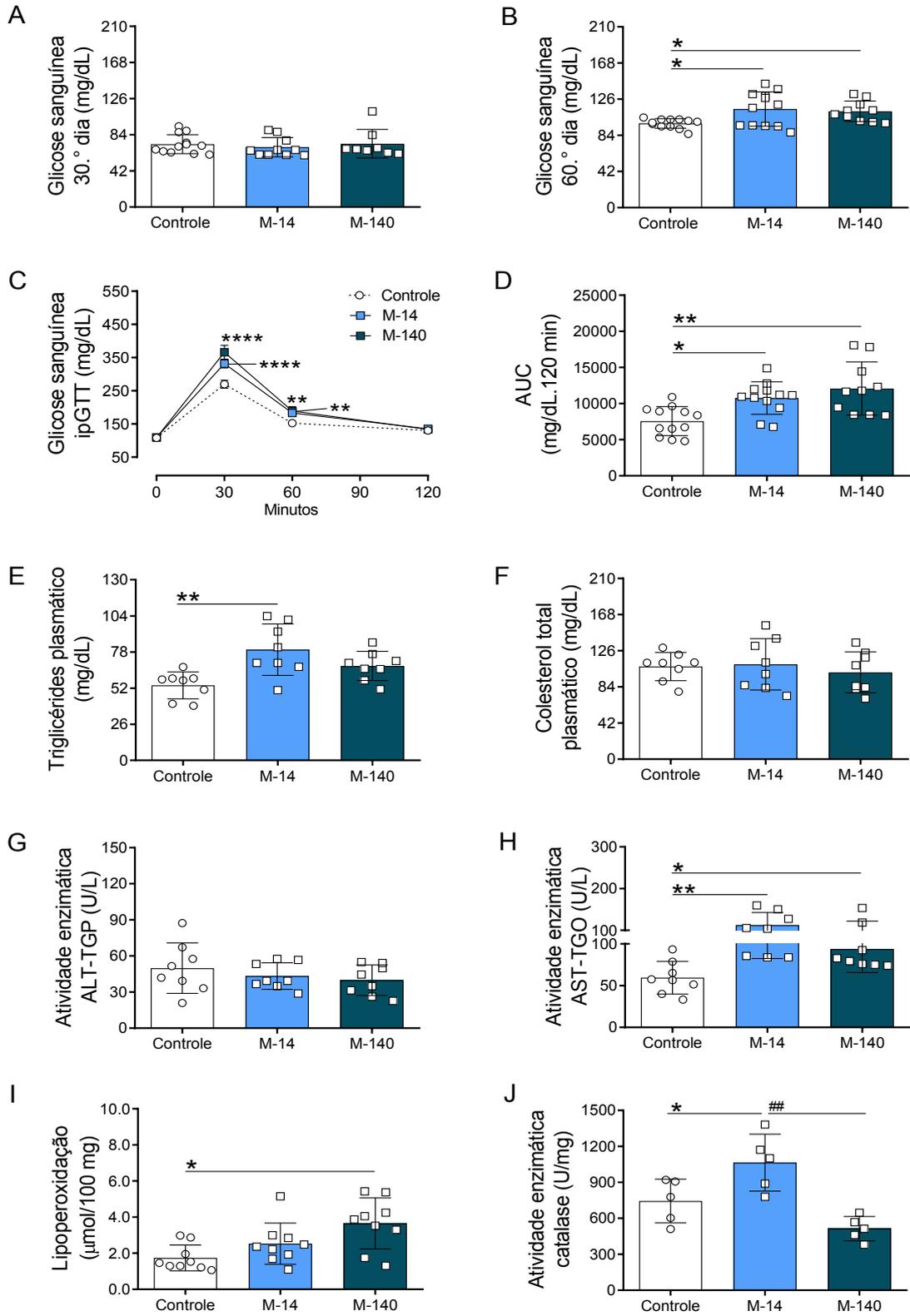


Figura 13: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, triglicérides, colesterol total, função hepática e estresse oxidativo) da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion. Prole de fêmeas de ratas expostas ao OP Malathion por um período de 21+5 dias. A) Glicose sanguínea no 30° dia; B) Glicose sanguínea no 60° dia; C) Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT); D) Área sob a curva (AUC) do teste intraperitoneal de tolerância à glicose; E) Triglicérides; F) Colesterol total; G) Atividade enzimática ALT-TGP; H) Atividade enzimática AST-TGO; I) Lipoperoxidação; J) Atividade da enzima catalase. Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 filhos de ratas expostas à [14 mg/Kg de m.c], M-140 filhos de ratas expostas à [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle, filhos de ratas expostas à [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA post hoc Tuckey's. Prisma 8.0, n=5-12 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (##p<0,01).

5.14 Morfologia hepática, pancreática e determinação da massa de células β na prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion

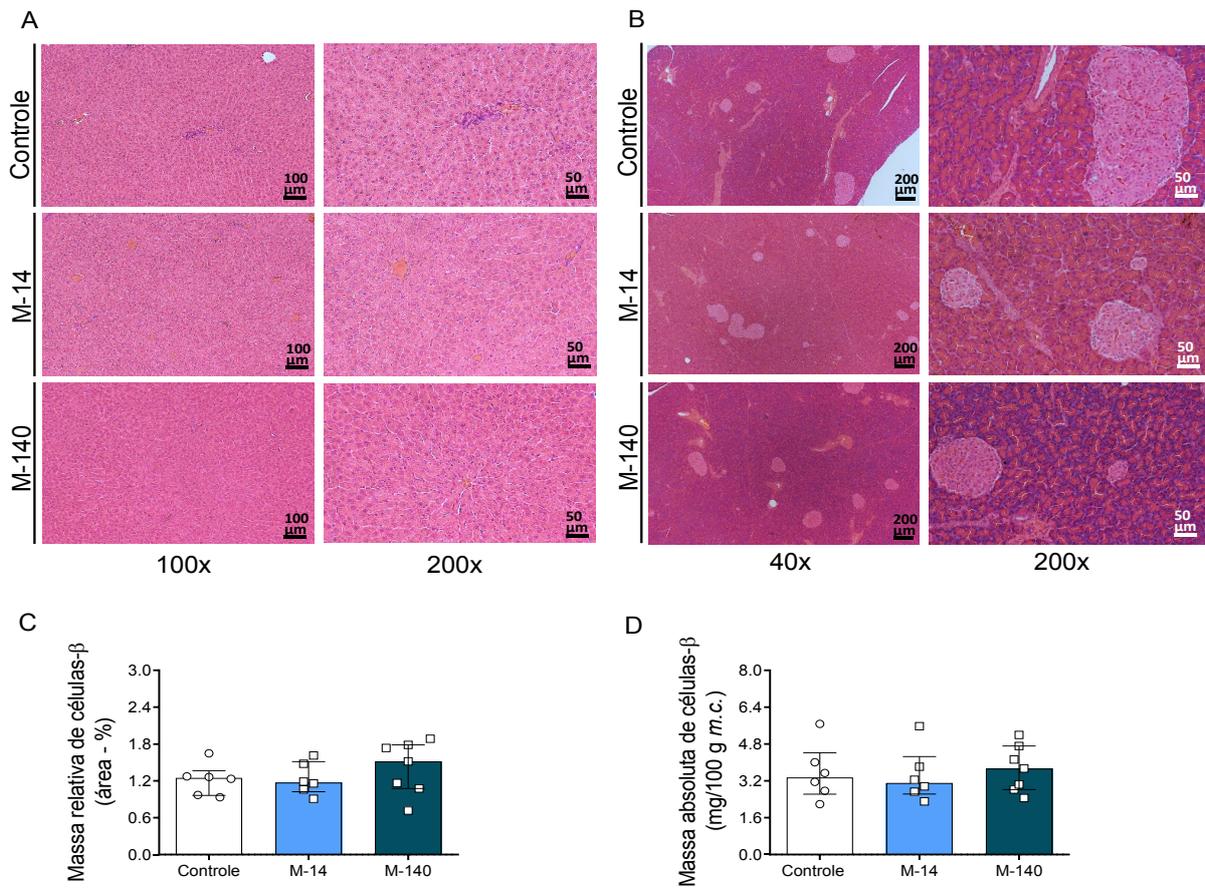
A fim de determinarmos se as alterações nas concentrações de AST-TGO foram acompanhadas por mudanças na conformação morfológica do fígado, realizamos microtomia do tecido hepático para uma avaliação qualitativa do tecido. Além disso, o pâncreas também foi objeto de estudo, e avaliamos qualitativamente a sua morfologia e quantitativamente as suas estruturas endócrinas, onde a partir da mensuração dos ilhéus de Langerhans, estimamos a massa de células β relativa e absoluta na prole F1 adulta (90 dias) de machos e fêmeas.

A histologia do tecido hepático demonstrado nas figuras 14A (machos) e 14E (fêmeas) revelou um parênquima com disposição de hepatócitos normais (cordões celulares interligados), sinusoides, aréa clara entre os cordões, estreitos (espaço de Disse) e veia centrolobular com dilatação normal. Sem distinção da morfologia entre os grupos estudados.

O tecido pancreático nos machos e fêmeas (Fig. 14B e 14F), por sua vez, apresentou-se uniforme, com o parênquima exócrino apresentando um conjunto de ácinos (maior proporção tecidual), unidos por ductos intercalares. As porções endócrinas aparecem como estruturas menos coradas, com consideráveis variações de tamanho. Sem distinção da morfologia entre os grupos estudados.

A análise quantitativa da porção endócrina do pâncreas, demonstrou haver uma equivalência na massa relativa de células β (Fig. 14C e 14G) e na massa absoluta de células β (Fig. 14D e 14H) entre os grupos estudados.

Machos



Fêmeas

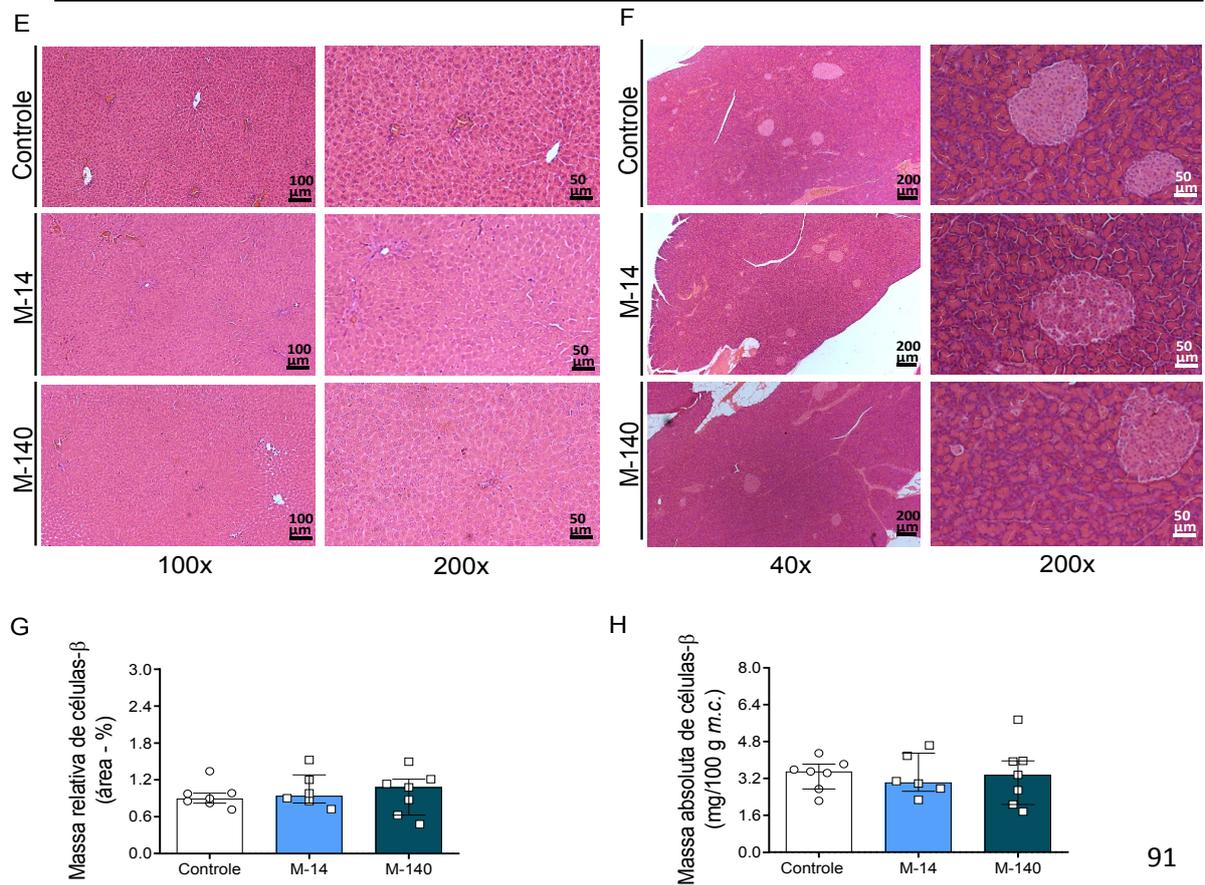


Figura 14: Avaliação qualitativa da morfologia hepática e pancreática e avaliação quantitativa da massa de células β da prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], progenitores adultos (90 dias) oriundos de ratas expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. Fotomicrografia de cortes histológicos corados em HE, grupos experimentais: Controle, M-14 e M-140. Nas linhas são representados os grupos experimentais e nas colunas o aumento de 100X e 200X para o tecido hepático e 40X e 200X para o tecido pancreático. Machos: A) Fotomicrografia do tecido hepático; B) Fotomicrografia do tecido pancreático; C) Massa relativa de células β ; D) Massa absoluta de células β . Fêmeas: E) Fotomicrografia do tecido hepático; F) Fotomicrografia do tecido pancreático; G) Massa relativa de células β ; H) Massa absoluta de células β . Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em C, D, G e H. Prisma 8.0, n=6-7 animais por grupo.

5.15 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion

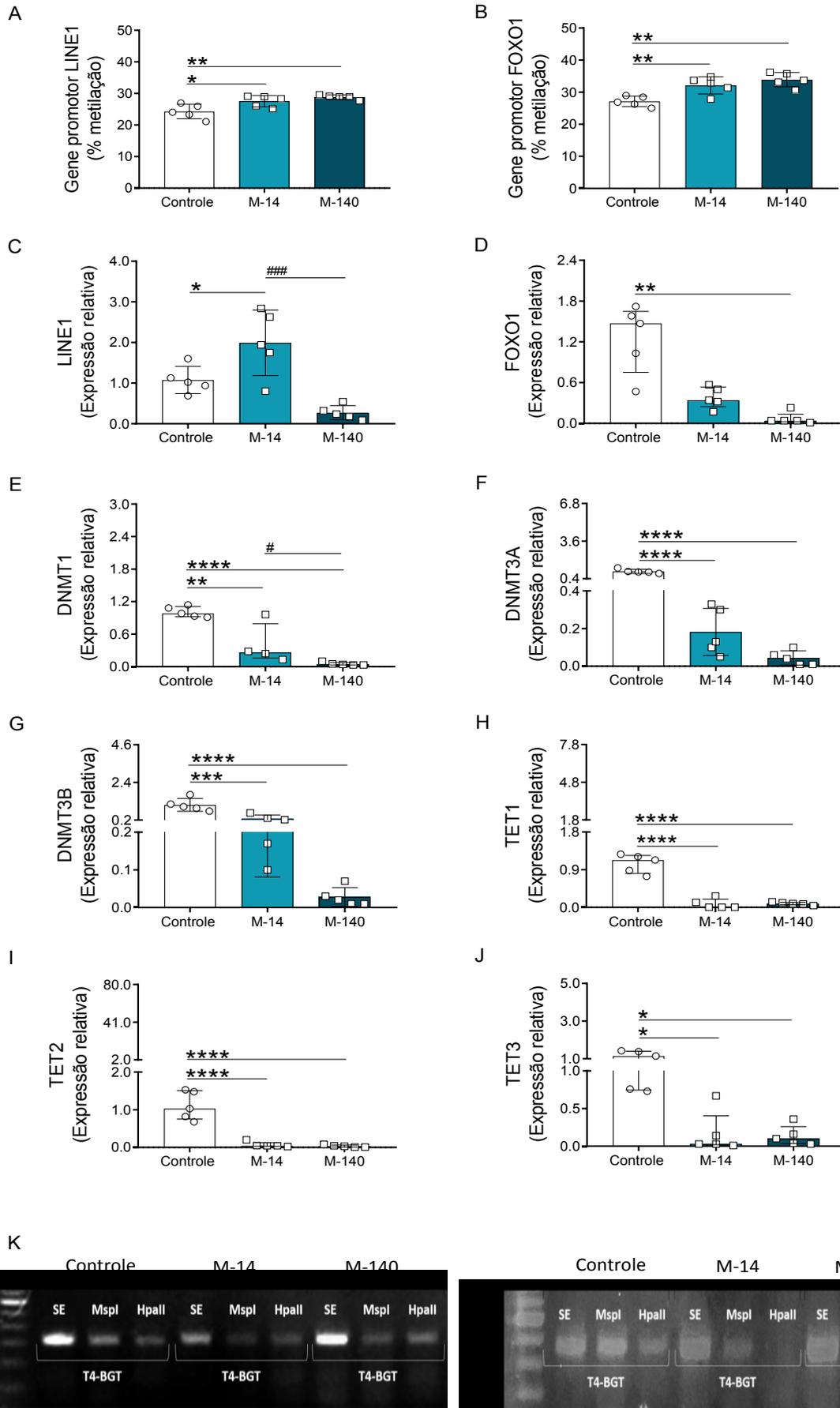
Uma vez que a desmetilação se correlaciona com a transcrição e a hipermetilação com a repressão, a análise dos padrões de metilação do DNA foram usados para prever a capacidade do agrotóxico em causar alterações epigenéticas, a partir da expressão gênica. A metilação do DNA, que ocorre predominantemente no contexto dos dinucleotídeos CpG, é uma das modificações epigenéticas mais bem caracterizadas, esta avaliação ocorreu pela análise da metilação do DNA mediada por DNA metiltransferases - DNMTs (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e desmetilases, como a dez-onze proteína de translocação - TETs (TET1, TET2 e TET3).

Os resultados apontaram que houve hipermetilação ($p < 0,05$) no promotor do gene LINE1 (marcador do nível de metilação global), figura 15A, em machos nascidos de mães expostas ao Malathion nas doses de 14 e 140 mg/Kg de m.c, quando comparados ao seu Controle. A hipermetilação observada foi acompanhada por uma redução ($p < 0,001$) na expressão deste gene em machos do grupo M-140 (Fig. 15C). O gene da FOXO1, figura 15B, apresentou um aumento ($p < 0,01$) do percentual de metilação nos grupos M-14 e M-140 quando comparados ao Controle. Este aumento da metilação foi acompanhado por uma supressão da expressão relativa deste gene ($p < 0,01$) no grupo M-140 (Fig. 15D).

A expressão dos genes da família das DNMTs foi reduzida na prole de ratas expostas ao agrotóxico. A expressão relativa de DNMT1 (Fig. 15E) foi suprimida de forma dose dependente, M-14 ($p < 0,01$) e M-140 ($p < 0,0001$) quando comparados ao Controle. As DNMT3A (Fig. 15F) e DNMT3B (Fig. 15G) apresentaram os mesmos padrões de metilação, apresentando supressão da expressão gênica relativa destas metilases nas proles de ratas expostas ao OP ($p < 0,0001$), não havendo diferença entre a dose de exposição.

As TETs (desmetilases) em todas as suas conformações, TET1 (Fig. 15H), TET2 (Fig. 15I) e TET3 (Fig. 15J), apresentaram supressão da expressão relativa dos seus genes quando a prole é oriunda de ratas expostos ao Malathion. Não houve diferenças entre as doses de exposição, demonstrando que indiferente da exposição (14 ou 140 mg/Kg de m.c) a expressão gênica é reduzida.

Machos



LINE1 = 320 bp

FOXO = 480 bp

Figura 15: Perfil epigenômico de progenitores (machos) de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], avaliação realizada na prole adulta, machos, com 90 dias de idade, oriundos de genitoras expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. A) Metilação do gene promotor LINE1; B) Metilação do gene promotor FOXO1; C) Expressão relativa de LINE1; D) Expressão relativa de FOXO1; E) Expressão relativa de DNMT1; F) Expressão relativa de DNMT3A; G) Expressão relativa de DNMT3B; H) Expressão relativa de TET1; I) Expressão relativa de TET2; J) Expressão relativa de TET3; K) Imagem representativa da densitometria das amostras submetidas a eletroforese. Onde LINE1 = *Long Interspersed Element-1*, FOXO1 = *Forkhead box protein O1*, DNMT = DNA metiltransferase subtipos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e TET = desmetilase dez-onze proteína de translocação subtipos (TET1, TET2 e TET3). Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A e B. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em C, D, E, F, G, H, I e J. Prisma 8.0, n=5 animais por grupo. Amostra tecido hepático. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 e ****p<0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (#p<0,05 e ###p<0,001).

5.16 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion

As fêmeas da prole F1 de ratas expostas ao Malathion, por um período que antecedeu a gestação, apresentaram um perfil de alteração genômica semelhante a prole de machos para o gene promotor da FOXO1 (Fig. 16B). A hipermetilação foi acompanhada pela repressão da expressão gênica no grupo M-140 (Fig. 16D).

O promotor do gene LINE1, figura 16A, apontou não haver diferenças entre o percentual de metilação entre os grupos. Contudo, a expressão relativa deste gene (Fig. 16C) foi reprimida em M-140 quando comparados aos demais grupos experimentais.

A expressão relativa de DNMT1 (Fig. 15E) foi suprimida nos grupos de fêmeas oriundas de ratas expostas ao agrotóxico, M-14 (p<0,01) e M-140 (p<0,001) quando comparados ao Controle. As DNMT3A (Fig. 15F) e DNMT3B (Fig. 15G) apresentaram os mesmos padrões de metilação, com o aumento da expressão gênica relativa para o grupo M-14 quando comparados aos demais grupos experimentais.

Na avaliação do perfil das desmetilases (TETs), observamos apenas supressão da expressão gênica da TET2 (p<0,05), conforme pode ser observado na figura 16I nos grupos de progenitoras de ratas expostas ao OP quando comparadas aos animais sem exposição. Assim como na prole de machos, as fêmeas não apresentaram diferenças no perfil das desmetilases, entre as doses de exposição.

Fêmeas

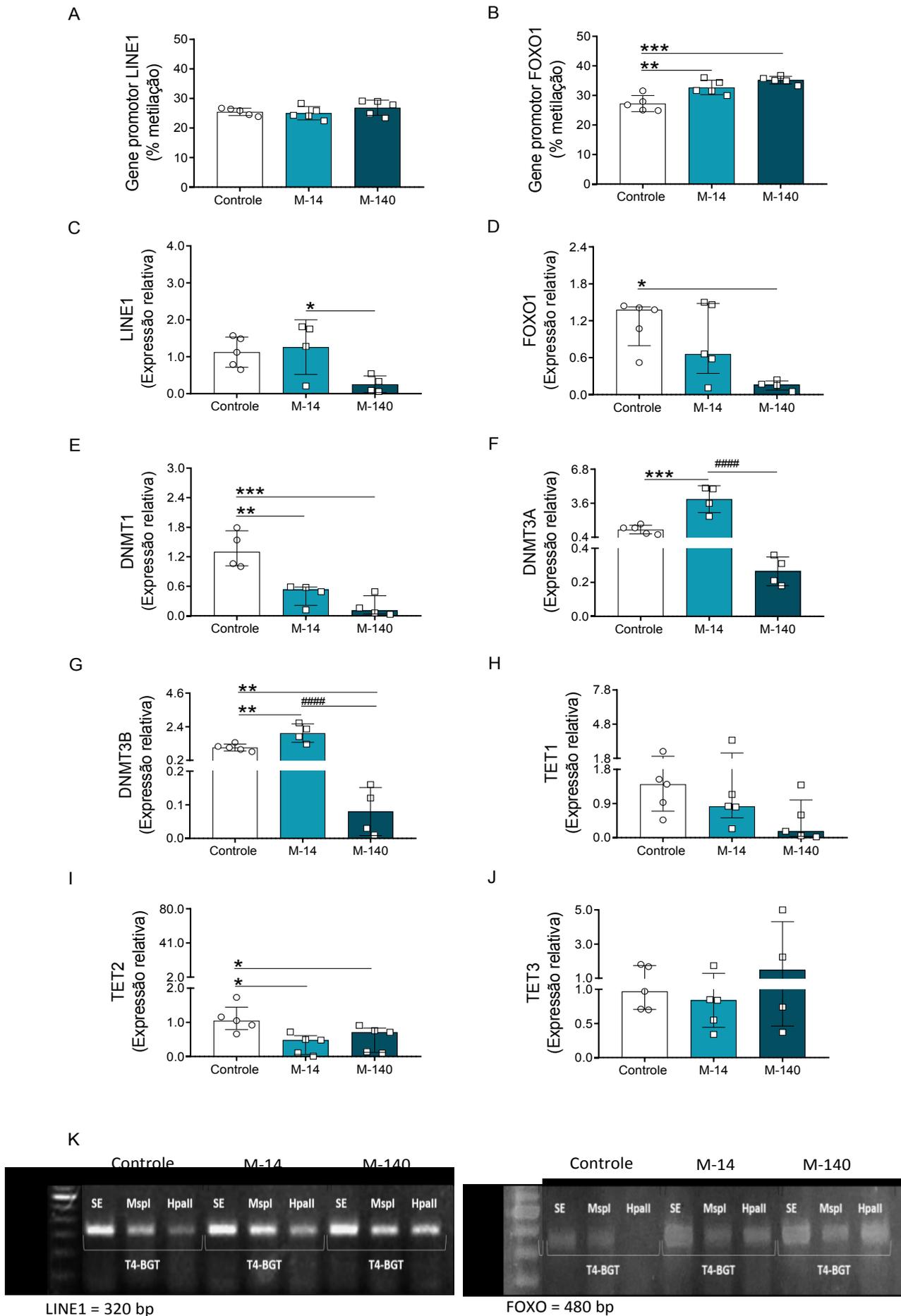


Figura 16: Perfil epigenômico de progenitores (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], avaliação realizada na prole adulta, machos, com 90 dias de idade, oriundos de genitoras expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. A) Metilação do gene promotor LINE1; B) Metilação do gene promotor FOXO1; C) Expressão relativa de LINE1; D) Expressão relativa de FOXO1; E) Expressão relativa de DNMT1; F) Expressão relativa de DNMT3A; G) Expressão relativa de DNMT3B; H) Expressão relativa de TET1; I) Expressão relativa de TET2; J) Expressão relativa de TET3; K) Imagem representativa da densitometria das amostras submetidas a eletroforese. Onde LINE1 = *Long Interspersed Element-1*, FOXO1 = *Forkhead box protein O1*, DNMT = DNA metiltransferase subtipos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e TET = desmetilase dez-onze proteína de translocação subtipos (TET1, TET2 e TET3). Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A e B. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em C, D, E, F, G, H, I e J. Prisma 8.0, n=5 animais por grupo. Amostra tecido hepático. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 e ****p<0,0001). Cerquilha (#) indica diferença vs M-14 (#p<0,05 e ###p<0,001).

Dos ensaios de possível efeito como fator de risco para o DMG em dose ultra baixa

5.17 Alterações murinométricas causadas pela exposição ao Malathion

Nesta etapa do trabalho, 84 animais foram utilizados, 70 fêmeas e 14 machos (utilizados para a fase de reprodução). As fêmeas foram distribuídas nos grupos experimentais até o limite de 9 animais por grupo em cada período avaliado, sendo excluídos das análises os animais excedentes. Assim, 18 animais constituíram o grupo Controle (09 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo), 18 animais o grupo M-14 (09 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo) e 18 animais o grupo M-140 (09 na fase Nulíparas, 09 na fase Gestante e 09 na fase Pós-termo). Após 21 dias de exposição ao Malathion as fêmeas foram pareadas com machos por até cinco dias, e separadas mediante constatação do plug vaginal ou presença de sêmen no esfregaço vaginal. Durante os dias de cruzamento os animais continuaram sendo expostos ao agrotóxico na dose de 0,1 mg/Kg de m.c. Os grupos experimentais M-0,1 e Controle serão apresentados a partir de agora nas três distintas fases de vida destas fêmeas: Nulíparas, Gestantes e Pós-termo.

A exposição ao Malathion não alterou o ganho de massa corporal imediatamente após a exposição (Fig. 17D). Entretanto durante a gestação e no Pós-termo (Fig. 17E e 17F) as fêmeas que foram expostas ao agrotóxico apresentaram aumento da massa corpórea, este aumento foi mais exacerbado durante a gestação ($p < 0,001$). Os gráficos também demonstram a massa corporal dos animais antes da exposição ao agrotóxico (Fig. 17A, 17B e 17C).

Nas fêmeas nulíparas a massa adiposa total não foi alterada, mas na gestação e no pós-termo os grupos expostos ao agrotóxico apresentaram aumento da massa adiposa quando comparados com fêmeas sem exposição (Fig. 17H e 17I) nestes períodos da vida das ratas.

A massa hepática nas nulíparas (Fig. 17J), foi alterada nos animais expostos ao OP apresentando um aumento ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Controle. Já no 60° DPT, a exposição ao Malathion durante o período que antecedeu a gestação, promoveu a redução da massa hepática no grupo M-0,1 ($3,05 \pm 0,17$ g/100g m.c) quando comparados com o grupo Controle ($3,34 \pm 0,08$ g/100g m.c) (Fig. 17K). A redução da massa hepática perdurou no momento Pós-termo frente a exposição (Fig. 17L).

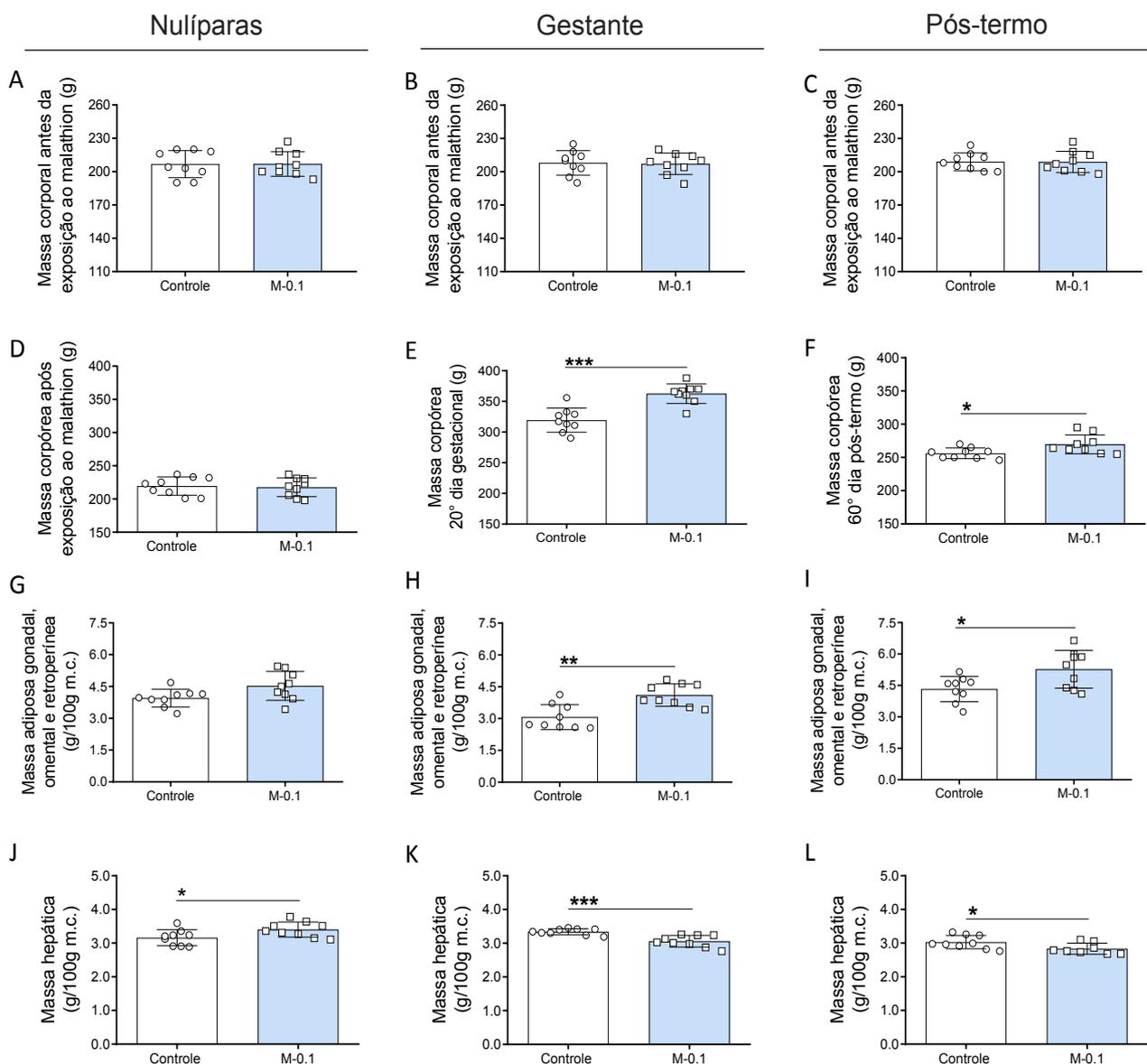


Figura 17: Alterações murinométricas de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) para parâmetros murinométricos de massa corporal antes da exposição ao OP: A) Nulíparas, B) 20° DG e C) 60° DPT e após a exposição D) Nulíparas, E) 20° DG e F) 60° DPT; Massa adiposa (omental, gonadal e retroperitoneal): G) Nulíparas, H) 20° DG e I) 60° DPT; Massa hepática: J) Nulíparas, K) 20° DG e L) 60° DPT; Onde 20° DG = vigésimo dia de gestação, 60° DPT = sexagésimo dia pós-termo. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, n=9 animais por grupo. Prisma 8.0, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001).

5.18 Malathion em dose ultra baixa como um fator de risco para o DMG

A determinação de que se o OP Malathion poderia ser um fator de risco para o DMG, se deu por exposição previa ao agrotóxico por 21+5 dias antes do concepto. Os resultados apontaram não haver alterações na glicemia em jejum nos animais, em nenhum dos estágios avaliados durante o estudo (Fig. 18D, 18E e 18F). Quando os animais foram submetidos ao teste de sobrecarga glicêmica (Fig. 18A, 18B e 18C) observamos que após a exposição, no minuto 60, os valores glicêmicos foram menores ($p < 0,05$) no grupo exposto ao Malathion. Na gestação, não houve diferenças na capacidade de resposta a sobre carga de glicose, contudo no Pós-termo o grupo de fêmeas expostas apresentou uma intolerância na resposta a glicose. A intolerância pode ser mais bem observada pela AUC (Fig. 18O).

Embora os níveis de glicose sanguínea durante o teste GTT nos minutos 30, 60 e 120 nas gestantes não apareceram diferenças entre os grupos, na avaliação da performance do teste pela AUC (Fig. 18N) observamos uma maior área gráfica para as ratas expostas ao OP.

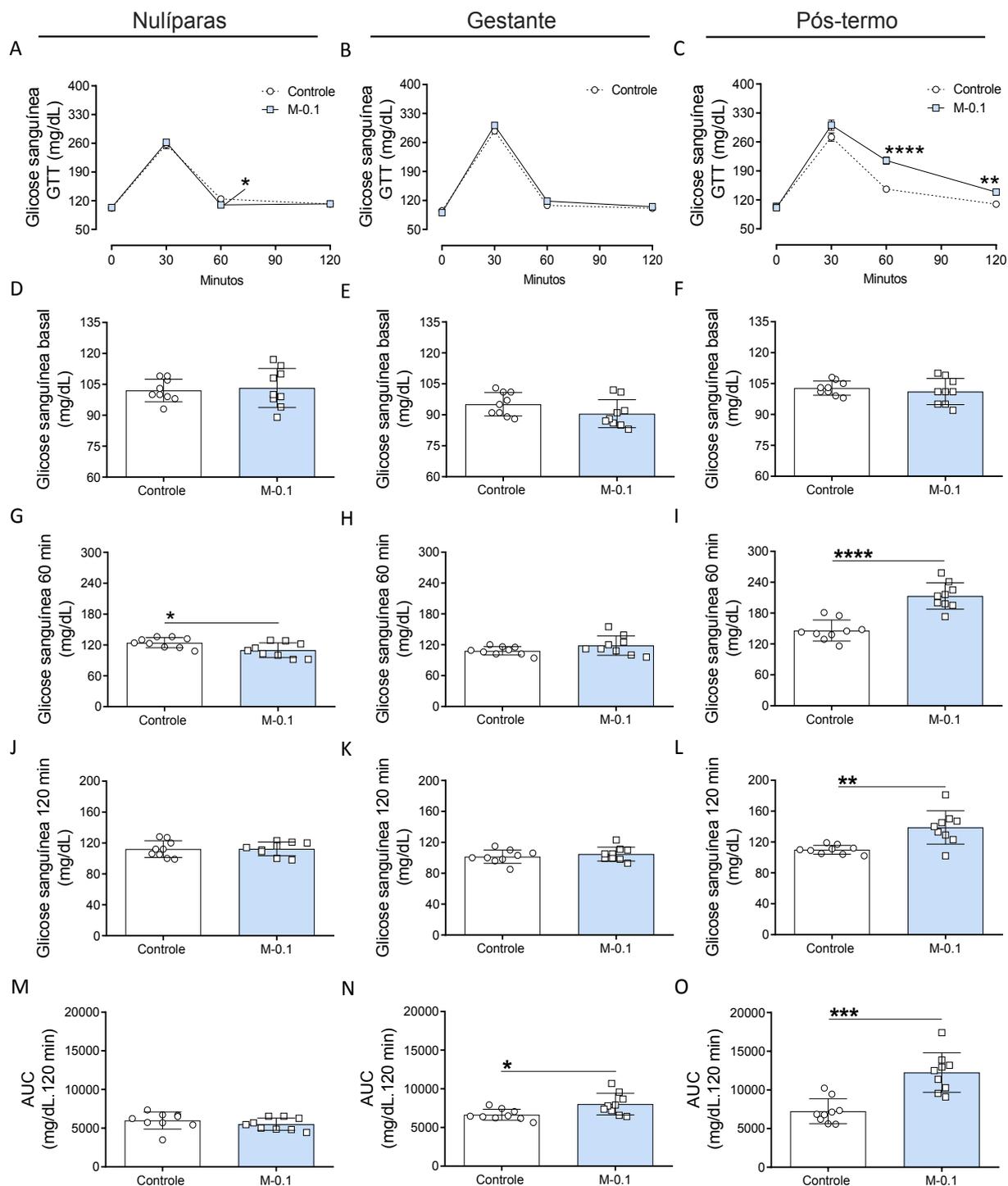


Figura 18: Níveis de glicose sanguínea durante o teste de sobrecarga de glicose em ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Performance geral do ipGTT: A) Nulíparas, B) Gestantes 14^o DG e C) 60^o DPT; Glicose sanguínea basal (jejum, 8 horas): D) Nulíparas, E) Gestantes e F) Pós-termo; Glicemia 60 minutos após sobrecarga intraperitoneal de glicose: G) Nulíparas, H) Gestantes e I) Pós-termo; Glicemia 120 minutos após sobrecarga intraperitoneal de glicose: J) Nulíparas, K) Gestantes e L) Pós-termo; Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (GTT): M) Nulíparas, N) Gestantes e O) Pós-termo. Onde 14^o DG = décimo quarto dia de

gestação, 60° DPT = sexagésimo dia pós-termo. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 e ****p<0,0001).

5.19 Inibição da atividade da enzima ChE e níveis de Insulina no estado alimentado

A atividade da enzima ChE no plasma, foi avaliada nos grupos experimentais e observamos que a dose de 0,1 mg/Kg de m.c não foi capaz de inibir a atividade enzimática, em quaisquer um dos períodos de vida dos animais (Fig. 19A, 19B e 19C).

As concentrações de insulina circulante (plasma) foram determinadas no minuto 15 do GTT, representando assim o nível mde insulina num estado alimentado. Após a exposição ao Malathion (Nulíparas), observamos que o grupo exposto ao Malathion apresentou uma redução ($p<0,05$) de insulina circulante quando comparado ao grupo Controle (Fig. 19D). Apesar disso, durante a Gestação, as concentrações de insulina circulante, foram elevadas ($p<0,05$) no grupo M-0,1 ($1.377,0\pm 564,9$ pg/mL) quando comparadas com o grupo Controle ($732,6\pm 429,2$ pg/mL) (Fig. 19E). No Pós-termo, a insulina em estado alimentado, não foi alterada entre os grupos.

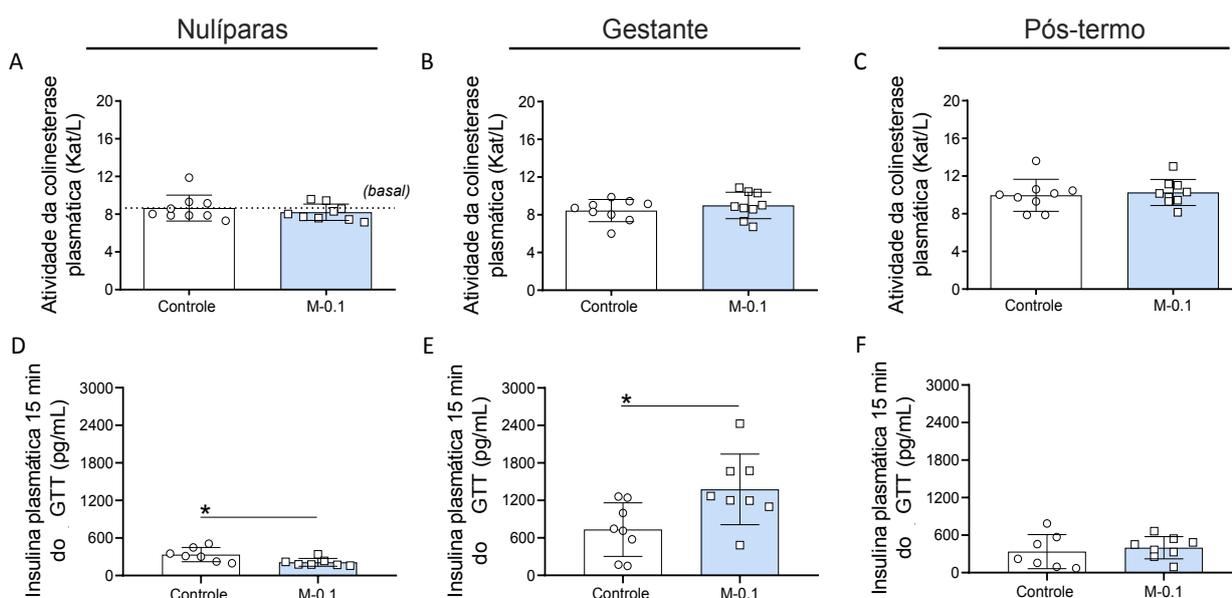


Figura 19: Atividade enzimática da ChE e concentrações de insulina no estado alimentado de ratas Nulíparas, Gestantes e no Pós-termo expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova®, testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias. Atividade plasmática da enzima ChE: A) Nulíparas, B) Gestantes e C) Pós-termo; Concentrações plasmática de insulina no estado alimentado (ipGTT) durante o minuto 15 após a sobrecarga glicêmica - GTT [2 g/Kg m.c]: D) Nulíparas, E) Gestantes e F) Pós-termo. Onde GTT = teste de tolerância a glicose. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, $n=7-9$ animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle ($*p<0,05$).

5.20 Perfil lipídico na exposição ao agrotóxico em dose ultra baixa: triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL)

As concentrações de triglicérides não alteraram entre os grupos após a exposição ao Malathion (Fig. 20A). Porém, durante a gestação (Fig. 20B) as concentrações de triglicérides aumentam de forma fisiológica, como uma resposta a este período do desenvolvimento, sendo que para as ratas expostas ao agrotóxico (M-0,1), esta elevação ($p < 0,01$) foi significativa ($236,6 \pm 36,17$ mg/dL), quando comparamos com os valores obtidos pela análise do grupo Controle ($190,1 \pm 30,5$ mg/dL). No período Pós-termo não houve alterações de triglicérides (Fig. 20C).

As concentrações de colesterol total aumentaram ($p < 0,0001$) no grupo M-0,1 ($214,5 \pm 31,5$ mg/dL), durante a gestação, quando comparado ao grupo Controle ($131,6 \pm 15,7$ mg/dL) (Fig. 7E). Nos demais períodos de vida avaliados, Nulíparas e Pós-termo (Fig. 20D e 20F) nenhuma alteração nas concentrações de colesterol total foram constatadas.

As frações de colesterol HDL circulantes não foram alteradas entre os grupos em nenhum dos estágios de vida das ratas. Já as concentrações de colesterol, frações LDL (Fig. 20K) e VLDL (Fig. 20N) que foram calculadas a partir da concentração circulante dos demais lipídicas, observamos que no grupo exposto ao Malathion, quando comparados ao grupo Controle, estes valores estavam aumentados.

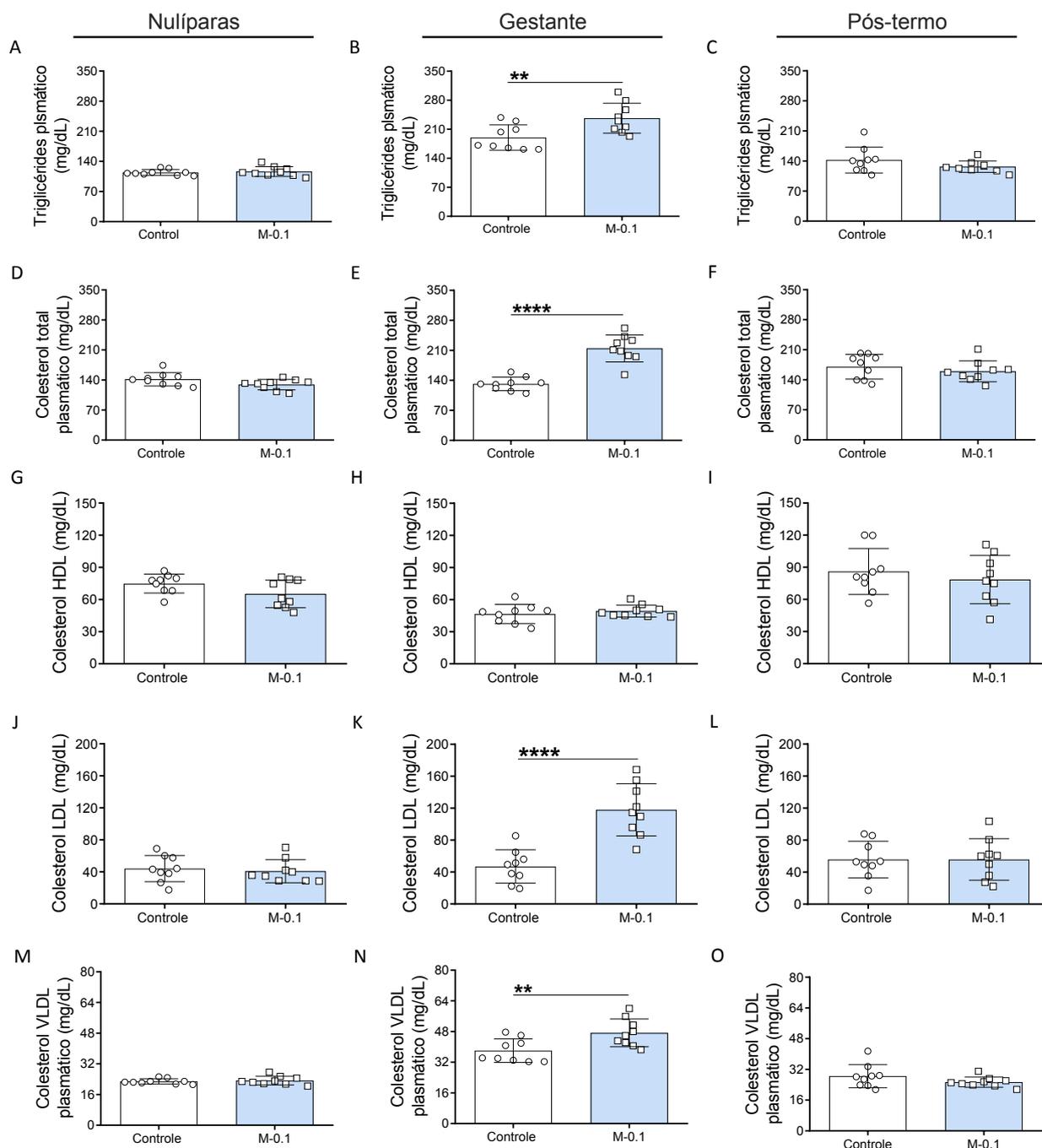


Figura 20: Determinação das concentrações plasmática de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias, avaliações realizadas após o tratamento em animais Controle e M-0,1. Concentrações de Tríglicérides: A) Nulíparas; B) Gestantes; C) Pós-termo. Concentrações de Colesterol total: D) Nulíparas; E) Gestantes; F) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração HDL: G) Nulíparas; H) Gestantes; I) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração LDL: J) Nulíparas; K) Gestantes; L) Pós-termo. Concentrações de Colesterol fração VLDL: M) Nulíparas; N) Gestantes; O) Pós-termo. Onde HDL = lipoproteínas de alta densidade, LDL = lipoproteínas de baixa densidade, VLDL = lipoproteínas de muito baixa densidade. Grupos experimentais Malathion Cheminova

M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c].
Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Amostra plasma. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (**p<0,01 e ****p<0,0001).

5.21 Avaliações das funções renal e hepática em ratas expostas a dose ultra baixa de Malathion

A integridade da função renal foi avaliada através das concentrações plasmática de uréia e de creatinina, os resultados apontaram que apenas na gestação o grupo M-0,1 apresentou elevação ($p < 0,01$) para as concentrações de uréia plasmática e de creatinina ($p < 0,05$), conforme pode ser observada na figura 21B e 21E, respectivamente.

Para a função hepática determinamos a concentração enzimática das transaminases ALT-TGP e AST-TGO. A atividade enzimática de ALT-TGP, foi elevada apenas no período gestacional no grupo M-0,1 ($41,95 \pm 10,9$ U/L) quando comparados com os grupos Controle (Fig. 21H), valores de ($23,9 \pm 7,4$ U/L).

Na avaliação após exposição (fêmeas nulíparas), durante a gestação (no vigésimo dia) e no pós-termo, os níveis de AST-TGO apresentaram-se elevados no plasma. Houve um aumento nas concentrações circulantes no grupo expostos ao OP (M-0,1) quando comparados ao grupo Controle (Fig. 21J, 21K e 21L). O aumento apresentado pelas ratas expostas (M-0,1), quando comparados as ratas Controles, foi de $\approx 37\%$ nas Nulíparas, $\approx 92\%$ durante a gestação e $\approx 88\%$ no pós-termo.

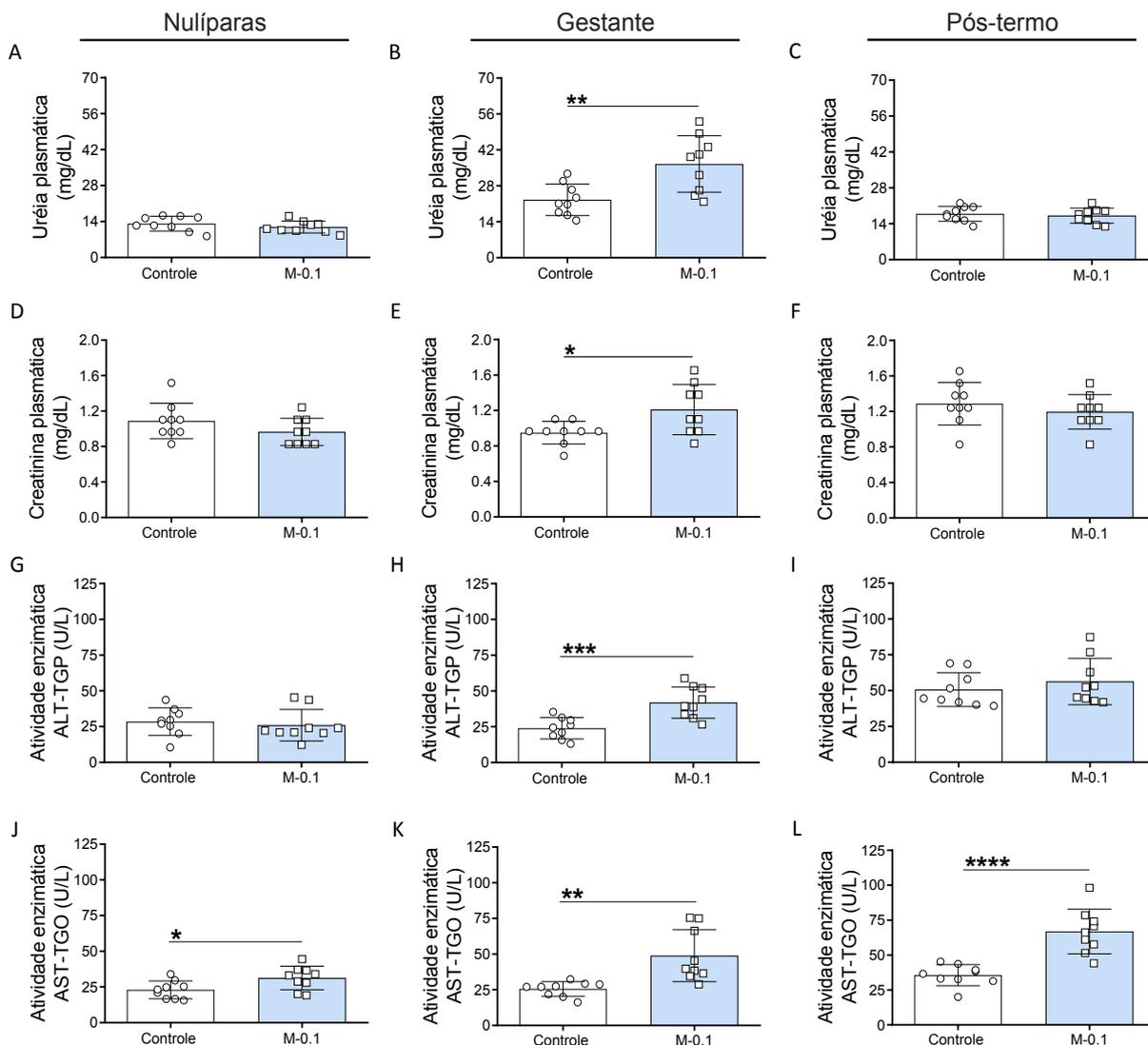


Figura 21: Avaliação da função renal e hepática pelas concentrações plasmáticas de uréia, creatinina, transaminase glutâmico oxalacética – TGO e transaminase glutâmico pirúvica- TGP, de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], testado em ratas adultas (*Wistar*) por um período de 21+5 dias, avaliações realizadas após o tratamento em animais Controle e M-0,1. Concentrações de Uréia: A) Nulíparas; B) Gestantes; C) Pós-termo. Concentrações de Creatinina: D) Nulíparas; E) Gestantes; F) Pós-termo. Concentrações da enzima ALT-TGP: G) Nulíparas; H) Gestantes; I) Pós-termo. Concentrações da enzima AST-TGO: J) Nulíparas; K) Gestantes; L) Pós-termo. Amostras plasmáticas. Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's. Prisma 8.0, n=9 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e ****p<0,0001).

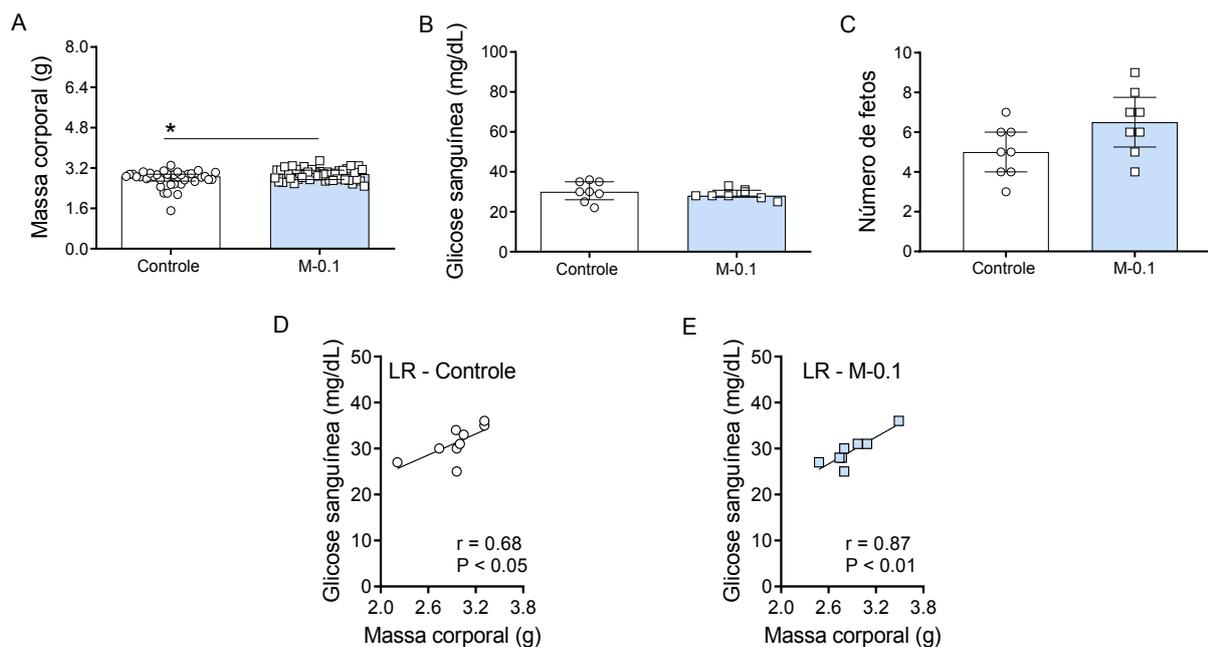
5.22 Alteração murinométrica (massa corporal) e metabólica (glicose sanguínea) apresentado pelos fetos (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathionem dose ultra baixa

As ratas eutanasiadas no vigésimo dia da gestação, tiveram seus fetos sexados e avaliados para determinação de eventuais distúrbios no desenvolvimento e metabolismo da glicose. Os fetos, tanto os machos, quanto as fêmeas, de ratas expostas ao OP, apresentaram uma elevação da massa corpórea (Fig. 22A e 22F), massa de $2,93 \pm 0,2$ g e $2,77 \pm 0,2$ g para machos e fêmeas, respectivamente, quando comparados ao grupo Controle (machos $2,77 \pm 0,3$ g e fêmeas $2,64 \pm 0,2$ g).

A glicose sanguínea nos fetos (machos e fêmeas) não apresentou alteração entre os grupos avaliados (Fig. 22B e 22G). E as correlações entre massa corporal e glicose sanguínea, estabelecidas para cada grupo experimental e seus respectivos gêneros (correlação de Pearson (r)), apresentaram os mesmos padrões que havimos vistos nos estudos das demais doses (M-14 e M-140). A correlação foi maior nos fetos (machos e fêmeas) oriundos de ratas expostas, (Fig. 22E e 22J), M-0,1 (valor de $r = 0,87$ para machos e $r = 0,81$ para fêmeas), Controle (valor de $r = 0,68$ para machos e $r = 0,74$ para fêmeas).

Não houve diferença no número de fetos machos (Fig. 22C) e de fêmeas (Fig. 22H) entre os grupos estudados.

Machos



Fêmeas

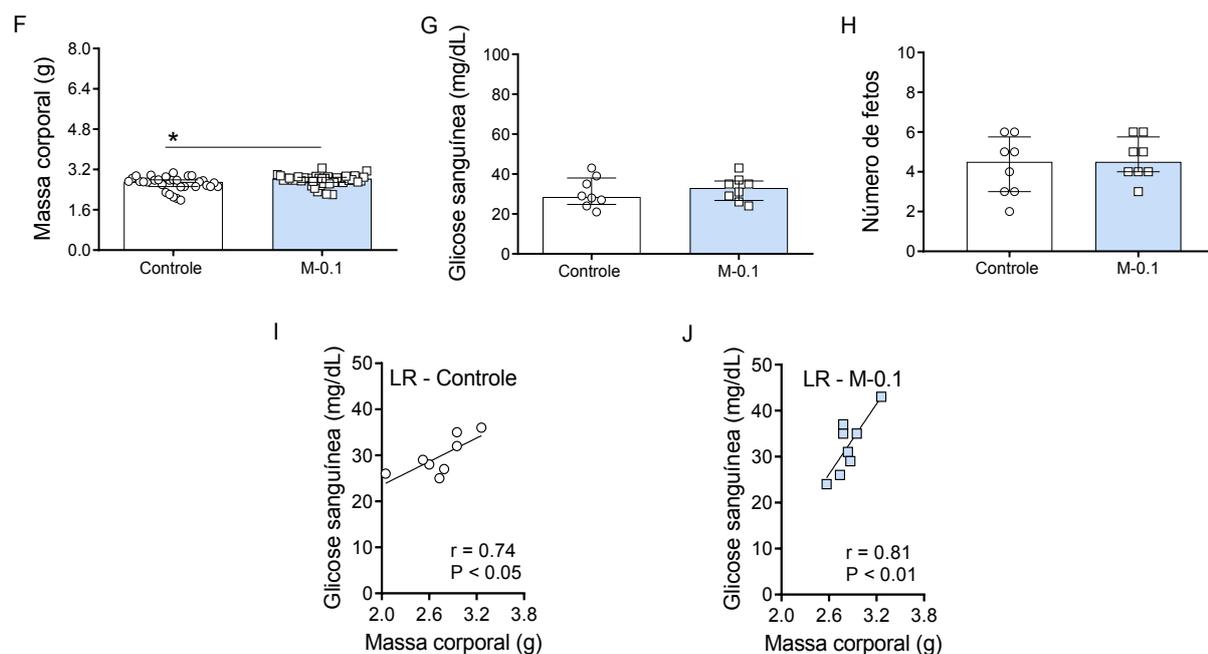


Figura 22: Massa corporal, glicose sanguínea e sua correlação em fetos (machos e fêmeas) de ratos expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], avaliações realizadas nos fetos vigésimo dia de desenvolvimento) de genitoras expostas ao OP por um período de 21+5 dias antes da gestação. Fetos machos: A) Massa corporal; B) Glicose sanguínea; C) Número de fetos; D) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos Controle; E) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-0,1. Fetos fêmeas: F) Massa corporal; G) Glicose sanguínea; H) Número de fetos; I) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos Controle; J) Correlação de Pearson (massa corpórea vs glicemia) em fetos M-0,1. Fetos oriundos de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de

milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's em A, C e F. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em B, G e H. Regressão linear – Correlação de Pearson em D, E, I e J (valores de 'p' indicados no gráfico). Prisma 8.0, n=8-48 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05).

5.23 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa

O grupo de gestantes que veio a termo, tiveram seus progenitores acompanhados até a fase adulta (90 dias). Durante o seu desenvolvimento, a glicose sanguínea foi avaliada aos 30 e 60 dias de vida (sob jejum), e os testes de ipGTT e ipITT, foram realizados.

O acompanhamento no desenvolvimento da prole de machos demonstrou não haver diferenças nos níveis glicêmicos aos 30 e 60 dias de vida (Fig. 23A e 23B). Entretanto, próximo dos 90 dias após nascimento, quando foi realizado ipGTT [2g/Kg de m.c], observamos que os filhos de mães expostas a dose [0,1mg/Kg de m.c] (M-0,1), apresentaram intolerância à glicose quando comparado ao grupo Controle (Fig. 23C). A significância do resultado ($p < 0,001$) pode ser observada com melhores detalhes na análise da área sob a curva – AUC, apresentado graficamente na figura 23D. Os níveis de glicose do grupo Malathion durante a performance do teste foram maiores nos minutos 30 e 60, quando comparado ao Controle (animais oriundos de ratas sem exposição).

A prole também foi submetida ao teste ipITT [1Ui/Kg de m.c], para avaliação da resposta à insulina (Fig. 23E), que foi avaliada pelo cálculo da constante de decaimento (K_{ITT}), não observamos alterações do padrão de resposta entre os grupos M-0,1 e Controle.

Os níveis de triglicérides (Fig. 23G) e de colesterol total plasmático circulante (Fig. 23H) foram mensurados e não apresentaram diferenças nas suas respectivas concentrações plasmáticas entre os grupos avaliados.

Na função hepática determinada pelas concentrações plasmáticas das transaminases, apenas para a enzima AST-TGO (Fig. 23J) observamos alterações, com elevação na atividade desta enzima ($p < 0,05$), com um maior nível circulante nos filhos de ratas expostas (M-0,1) quando comparados ao grupo Controle.

Machos

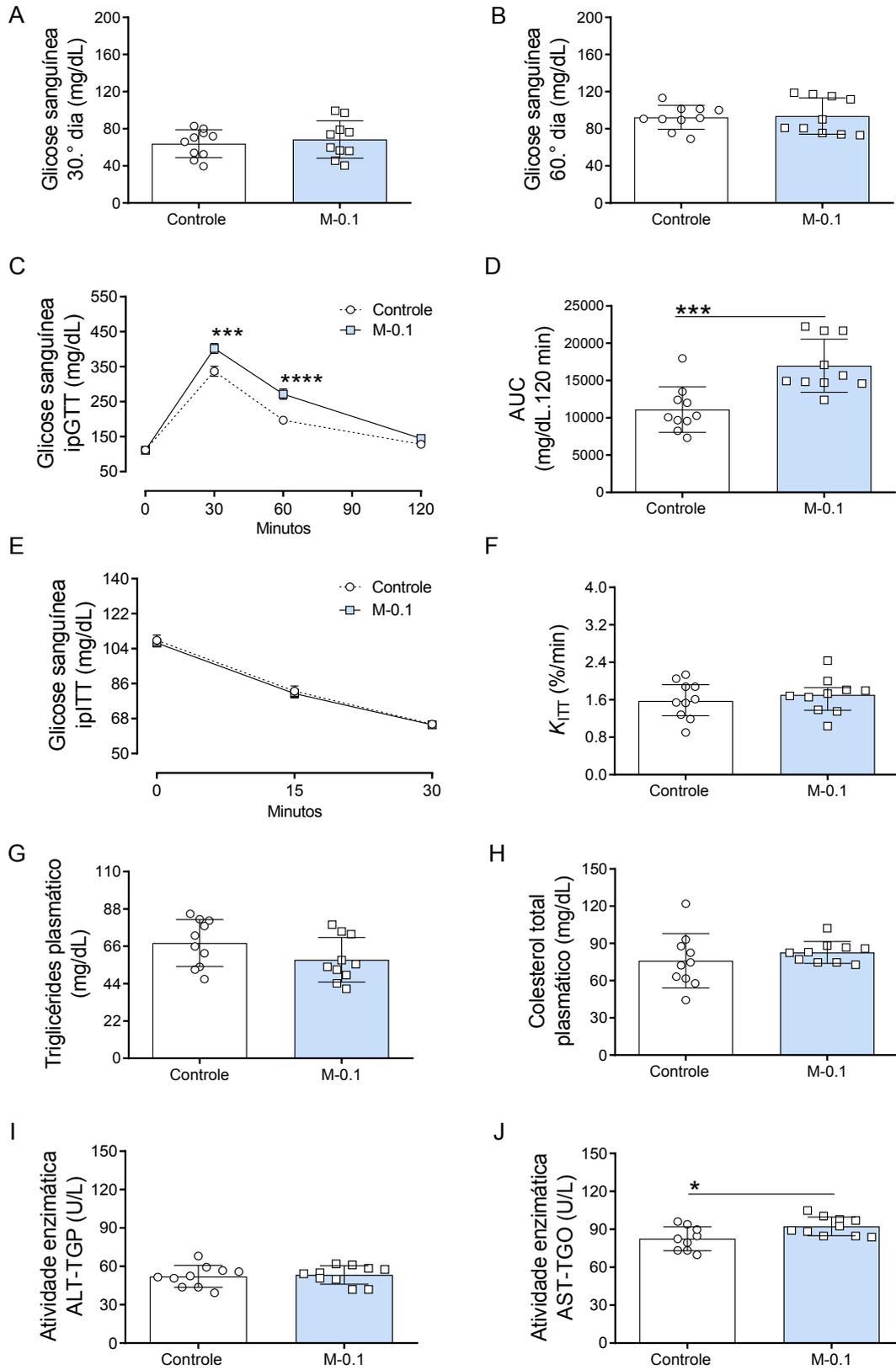


Figura 23: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, resposta a sobrecarga de glicose (ipGTT), resposta a insulina (ipITT), triglicérides, colesterol total e função hepática) da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa. Prole de machos de ratas expostas ao OP Malathion por um período de 21+5 dias. A) Glicose sanguínea no 30° dia; B) Glicose sanguínea no 60° dia; C) Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT); D) Área sob a curva (AUC) do teste intraperitoneal de tolerância à glicose; E) Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT); F) Constante de decaimento (^KITT) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina; G) Triglicérides; H) Colesterol total; I) Atividade enzimática ALT-TGP; J) Atividade enzimática AST-TGO; Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 filhos de ratas expostas à [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle, filhos de ratas expostas à [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's para A, B, D, G, H, I e J. Média ± desvio padrão, ANOVA *two-wai post hoc* Holm-Sidak para C e E. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em F. Prisma 8.0, n=8-10 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, ***p<0,001 e **** p<0,0001).

5.24 Alterações metabólicas apresentadas pela prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa

A prole (fêmeas) acompanhadas até a fase adulta (90 dias) apresentou ao longo do seu desenvolvimento perturbações nos níveis glicêmicos. Aos 30 dias de vida (Fig. 24A) as progenitoras oriundas de ratas expostas ao agrotóxico (M-0,1) apresentaram elevação ($p < 0,05$) das concentrações de glicose sanguínea quando comparadas ao grupo Controle, essa elevação foi mais exacerbada ($p < 0,001$) aos 60 dias de vida (Fig. 24B).

Ao submeter a prole (fêmeas) ao ipGTT [2g/Kg de m.c], observamos uma intolerância a sobrecarga de glicose, que o grupo M-0,1 apresenta quando comparamos ao grupo Controle (Fig. 24C). Esta intolerância à glicose foi observada tanto no minuto 30 do teste, como também no minuto 60. A área sob a curva - AUC evidência está diferença (Fig. 24D) demonstrando a intolerância no grupo M-0,1 na comparação com animais sem exposição ($p < 0,01$). Assim como os machos, a prole (fêmeas) não apresentou alteração na sensibilidade à insulina avaliados nos testes ipITT (Fig. 24E) e cálculo de constante de decaimento K_{ITT} (Fig. 24F).

Os níveis de triglicérides (Fig. 24G) e de colesterol total plasmático circulante (Fig. 24H) não apresentaram diferenças nas suas respectivas concentrações plasmáticas entre M-0,1 e Controle.

A função hepática determinada pelas concentrações plasmáticas das transaminases, similarmente a resposta obtida com os machos, observamos alterações apenas para a enzima AST-TGO (Fig. 24J), com elevação na atividade desta enzima ($p < 0,01$), com um maior nível circulante nas fêmeas M-0,1.

Fêmeas

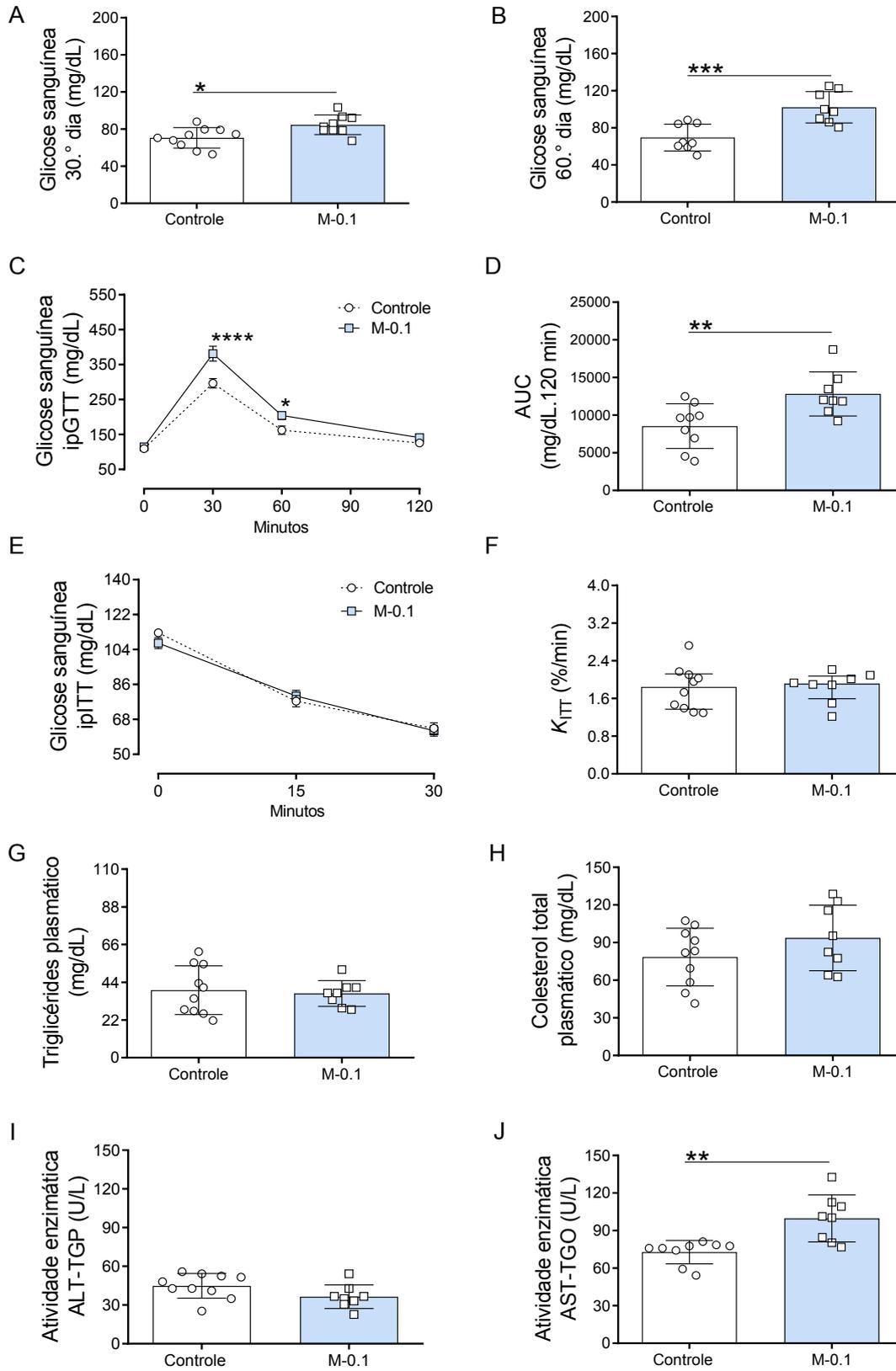


Figura 24: Alterações metabólicas (glicose sanguínea, resposta a sobrecarga de glicose (ipGTT), resposta a insulina (ipITT), triglicérides, colesterol total e função hepática) da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa. Prole de fêmeas de ratas expostas ao OP Malathion por um período de 21+5 dias. A) Glicose sanguínea no 30° dia; B) Glicose sanguínea no 60° dia; C) Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT); D) Área sob a curva (AUC) do teste intraperitoneal de tolerância à glicose; E) Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT); F) Constante de decaimento (^KITT) do teste intraperitoneal de tolerância à insulina; G) Triglicérides; H) Colesterol total; I) Atividade enzimática ALT-TGP; J) Atividade enzimática AST-TGO; Onde ALT-TGP = alanina aminotransferase - transaminase glutâmico pirúvica, AST-TGP = aspartato aminotransferase - transaminase glutâmico oxalacética. Grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 filhos de ratas expostas à [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle, filhos de ratas expostas à [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, ANOVA *post hoc* Tuckey's para A, B, D, G, H, I e J. Média ± desvio padrão, ANOVA *two-wai post hoc* Holm-Sidak para C e E. Mediana e intervalo interquartil, Kruskal-wallis com *post test* de Dunn em F. Prisma 8.0, n=8-10 animais por grupo. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 e **** p<0,0001).

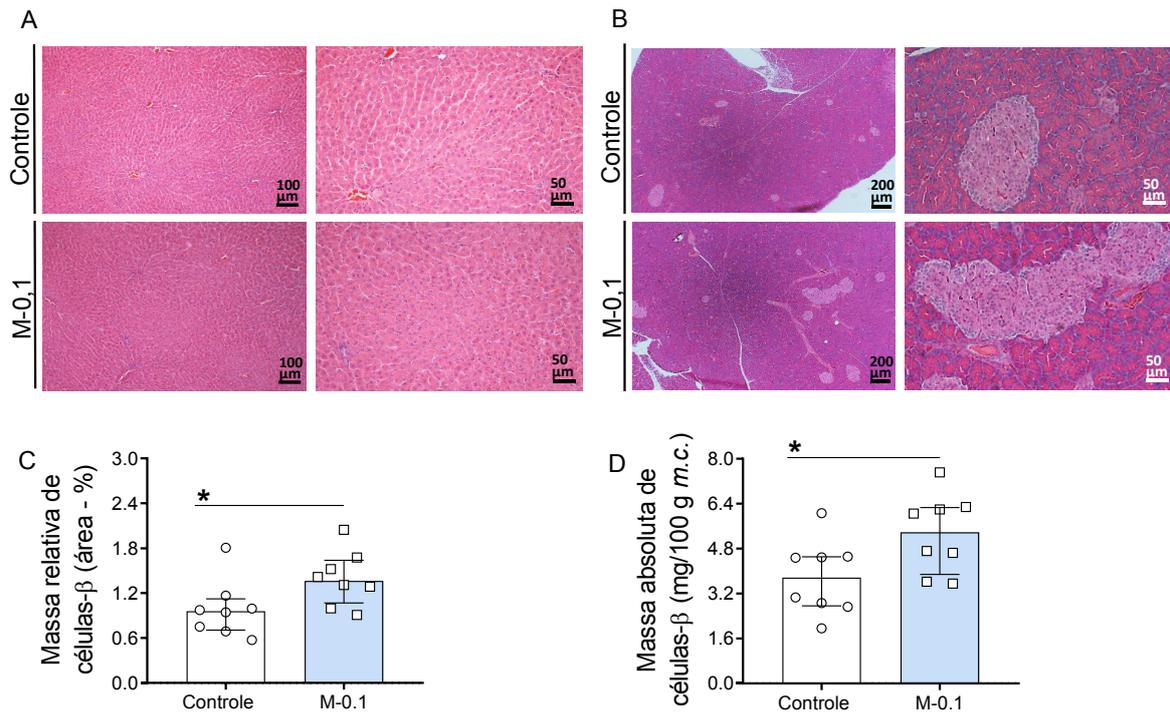
5.25 Morfologia hepática, pancreática e determinação da massa de células β na prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa

A histologia do tecido hepático demonstrado nas figuras 25A (machos) e 25E (fêmeas) revelou um parênquima com disposição de hepatócitos normais (cordões celulares interligados), sinusoides, área clara entre os cordões, espaço de Disse estreitos e veia centrolobular com dilatação normal. Sem distinção da morfologia entre os grupos estudados tanto para machos como para as fêmeas.

Já a análise das fotomicrografias do tecido pancreático, revelou que nos machos (Fig. 25B), a porção endócrina (estruturas menos coradas), estavam com tamanho considerável, aparentemente maiores quando comparado aos machos Controles (observação confirmada quantitativamente pela determinação da massa endócrina). As demais estruturas do pâncreas com o parênquima exócrino apresentavam um conjunto de ácinos (maior proporção tecidual), unidos por ductos intercalares sem distinções de aspectos entre os grupos em ambos os sexos. Fotomicrografia do pâncreas demonstrado na figura 25F para a prole de ratos fêmeas.

A análise quantitativa da porção endócrina do pâncreas nos machos, confirmou as observações feitas a partir das fotomicrografias, demonstrando haver um aumento tanto da massa relativa de células β (Fig. 25C) quanto da massa absoluta de células β (Fig. 25D) entre os grupos estudados. Nas fêmeas não observamos alterações de massa endócrina no tecido pancreático (Fig. 25E e 25H).

Machos



Fêmeas

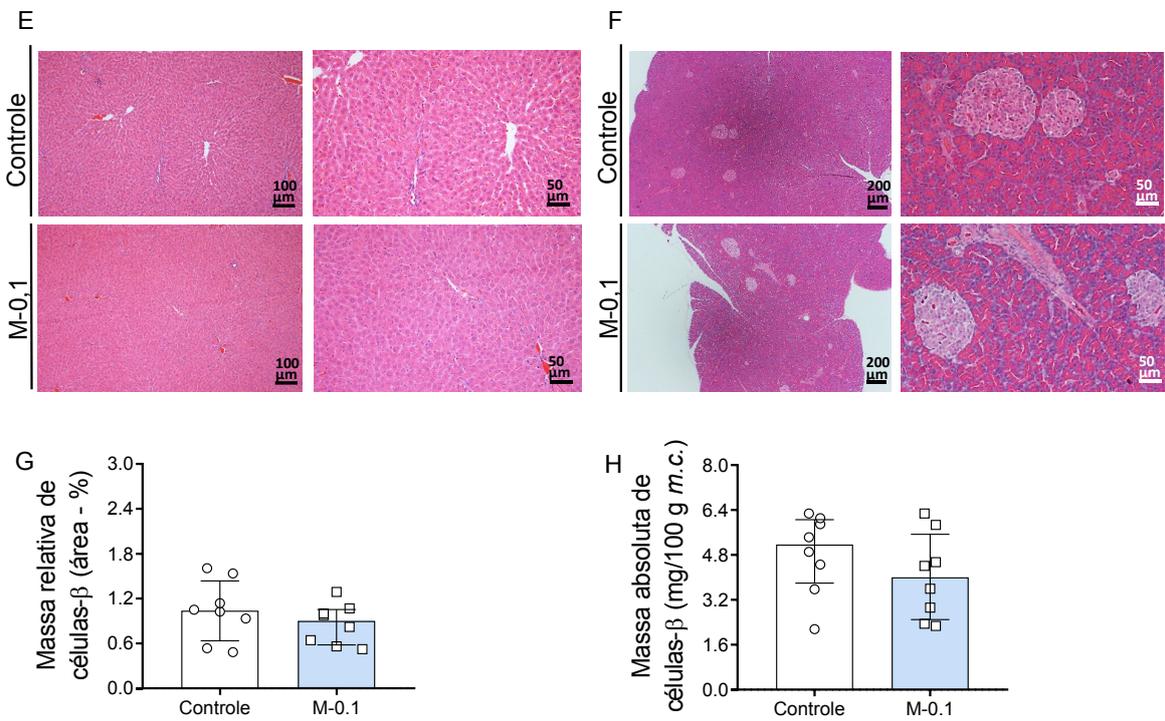


Figura 25: Avaliação qualitativa da morfologia hepática e pancreática e avaliação quantitativa da massa de células β da prole F1 (machos e fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], progenitores adultos (90 dias) oriundos de ratas expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. Fotomicrografia de cortes histológicos corados em HE, grupos experimentais: Controle e M-0,1. Nas linhas são representados os grupos experimentais e nas colunas o aumento de 100X e 200X para o tecido hepático e 40X e 200X para o tecido pancreático. Machos: A) Fotomicrografia do tecido hepático; B) Fotomicrografia do tecido pancreático; C) Massa relativa de células β ; D) Massa absoluta de células β . Fêmeas: E) Fotomicrografia do tecido hepático; F) Fotomicrografia do tecido pancreático; G) Massa relativa de células β ; H) Massa absoluta de células β . Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova (M-14 [14 mg/Kg de m.c], M-140 [140 mg/Kg de m.c]) e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média \pm desvio padrão, Teste t não-pareado em C, D, G e H. Prisma 8.0, n=8 animais por grupo.

5.26 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa

A metilação global, avaliada pelo percentual de metilação do promotr gênico LINE1 (Fig. 26A), não foi alterada na prole adulta de ratas expostas ao Malathion. A expressão relativa do gene LINE1 foi mantida entre os grupos (Fig. 26C). O percentual de metilação do gene promotor da FOXO1 também não foi alterado, contudo a expressão relativa deste gene foi suprimida ($p < 0,01$) nos machos nascidos de ratas expostas ao Malathion na dose de 0,1 mg/Kg de m.c, quando comparados ao seu Controle (Fig. 26D).

A expressão dos genes das metilases, família das DNMTs, não foi alterada quanto a sua expressão relativa no sub-tipo 1 (DNMT1 (Fig. 26E)), mas as DNMT3A (Fig. 26F) e DNMT3B (Fig. 26G) apresentaram supressão da expressão gênica relativa destas metilases nas proles de ratas expostas ao OP ($p < 0,01$ e $p < 0,001$).

As TETs (desmetilases) apresentaram diferenças no seu padrão de expressão, enquanto a conformação 1 (TET1) não se alterou (Fig. 26H), a conformações TET2 (Fig. 26I) apresentou uma superexpressão do gene no grupo M-0,1 em comparação ao Controle. O sub-tipo 3, TET3 (Fig. 26J), apresentou supressão da expressão relativa do gene quando a prole é oriunda de ratas expostos ao Malathion.

Machos

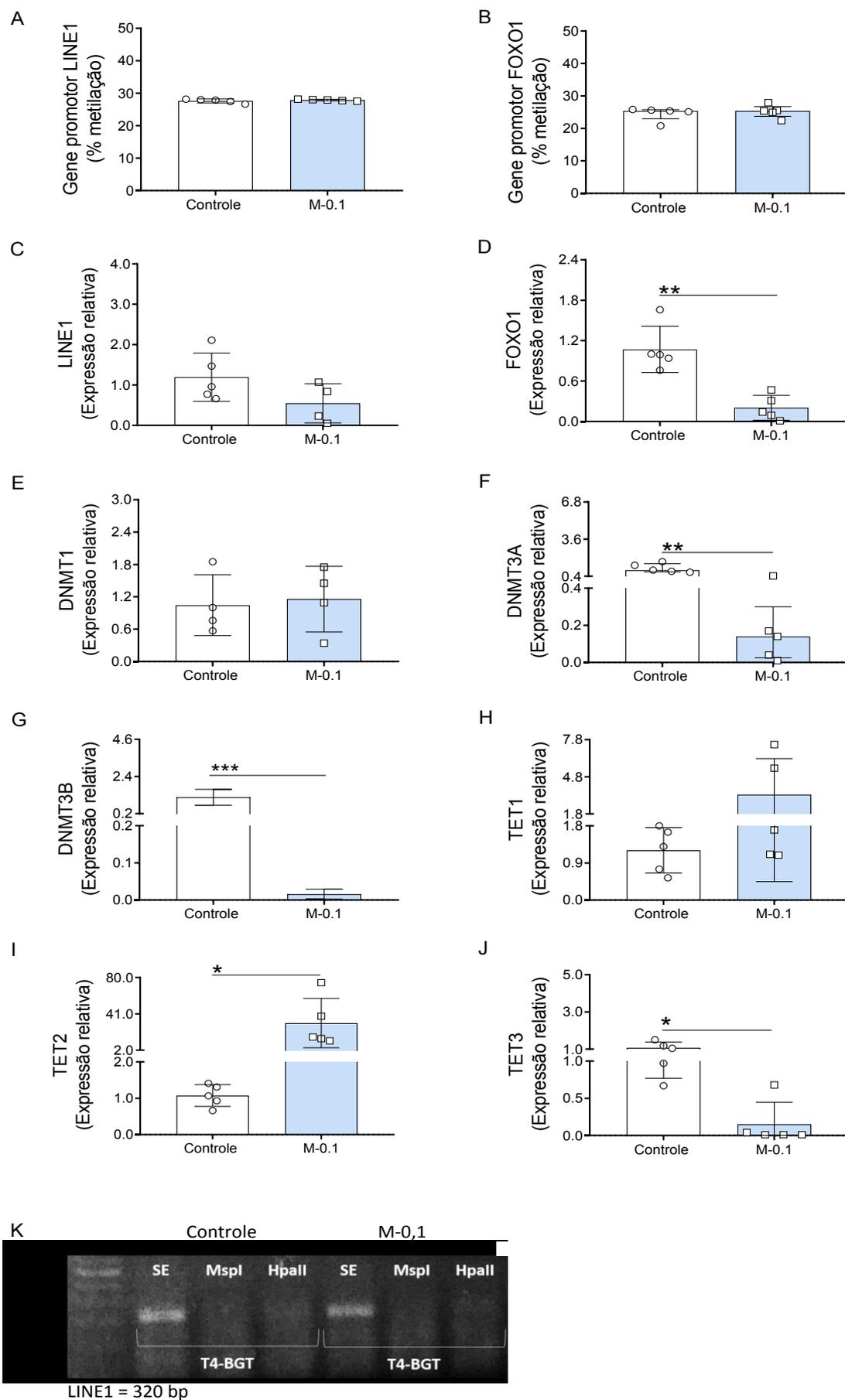


Figura 26: Perfil epigenômico de progenitores (machos) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], avaliação realizada na prole adulta, machos, com 90 dias de idade, oriundos de genitoras expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. A) Metilação do gene promotor LINE1; B) Metilação do gene promotor FOXO1; C) Expressão relativa de LINE1; D) Expressão relativa de FOXO1; E) Expressão relativa de DNMT1; F) Expressão relativa de DNMT3A; G) Expressão relativa de DNMT3B; H) Expressão relativa de TET1; I) Expressão relativa de TET2; J) Expressão relativa de TET3; K) Imagem representativa da densitometria das amostras submetidas a eletroforese. Onde LINE1 = *Long Interspersed Element-1*, FOXO1 = *Forkhead box protein O1*, DNMT = DNA metiltransferase subtipos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e TET = desmetilase dez-onze proteína de translocação subtipos (TET1, TET2 e TET3). Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste t não-pareado em em A, C, D, E, F, G, H, I e J. Mediana e intervalo interquartil, Teste t com *post test* de Mann-Whitney em B. Prisma 8.0, n=4-5 animais por grupo. Amostra tecido hepático. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05, **p<0,01 e *** p<0,001).

5.27 Caracterização das modificações epigenômicas da prole F1 (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa

O perfil de metilação dos genes LINE1 e FOXO1 avaliados pelo percentual de metilação dos seus respectivos promotores, demonstrou não haver alteração na metilação gênica (Fig. 27A e 27B). E a análise da expressão relativa destes genes (Fig. 27C e 27D) apresentou equivalência entre grupo (M-0,1 vs Controle).

A expressão relativa das metilases DNMTs e seus sub-tipos, não foi alterado, apresentando os mesmos padrões de expressão entre grupo exposto ao OP (M-0,1) e grupo Controle (Fig. 27E, 27F e 27G). Já o perfil das desmetilases (TETs), observamos superexpressão gênica de TET1 ($p < 0,05$), conforme pode ser observado na figura 27H, e supressão gênica de TET2 e TET3 (Fig. 27I e 27J) nos grupos de progenitoras de ratas expostas ao OP quando comparadas aos animais sem exposição (Controle).

Fêmeas

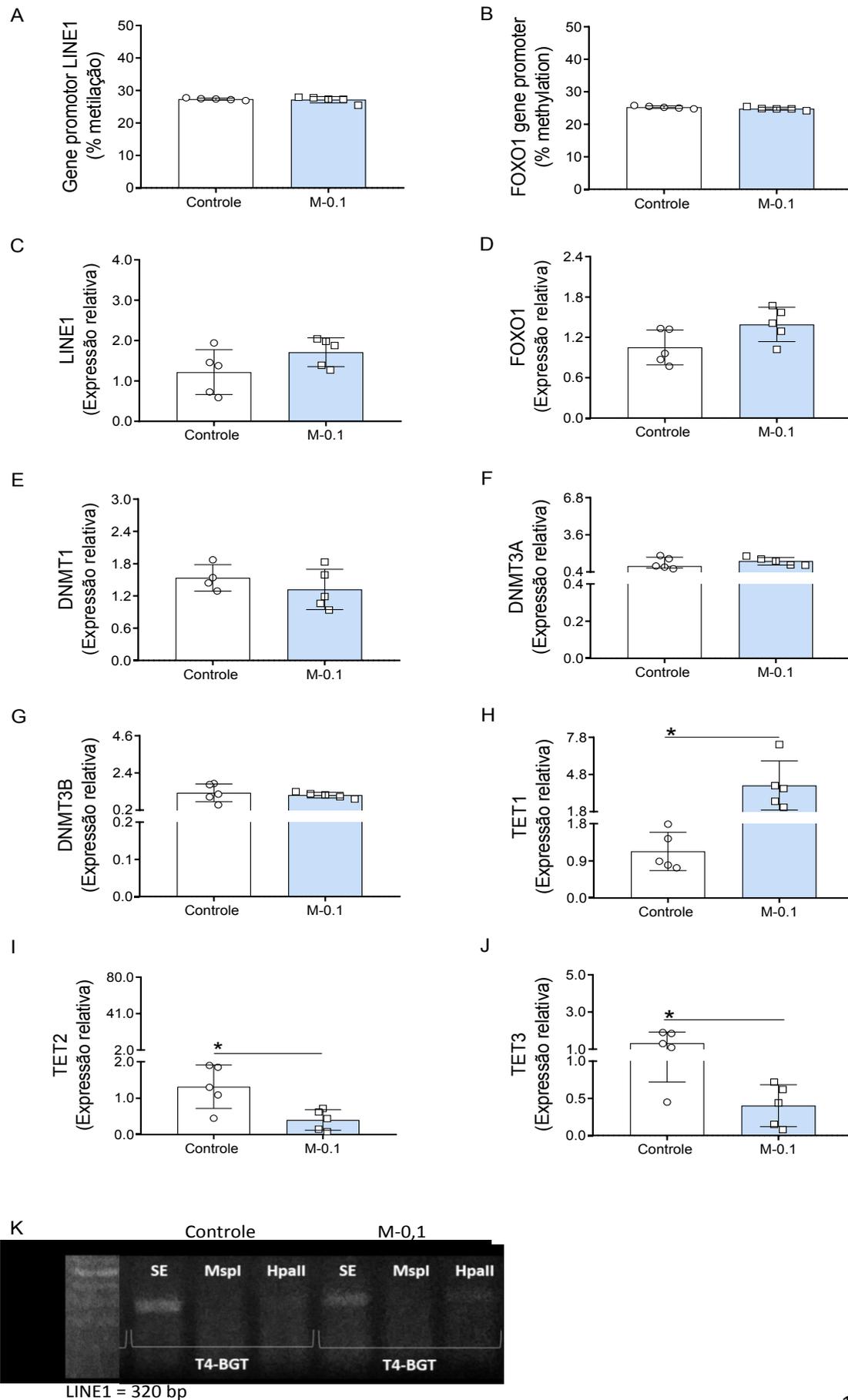


Figura 27: Perfil epigenômico de progenitores (fêmeas) de ratas expostas ao Malathion em dose ultra baixa – Malathion Cheminova[®], avaliação realizada na prole adulta, machos, com 90 dias de idade, oriundos de genitoras expostas ao agrotóxico por um período de 21+5 dias antes da gestação. A) Metilação do gene promotor LINE1; B) Metilação do gene promotor FOXO1; C) Expressão relativa de LINE1; D) Expressão relativa de FOXO1; E) Expressão relativa de DNMT1; F) Expressão relativa de DNMT3A; G) Expressão relativa de DNMT3B; H) Expressão relativa de TET1; I) Expressão relativa de TET2; J) Expressão relativa de TET3; K) Imagem representativa da densitometria das amostras submetidas a eletroforese. Onde LINE1 = *Long Interspersed Element-1*, FOXO1 = *Forkhead box protein O1*, DNMT = DNA metiltransferase subtipos (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B) e TET = desmetilase dez-onze proteína de translocação subtipos (TET1, TET2 e TET3). Prole de genitoras dos grupos experimentais Malathion Cheminova M-0,1 [0,1 mg/Kg de m.c] e grupo Controle [0 mg/Kg m.c], veículo – óleo de milho [1 mL/Kg de m.c]. Dados expressos em média ± desvio padrão, Teste t não-pareado em em A, B, C, D, E, F, G, H, I e J. Prisma 8.0, n=4-5 animais por grupo. Amostra tecido hepático. Asterisco (*) indica diferença vs Controle (*p<0,05).

5.28 Resultados sumarizados dos principais parâmetros avaliados nas progenitoras expostas ao Malathion em comparação ao grupo Controle

Quadro 7: Sumário das principais alterações quantitativas das progenitoras expostas ao Malathion vs Controle

PROGENITORAS (comparação vs Controle)									
PARÂMETROS AVALIADOS	Nulíparas			Gestantes			Pós-termo		
	M-0,1	M-14	M-140	M-0,1	M-14	M-140	M-0,1	M-14	M-140
Massa corpórea	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-
Massa adiposa	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Massa hepática	↑	-	-	↑	-	-	↑	-	↑
Glicose sanguínea basal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose sanguínea (min 60 do GTT)	↓	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑
Glicose sanguínea (min 120 do GTT)	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑
AUC (GTT)	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Atividade colinesterase	-	↓	↓	-	-	-	-	↓	↓
Insulina (jejum)	/	-	-	/	-	-	/	-	-
Insulina (alimentado)	↓	-	-	↑	-	↓	-	↑	-
Massa de células β	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triglicérides	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-
Colesterol total	-	-	↑	↑	-	↑	-	-	-
Colesterol HDL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colesterol LDL	-	↑	↑	↑	-	-	-	-	-
Colesterol VLDL	-	-	-	↑	↑	↑	-	-	-
Uréia	-	-	-	↑	-	-	-	-	-
Creatinina	-	-	-	↑	-	-	-	-	-
ALT-TGP	-	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑
AST-TGO	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Leucócitos	/	↑	↑	/	↑	↑	/	↑	↑

Sem alteração (-); Aumento (↑); Redução (↓); Teste não aplicado (/)

5.29 Resultados sumarizados dos principais parâmetros avaliados nos fetos e na prole (machos e fêmeas) em comparação ao grupo Controle

Quadro 8: Sumário das principais alterações quantitativas dos fetos e prole (machos e fêmeas) de progenitoras expostas ao Malathion, comparação vs Controle

FETOS (comparação vs Controle)						
PARÂMETROS AVALIADOS	Machos			Fêmeas		
	M-0,1	M-14	M-140	M-0,1	M-14	M-140
Massa corpórea	↑	-	-	↑	-	-
Glicose sanguínea basal	-	-	-	-	-	↑
PROLE (comparação vs Controle)						
PARÂMETROS AVALIADOS	Machos			Fêmeas		
	M-0,1	M-14	M-140	M-0,1	M-14	M-140
Massa corpórea	-	-	-	-	-	-
Glicose sanguínea 30 dias	-	-	-	↑	-	-
Glicose sanguínea 60 dias	-	↑	↑	↑	↑	↑
AUC (ipGTT)	↑	↑	-	↑	↑	↑
^k ITT (ipITT)	-	/	/	-	/	/
Triglicérides	-	-	-	-	↑	-
Colesterol total	-	-	-	-	-	-
ALT-TGP	-	-	-	-	-	-
AST-TGO	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Lipoperoxidação	/	-	-	/	-	↑
Catalase	/	-	-	/	↑	-
Massa de células β	↑	-	-	-	-	-
LINE1 (% metilação)	-	↑	↑	-	-	-
LINE1 (expressão gênica)	-	↑	-	-	-	-
FOXO1 (% metilação)	-	↑	↑	-	↑	↑
FOXO1 (expressão gênica)	↓	-	↓	-	-	↓
DNMT1	-	↓	↓	-	↓	↓
DNMT3A	↓	↓	↓	-	↑	-
DNMT3B	↓	↓	↓	-	↑	↓
TET1	-	↓	↓	↑	-	-
TET2	↑	↓	↓	↓	↓	↓
TET3	↓	↓	↓	↓	-	-

Sem alteração (-); Aumento (↑); Redução (↓); Teste não aplicado (/)

6. Discussão:

Nossa pesquisa teve como objetivo principal investigar o potencial efeito do Malathion como um fator de risco para o desenvolvimento de DMG quando ratas são expostas, por um período de tempo que antecede a gestação, ao pesticida OP. O primeiro passo por nós desenvolvido, foi definir a marca de Malathion a ser usado. Das formulações disponíveis, duas foram selecionadas, Malathion Cheminova[®] 1000CE e Malathion Dipil[®] 500CE testados em duas doses distintas [70 mg/Kg, m.c] e [140 mg/Kg, m.c] para cada uma das marcas, pelo período de 30 dias. Das análises, três pontos foram cruciais para definir o produto: i) levar à inibição da ChE de maneira dose-resposta; ii) apresentar o mínimo de efeitos tóxicos (função hepática); iii) não afetar as concentrações sanguíneas de glicose, vez que para ser considerado um fator de risco em nosso estudo o composto não deveria alterar os valores basais ao término do período de exposição.

Os dados do piloto 1, nos levaram a “descartar” o uso do Malathion Dipil[®] 500CE. As razões para a nossa decisão basearam-se na sua composição (50% solvente) e nos dados apresentados pelo ensaio, tendo o efeito tóxico sobre a dosagem de AST-TGO (Fig. 1H) forte apelo para a decisão. Contribuiu ainda para a escolha, a perda de massa corpórea apresentada pelos animais quando comparamos as duas marcas de Malathion com as mesmas doses (Fig. 1E). Observamos que os animais tratados com o Malathion da marca Dipil não mantiveram ganho ponderal de massa corpórea positiva, na verdade tiveram perda da massa corpórea. Ao que parece, esse é um desfecho, portanto, que tem relação com o solvente e não com o agrotóxico. O solvente utilizado nas formulações de Malathion Dipil é o xileno, e sintomas como náuseas, vômitos, falta de apetite e desconforto gástrico do trato gastrointestinal são relatados frente a exposição ao xileno (Nersesian *et al.*, 1985).

Tendo definido pela escolha do Malathion, marca Cheminova, seguimos com a determinação da dose, um ensaio executado com fêmeas em quatro grupos experimentais: um controle (Controle) e três doses do OP ([14, 70 e 140 mg/Kg m.c], pelo período de 30 dias consecutivos, escolhidos com base em estudos prévios com o uso de ratos adultos (Flehi-Slim *et al.*, 2015). Não encontramos alterações nos valores de glicose sanguínea em jejum (Fig. 2A) ou durante o desafio glicêmico (Fig. 2B). Neste contexto Pournourmohammadi e colaboradores (2005) demonstraram que estas alterações só ocorreram, em ratos, com uma dose acima de 200 mg/Kg de m.c, e efeitos

em doses menores, como a dose de 100 mg/Kg de m.c, também testada no estudo, não alteraram a glicemia (jejum) nem a massa corporal, embora reduzam de forma dose-resposta a atividade da enzima ChE, algo que também constatamos em nosso piloto.

As fêmeas parecem de algumas formas mais susceptíveis aos efeitos do Malathion, isso pode ser afirmado quando comparamos a diferença no padrão das alterações vistas no piloto 2 quando comparado ao piloto 1 (machos). Além disso, um estudo realizado por Kjeldesen e colaboradores (2013), demonstra que o Malathion, assim como outros OPs modulam as atividades de receptores de estrogênio, sendo o Malathion responsável por antagonizar a atividade do receptor de androgênio, levando as fêmeas a apresentar sintomas e distúrbios metabólicos que podem ser diferentes dos apresentados pelos machos. Em nosso estudo, as fêmeas por exemplo, apresentaram maiores valores de AST-TGO quando comparado com os machos na mesma dose, piloto 1 machos M-140 ($50,77 \pm 19,9$ U/L) e piloto 2 fêmeas M-140 ($334,4 \pm 29,2$ U/L). A explicação para isso é conhecida a longo tempo, Murphy e DuBois (1957) relataram que ratos machos conseguem se desintoxicar quatro à cinco vezes mais rápido do que as fêmeas quando expostos ao Malathion, assim, os efeitos do agrotóxico sobre as fêmeas perduram por mais tempo. Esse efeito também pode ser observado nas concentrações de ALT-TGP que foram elevadas nas fêmeas deste mesmo grupo (Fig. 2E), mas não nos machos (Fig. 1G) quando comparamos os animais.

Durante a execução do piloto 2, a partir do décimo dia, observamos o aparecimento gradativo da síndrome colinérgica¹⁸ nas fêmeas do grupo M-140. Após uma hora da administração do agrotóxico, fica evidente a fraqueza muscular e atividade secretória excessiva nos animais, efeito esse que desaparece após 3-4 horas da exposição, mas novamente se manifesta frente a um novo contato com o agrotóxico.

É sabido que após exposição oral o Malathion sofre biotransformação primariamente no fígado e, em menor proporção no intestino, onde é rapidamente convertido, por várias enzimas incluindo o citocromo P450 (ativador), em malaoxon um composto 60 vezes mais tóxico que o próprio Malathion (Buratti & Testai, 2005). O metabolito bioativo do malaoxon, gerado pela dessulfuração, catalisada pelo citromo P450, covalentemente modificam e inibem várias enzimas serina hidrolase como as

¹⁸ Síndrome Colinérgica observada após aproximadamente 1 hora da administração do Malathion, a partir do décimo dia de exposição. Efeito que desaparece após 3-4 horas, mas se manifesta após nova aplicação. Link do vídeo: <https://youtu.be/xyGhOkEBfvg>

butirilcolinesterases, acetilcolinesterases e carboxilesterases (Casida & Quistad, 2004). Este efeito foi por nós quantificado no piloto 1 (Fig. 1F) e no piloto 2 (Fig. 2D), e estes resultados do piloto 2 levaram-nos a excluir a dose de 70 mg do estudo, por apresentar efeitos que eram similares ao do grupo 14 como os observados na deposição de massa adiposa (Fig. 2H) e no efeito tóxico, como nas concentrações de ALT-TGP (Fig. 2E). Os ensaios a partir daí foram definidos para serem executados com as doses de 14 e 140 mg/Kg de m.c, ainda, uma dose ultra baixa [0,1 mg/Kg de m.c] foi eleita a compor o estudo, e embora tenha sido testada em um segundo momento durante a pesquisa, será discutida em conjunto com as demais doses estudadas.

Na intenção de testar nossa hipótese do Malathion como um fator de risco para o DMG, dois novos grupos de animais foram submetidos aos ensaios que se seguiram. A pré-exposição por um período que antecedeu a gestação ocorreu por 21+5 dias para o grupo Controle (óleo de milho 1 mL/Kg de m.c), M-14 (14 mg/Kg de m.c), M-140 (140 mg/Kg de m.c) e M-0,1 (0,1 mg/Kg de m.c) que foram avaliados após a exposição (fêmeas Nulíparas), durante a gestação (14° e 20° DG) e no pós-termo (60° DPT). Em todos os momentos avaliados não foi possível observar quaisquer alterações no ganho de massa corporal destes animais, exceto pela maior massa no grupo M-0,1 ao término da gestação (Fig. 17E) e no pós-termo (Fig. 17F). Flehi-Slim e colaboradores (2015) utilizaram doses de Malathion (1,3, 13,7 e 137 mg/Kg de m.c), concentrações dentro das faixas utilizadas em nosso estudo e mesmo expondo os animais por 30 dias (ratos machos), não observaram alterações no ganho de massa corporal, contudo ressalta-se que o efeito da exposição entre machos e fêmeas é distinto.

De vários estudos que fornecem informações sobre o peso corporal após administração oral de Malathion, apenas dois estudos em ratos reportaram efeitos de redução significativa: Ojha e colaboradores (1992) relataram uma diminuição de 17% no peso final em relação aos controles em ratos (dose utilizada 593 mg/kg m.c / 7dias); Prabhakaran e colaboradores (1993) relataram uma diminuição de 22% no ganho de massa corporal durante a gravidez em ratos (dose de 500 mg/Kg de m.c) administrados nos dias 6, 10 e 14 de gestação. Em ambos os casos os efeitos foram relacionados às altas doses aplicadas, sem explicação mecanística do efeito, somente alusões foram feitas devido à baixa palatabilidade do Malathion, uma vez que as exposições foram realizadas através da ração dos animais.

O aumento de massa corpórea observada nas ratas prenhes do grupo M-0,1 bem como no pós-termo pode resultar em parte da maior deposição de gordura corporal e da maior massa apresentada pelos fetos (Fig. 22A e 22F). A maior massa corporal nos fetos pode ser resultante de maior insulinemia materna, incorrendo em um efeito anabólico para os fetos, já que estas ratas apresentaram uma elevada insulinemia em resposta à sobrecarga de glicose no GTT (Fig. 19E). Embora os grupos M-14 e M-140 também desenvolveram maior adiposidade na gestação e no pós-termo, os fetos oriundos destas ratas não apresentaram alterações de massa corpórea (Fig. 11A e 11G). Já o aumento da adiposidade (gorduras omental, gonadal e retroperitoneal), observado na gestação e no pós-termo, independente do grau de exposição ao Malathion (Fig. 2H, 2I, 17H e 17I) pode ser explicado em partes pela ação de hormônios placentários (lactogênio placentário, progesterona, prolactina e hormônio de crescimento placentário) ou ainda uma possível resistência à insulina, em acordo com o que observamos nos grupos M-14 e M-140 (Fig. 5E). Brelje e colaboradores (1993) demonstraram em seu trabalho a contribuição que o lactogênio placentário, a prolactina e o hormônio de crescimento placentário têm ao promover a estimulação da secreção de insulina e a proliferação de células β em ilhotas de rato durante a gestação, o que denota a importância destes hormônios e a sua contribuição para o quadro gestacional, contudo a exposição ao OPs parece interferir nestes estímulos sobre as ilhotas.

Slotkin e colaboradores (2009) submeteram ratos recém-nascidos a baixas doses de Paration, um agrotóxico pertencente à mesma classe do Malathion, e quando adultos estes animais apresentavam obesidade quando comparados aos seus controles, contudo os animais estavam em uso de dieta hipercalórica, o que configura uma observação interessante, pois aponta que o estilo de vida pode influenciar de forma associativa aos efeitos dos agrotóxicos. A massa corpórea das proles (machos e fêmeas), oriundas dos nossos grupos experimentais, foi avaliada e não observamos distinções no desenvolvimento destes animais até os 90 dias de idades (dados não apresentados graficamente).

É fato que a ação do Malathion e outros OP não se restringe a apenas inibir a ChE. Os aumentos das concentrações de acetilcolina podem mediar outras funções para além da exacerbação da sinalização na fenda sináptica, como a redução da liberação de incretinas, por meio da interação com receptores muscarínicos, que são importantes agentes na regulação da homeostase glicêmica (Rathish *et. al.*, 2016). Segundo os

autores, a presença constante do neurotransmissor atuando sobre as células enteroendócrinas que sintetizam e secretam o GLP-1 (*Glucagon Like Peptide-1*) resultaria em superestimulação de receptores muscarínicos e, num segundo momento, promoveria uma regulação negativa sobre a expressão dos receptores de GLP-1 (down-regulation dos receptores). Isso reduziria a liberação de incretinas.

As incretinas como o GLP-1 aparecem reduzidas em pacientes diagnosticados com DM (Anini *et. al.*, 2002), este efeito tem grande relevância uma vez que a GLP-1 apresenta varias ações regulatórias como: potencialização da secreção de insulina estimulada pela glicose; atenuação da secreção de glucagon; desaceleramento do esvaziamento gástrico; redução do consumo alimentar; efeito trópico sobre as células β ; aumento da sensibilidade à insulina (Drucker, 2003; Holst *et.al.*, 2011). A secreção de GLP-1 ocorre em duas etapas: i) fase secretora precoce, mediado por receptores muscarínicos nas células-L do íleo e cólon, que é dependente de GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) secretado pelas células-K do duodeno em resposta ao carboidrato e age indiretamente via nervo vago aferente e eferente para estimular a secreção de GLP-1 das células-L utilizando transmissão colinérgica (Rathish *et. al.*, 2016); ii) fase secretora tardia, diretamente estimulada pela presença de carboidratos no íleo distal e cólon, levando a células-L a secretar GLP-1 (Anini *et. al.*, 2002).

Muitos dos efeitos anabólicos observados nestes estudos são atribuídos aos níveis de insulina circulante. Rahimi & Abdollahi (2007) em sua revisão concluíram que a exposição aos OP pode induzir resistência à insulina por diferentes mecanismos (Rahimi & Abdollahi, 2007). Um destes mecanismos é trazido por Pournourmohammadi e colaboradores (2005), onde estudaram os efeitos do Malathion na secreção de insulina em ratos expostos por 4 semanas a doses de 100, 200 e 400 ppm/Kg de m.c, e demonstraram que este agrotóxico causa hiperinsulinemia e influencia a glicogenólise e glicólise muscular, o que pode explicar o potencial diabético do Malathion, segundo os autores. Em nosso trabalho avaliamos a concentração de insulina plasmática em jejum e durante o pico glicêmico do teste GTT, teste realizado de forma oral nas progenitoras em virtude da gestação, e observamos alterações importantes durante o estado gravídico. Os grupos M-14 e M-140 não responderam com uma secreção de insulina adequada frente à sobrecarga oral de glicose. Os valores secretados de insulina se mantiveram, nos mesmos patamares dos

valores basais (jejum), enquanto o grupo Controle (sem exposição) respondeu de forma esperada à sobrecarga glicídica (Fig. 5E e 5H).

A redução na secreção de incretinas é uma das hipóteses, vinculadas a exposição aos OPs, que tentam explicar o efeito hiperglicêmico causado por estes agentes. Outros estudos têm apontado a microbiota intestinal como um possível componente envolvido no desbalanço metabólico causado pelos OPs, pois esta possui extensas capacidades de metabolismo xenobiótico (Claus *et. al.*, 2016) e pode estar envolvido no metabolismo de pesticidas em fêmeas. Um estudo recente demonstrou que a microbiota intestinal está envolvida no metabolismo de OPs, no estudo camundongos *BALB/c* foram expostos por 180 dias ao Monocrotofós (28 µg/Kg de m.c), e os resultados apontaram que este OP induziu a gliconeogênese hepática e consequente intolerância à glicose (Velmurugan *et. al.*, 2017), o que ressalta uma possível contribuição da disbiose intestinal no quadro diabetogênico que se estabelece nos animais frente à exposição à OPs.

Em nosso trabalho observamos que a glicemia em jejum e a tolerância à glicose durante a gestação se manteve inalterada por efeito do Malathion nas fêmeas nulíparas, independente da dose em que foram expostas. Entretanto, na gestação e as demandas metabólicas que esta fase da vida exige revelaram o comprometimento que a exposição ao Malathion induz na homeostase glicêmica. Durante a gestação, as fêmeas M-14 e M-140 apresentaram diferentes graus de intolerância à glicose, que foi dose dependente, quando comparados entre si e com o grupo Controle. O grupo M-140 apresentou um fenótipo compatível com DMG em mulheres, que segundo os critérios de diagnóstico é confirmada quando a glicemia 1 hora após sobrecarga de glicose é ≥ 180 mg/dL. A intolerância que apareceu pela primeira vez na gestação foi mantida no pós-termo, e mesmo uma dose ultra baixa, como a do grupo M-0,1, revelou uma intolerância a glicose no pós-termo. Saldana e colaboradores (2007) estudaram a relação entre exposição a pesticida e desenvolvimento de DMG em 52.395 agricultores em Iowa e Carolina do Norte (EUA), e descobriram que a exposição ao Malathion durante o primeiro trimestre foi significativamente associada ao diabetes gestacional.

É pertinente ressaltar que em nenhum outro momento, além da pré-exposição, os animais de nosso experimento entraram em contato com o agrotóxico, no entanto sabemos que picos das doses de exposição foram atingidos em diferentes tecidos durante o primeiro e segundo trimestre de gestação, conforme apontou Garcia-Repetto e colaboradores em seu estudo (1995).

A secreção de insulina foi menor no grupo M-140 durante o GTT na gestação, mas não no pós-termo, o que explica a consistente intolerância à glicose apresentada por esses animais na gestação. Já os animais M-0,1 apresentaram uma resposta secretória de insulina, em resposta à sobrecarga de glicose, maior do que os animais controles durante a gestação, mas que não se sustentou no período pós-termo. Nos casos em que essa intolerância à glicose se mostrou presente a despeito da inalteração da secreção de insulina (praticamente em todos os momentos pós-termo) é possível que tal fato esteja relacionado à secreção de glucagon (Vosough-Ghanbari *et. al.*, 2007). O mesmo racional da menor expressão de receptor muscarínico em resposta a superestimulação da acetilcolina poderia ser aplicado também sobre as células β , que são reguladas positivamente pelo sistema colinérgico (Duttaroy *et. al.*, 2004). Contudo, não observamos nenhum prejuízo da tolerância à glicose em resposta a ingestão deste açúcar, nas ratas nulíparas, que revelasse uma deficiência mais direta sobre a resposta secretória de insulina mediada por menor tônus colinérgico. Em um estudo com ratos *Wistar* machos, durante 28 dias e uma dose de 56 mg/Kg de m.c de Diazinon, Ivanović e coautores (2016) mostraram que a exposição a OP resultou no acúmulo de ACh. Esta superestimulação poderia resultar em infra-regulação dos receptores muscarínicos nas células β , mas é um fato não demonstrado.

A estimulação prolongada pela acetilcolina pode reduzir a sensibilidade das células β à glicose (Duttaroy *et. al.*, 2004) o que justificaria a menor secreção de insulina no M-140. O fato intrigante é que estes eventos ocorrem de forma tardia e não imediatamente ao término dos tratamentos com o Malathion, o que poderia implicar numa bioacumulação que venha a ter um papel importante no longo prazo. Também vale mencionar que não avaliamos nenhum parâmetro metabólico ou funcional de maneira tempo-dependente ao longo dos 21 dias de tratamento que poderia revelar uma eventual superestimulação colinérgica, embora tenhamos evidências de síndrome colinérgica nas ratas do grupo M-140. Mesmo que tenha ocorrido a superestimulação colinérgica sobre as células β , especulamos que não teria sido suficiente para induzir quadros de hipoglicemia dado que a contribuição colinérgica estaria mais restrita aos períodos prandiais (alimentados), além do fato dos ratos apresentarem mecanismos contraregulatórios eficientes (secreção de glucagon e adrenalina).

A inibição da ChE é um dos mecanismos mais conhecidos dos agentes OPs. Na avaliação da atividade da ChE frente a exposição ao Malathion em doses ultra baixas

(M-0,1), constatamos que a atividade desta enzima não é alterada. Contudo, a atividade da enzima em [14 e 140 mg/Kg de m.c] é dose-dependente e com perfis distintos na gestação e no pós-termo. Durante a gestação a redução na atividade da enzima ChE desaparece, já no pós-termo animais controle ou aqueles expostos a uma dose mais baixa (M-14) aumentam os níveis de ChE quando comparados com animais sob maior exposição (M-140). Os resultados sugerem que esse efeito seja uma ação rebote pós-gestação que fica mascarado durante a gravidez.

Evidências trazidas por Garcia-Repetto e colaboradores (1995) demonstram que metabólitos ativos permanecem por vários dias mesmo após uma única dose de exposição. Assim, devido à cronicidade do nosso estudo, especulamos que metabólitos ativos poderiam permanecer até o pós-termo revelando algum efeito inibitório da enzima. No estudo supracitado, Garcia-Repetto e colaboradores (1995), administraram uma dose única dada por gavagem (Malathion [467 mg/kg de m.c]), em ratos *Wistar* machos, e avaliaram a distribuição do pesticida 4, 8, 12, 16, 20 e 30 dias após a exposição em vários tecidos. O Malathion foi detectado no sangue apenas no 4º dia (3,58 µg/g). No tecido adiposo o pico de concentração foi maior no 4º dia (2,63 µg/g) e depois diminuiu até o 12º dia. A concentração no músculo foi de 4,24 µg/g no 4º dia e diminuiu até o 16º dia. No fígado, as concentrações de Malathion aumentaram até o 16º dia (1,13 µg/g) e diminuiu no 20º dia. A concentração no cérebro atingiu o pico no 16º dia (0,88 µg/g) e perdurou por mais de 20 dias.

Em nosso estudo avaliamos também possíveis danos e alterações ocasionados há tecidos como o pancreático, hepático e sanguíneo. No pâncreas, nós avaliamos quantitativamente a massa de células β na gestação e no pós-termo, e somente no grupo Controle é possível observar que na gestação a massa de ilhotas estava aumentada quando comparado ao grupo Controle no pós-termo (Fig. 2K). Ohara-Imaizumi e colegas (2013) ressaltam em seu estudo, que em preparação para as demandas metabólicas da gravidez, as células β nas ilhotas pancreáticas maternas aumentam tanto em número quanto em função (secreção de insulina). A gestação impõe demandas exclusivas sobre o metabolismo materno, à medida que a gravidez progride e as necessidades nutricionais do feto aumentam, o aumento dos níveis de hormônios placentários reduz a sensibilidade materna à insulina, mantendo assim o gradiente materno-fetal de glicose e o fluxo de nutrientes para o feto (Buchanan & Xiang, 2005). As gestantes equilibram o aumento resultante na demanda de insulina com mudanças

estruturais e funcionais nas ilhotas que geram secreção de insulina aumentada e hiperdinâmica, em consequência disso o número de células β aumenta, o limiar de glicose diminui e a secreção de insulina estimulada por glicose aumenta (Green & Taylor, 1978; Sorenson & Brelje, 1997; Rieck & Kaestner, 2010). Se o corpo da mãe falhar em alcançar esse equilíbrio da demanda de insulina com produção de insulina, têm-se as condições para o desenvolvimento do DMG (Buchanan & Xiang, 2005). O Malathion causa alterações degenerativas irregulares nas ilhotas pancreáticas, demonstrado através da combinação de descobertas *in vivo* e *in vitro* sugerindo que o Malathion induz uma resistência à insulina associada à hiperglicemia, devido uma menor função mitocondrial das ilhotas (Pournourmohammadi *et. al.*, 2007). As ilhotas isoladas de animais pré-tratados com Malathion 200 e 400 ppm/Kg de m.c por 4 semanas, foram menos responsivas à glicose e continham alterações degenerativas nas ilhotas pancreáticas pela interrupção da função mitocondrial das ilhotas (Pournourmohammadi *et. al.*, 2007).

Vale ressaltar que a ausência de diferença na massa de células β entre o período gestacional e o pós-termo para as ratas dos grupos M-14 e M-140 (não avaliamos nas M-0,1) estaria contribuindo em partes para uma menor disponibilidade de células β que pode estar associado a uma menor capacidade de expansão da massa de células β e conseqüentemente menor adaptação à demanda imposta pelo período gestacional. Outro ponto importante a ser citado é que o Malathion (25,0125 e 625 $\mu\text{g/mL}$) causa aumento no conteúdo de glucagon, secretado *in vitro*, conforme visto no trabalho de Vosough-Ghanbari e colaboradores (2007).

Os efeitos do pesticida na morfologia hepática também foram investigados. Nosso estudo apontou que o tratamento com Malathion, independente de observado mais imediatamente ou tardiamente, altera a morfologia hepática levando a dilatação do sinusoide e aumento proeminente da veia central. Selmi e colaboradores (2018) utilizaram uma dose de exposição [200 mg/Kg p.c], administrada por gavagem intragástrica de Malathion por 30 dias em camundongos machos, e relataram alterações na morfologia hepática com destaque para o aumento do sinusoide, infiltração de células mononucleares, dilatação da veia central, hemorragia e necrose de hepatócitos. Flehi-Slim e colegas (2015) expuseram ratos machos *Wistar* por 30 dias a diferentes doses [13,7 e 137 mg/Kg p.c.] de Malathion, e relataram que na administração de 13,7 foi observado alterações no parênquima hepático onde destacou-se a congestão

centrolobular (veia central) e sinusoidal. No parênquima hepático de ratos tratadas com 137 mg foram detectadas congestões centrolobulares e sinusoidais mais elevadas, presença de vários hepatócitos anucleados, focos necróticos e a presença de vacuolizações, efeitos lesivos causados pela toxicidade deste OP.

As alterações hepáticas são comumente seguidas de distúrbios hematológicos. Lasram e colaboradores (2014 (1)) demonstraram que em ratos *Wistar* machos tratados com Malathion [200 mg/kg de m.c., via oral] durante 28 dias, provocou elevação significativa nos níveis de marcadores séricos de lesão hepática (AST-TGO e ALT-TGP) e aumento do número de leucócitos, monócitos, linfócitos e neutrófilos no sangue circulante. Estas mesmas alterações foram por nós reportadas. As concentrações das diversas linhagens de WBC estavam significativamente elevadas de forma dose-dependentes após a exposição (núlparas), bem como mantiveram-se elevadas na gestação e no pós-termo (quantidade de linfócitos), dados apresentados na Tabela 1. Tais alterações ocasionadas pela exposição ao Malathion são creditadas devido às lesões hepáticas causadas e pela ativação de células adjacentes não parenquimatosas (células de Kupffer e células estreladas) resultando na produção de citocinas no fígado (Luster *et. al.*, 2000; Nain *et. al.*, 2011). O aumento da proliferação de células imunitárias como leucócitos, monócitos, granulócitos, neutrófilos e linfócitos, é atribuído ao aumento da expressão de citocinas como as interleucinas (IL-1, IL-6) no fígado de ratos expostos ao Malathion (Luster *et. al.*, 2000; Lasram, 2014 (2)). O aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL-10) foi observado em ratos tratados com o OP Diazinon (Hariri *et. al.*, 2010), Fenthion (Yurumez *et. al.*, 2007) e Malathion (Ayud *et. al.*, 2003). Num estudo utilizando OP Sarin, Chapman e colaboradores (2006) relataram que o aumento nas concentrações de citocinas foi observado em um subgrupo de ratos 30 dias após a exposição de 108 µg/Kg de m.c, administrado em dose única por via intramuscular, indicando que a inflamação pode persistir por maior tempo após a exposição inicial.

As lesões hepáticas aumentam a permeabilidade da membrana e proteínas são liberadas para a circulação, e assim, estas podem servir de marcadores. A AST-TGO é encontrada em uma variedade de tecidos, incluindo fígado, cérebro, pâncreas, coração, rins, pulmões e músculos esqueléticos, sendo um indicador de injúria global, em contraste, a ALT-TGP é encontrada principalmente no fígado. Uma dose única de Malathion [500 mg/kg m.c.] em ratos já é suficiente para aumentar a concentração de

AST-TGO e ALT-TGP plasmáticos (Enan, 1983). Uma dose de 137,5 mg/kg durante 32 dias em ratos, aumentou significativamente as concentrações de transaminases (Husain *et. al.*, 1987). As mesmas alterações foram reportadas por Lasram e colegas (2014 (1)) em seu trabalho quando ratos foram expostos [200 mg/Kg m.c.] durante 28 dias. Nossos dados vão ao encontro com estes achados. Quando avaliamos a atividade destas proteínas plasmáticas, após a exposição M-140 (dose próxima dos estudos reportados) constatamos um significativo aumento quando comparados com o Controle (Fig. 8G e 8J), sendo o efeito persistente durante a gestação (Fig. 8H e 8K) e no pós-termo (Fig. 8I e 8L). Na exposição em menor dose (M-14) e dose ultrabaixa (M-0,1) somente AST-TGO foi maior na circulação quando comparados com o grupo Controle. Entretanto, este aumento não superou aos do grupo M-140, revelando ser um efeito dose-dependente. Na gestação, as concentrações de AST-TGO e ALT-TGP no grupo M-14, foram equivalentes às concentrações ao grupo Controle, contudo no pós-termo a concentração das duas enzimas foram maiores num contexto dependente de dose de exposição ao agrotóxico. Vale destacar que enquanto a elevação de AST-TGO indica uma injúria mais global (incluindo o fígado), a elevação da ALT-TGP indica uma resposta mais local/hepática.

A metabolização pós-exposição ao Malathion envolve vários tecidos. Em seu trabalho Saleh e colaboradores (1997) administraram uma única dose [2,5 mg/Kg m.c.] de Malathion marcado no carbono 14 (metoxi-¹⁴C-malathion) por via intravenosa em ratos Sprague-Dawley machos. Neste trabalho, o animal foi totalmente congelado em gelo seco num banho de hexano após 30 minutos da administração do Malathion e foi posteriormente submetido à autorradiografia. O percentual da radioatividade nas seções sagitais foi encontrado no fígado (38%), intestino delgado (21%), rim (19%), pulmão (11%) e trato urinário (7%). Estes dados demonstraram especificadamente as rotas do agrotóxico pelo corpo do animal. Muitos estudos por nós já citados avaliam a função e lesão hepática, e por esta razão seria pertinente inquirir sobre eventuais alterações da função renal, entretanto, nenhum dos estudos de longo prazo relatou lesões renais significativas em ratos que receberam Malathion em doses de até 622 mg/kg/dia (NCI, 1978). Nossos estudos avaliaram a função renal através da concentração de creatinina e ureia plasmática e os dados vão ao encontro do exposto.

A exposição ao Malathion aumenta os níveis séricos de colesterol total e triglicerídeos, em valores para além dos esperados na gestação (Prabhakaran & Devi,

1993). Nossos estudos também apontaram essa hipertrigliceridemia gestacional, que foi significativa e independente da dose de exposição (M-0,1, M-14 e M-140). Durante a gestação ocorre aumento dos níveis lipídicos, incluindo níveis de triglicérides e colesterol total à medida que a idade gestacional avança (Catov *et. al.*, 2007, Motta *et al.*, 2018). Estes lipídios são absorvidos pela placenta, metabolizados e transportados para o feto o que denota a importância deste mecanismo para o desenvolvimento do feto. Contudo a elevação das concentrações de colesterol e triglicérides maternos, em concentrações acima do normal para este período, está associada ao nascimento prematuro (Catov *et. al.*, 2007), o que representa um risco para a saúde dos progenitores. É difícil afirmar se esse aumento no triacilglicerol nas gestantes que receberam o tratamento com o Malathion se deve a maior síntese hepática ou a menor depuração da circulação, ou ambos os eventos, tema que merece estudos futuros.

O fígado é o principal local de síntese do colesterol e é dependente de acetil-CoA, fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia para esse processo, tendo a enzima HMG-CoA redutase como limitante da taxa na síntese do colesterol (Kenis *et. al.*, 2005). A oxidação de ácidos graxos livres, como a que ocorre frente à exposição ao Malathion, leva à formação de acetil-CoA e citrato oferecendo um maior aporte destas moléculas, utilizadas na síntese de colesterol (Lasram *et. al.*, 2014 (1); Lasram *et. al.*, 2009).

As concentrações plasmáticas de colesterol e fração LDL foram maiores nas ratas expostas ao Malathion nas doses de 14 e 140 mg (Fig. 7J). Na gestação o colesterol fração VLDL apresentou o mesmo padrão de elevação indiferente da dose de exposição (Fig. 7N). Segundo Catov e colegas (2007), os triglicérides, colesterol total e frações, não são medidos durante a gravidez na prática obstétrica atual, assim, não há faixas de referência definidas para os parâmetros lipídicos durante a gravidez normal, o que em grande parte acontece devido à falta de uma boa base de evidências sobre o significado dos níveis elevados destes parâmetros. No entanto, os parâmetros lipídicos, incluindo colesterol total, LDL, VLDL e triglicérides, mostraram-se elevados na gestação mesmo para animais controles.

Bartels & O'Donoghue (2011), ressaltam que durante a gestação, a progesterona contribui para o aumento das concentrações de LDL, e, por sua vez, o colesterol LDL circulante é o principal substrato para a síntese de progesterona placentária. O aumento na concentração de estrodiol na gravidez provoca um aumento no colesterol total, no

colesterol LDL e nos triglicerídeos bem como em maior atividade da lipase hepática (Brizzi *et al.*, 1999). O metabolismo do VLDL é alterado devido à diminuição da atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo e aumento da atividade na placenta (Butte, 2000). Todos esses desfechos gerais do metabolismo lipídico alterados na gestação levam ao acúmulo de reservas de gordura materna no primeiro semestre e a mobilização de gordura aumentada na segunda metade da gravidez (Husain *et al.*, 2008), logo as concentrações de colesterol materno durante a gravidez estão associadas ao aumento dos riscos de pré-eclâmpsia, parto prematuro e diabetes gestacional (Savvidou *et al.*, 2010).

Todos os desfechos analisados parecem impactar direta ou indiretamente a primeira geração. A avaliação dos fetos oriundos de ratas expostas demonstrou que frente a qualquer dose de exposição observamos uma correlação maior entre a massa dos animais e a glicose sanguínea. A avaliação da prole adulta apontou que todos os descendentes, sejam machos ou fêmeas, independente da dose em que suas progenitoras se expuseram periconcepcionalmente ao Malathion, apresentaram maiores valores glicêmicos aos 2 meses de idade e/ou intolerância a glicose aos 3 meses de idade. Machin & McBride (1989) por meio de um estudo com coelhos (tratados com 126 mg de malathion entre os dias 28 e 30 da gestação) revelaram que a transferência de Malathion e/ou metabólitos para os fetos se dá pela placenta. Evidências em animais também apontam que Malathion e/ou metabólitos podem ser transferidos por meio do leite materno para a prole (Chhabra *et al.*, 1993). Um relatório da National Academy of Sciences (NRC, 1993) afirmou que as tolerâncias a níveis de pesticidas nos alimentos podem não proteger adequadamente os fetos e as crianças, e alerta sobre possíveis alterações que podem ocorrer de forma epigenética. Bombardi (2017) em seu trabalho ressalta ainda a divergência entre níveis aceitáveis entre diferentes países como o Brasil e países da União Européia, onde os limites aceitáveis para os resíduos de Malathion no feijão podem chegar até 400 vezes, e questiona os impactos que isso representa tanto no consumo direto quanto no produto beneficiado (Bombardi, 2017).

As interações gene-ambiente, avaliadas pelo perfil epigenômico da prole, revelou importantes alterações de metilação global (LINE1) com a manutenção das metilações pela supressão da desmetilases. Os pesticidas podem afetar a metilação do DNA por meio de vários processos celulares, incluindo estresse oxidativo, geração de espécies reativas de oxigênio (Fratelli *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008), mudanças na

atividade da DNA metiltransferase (Shepherd *et al.*, 2006) e imunotoxicidade (Daniel *et al.*, 2001; Galloway & Handy, 2003). Em estudos experimentais (animais) e em humanos, vários OPs mostraram induzir estresse oxidativo (Mena *et al.*, 2009; Soltaninejad & Abdollahi, 2009; Alp *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2010). A metilação do DNA reflete o estresse oxidativo cumulativo, e recentemente foi demonstrado que a produção de EROs altera a expressão de genes pertencentes à maquinaria de metilação do DNA. Em nosso estudo observamos que a metilação por DNMT3A foi aumentada, enquanto DNMT3B foi diminuído, sugerindo que os pesticidas podem perturbar a metilação do DNA através da expressão alterada do maquinário de metilação do DNA. Alguns pesticidas têm efeitos imunotóxicos (Veraldi *et al.*, 2006) e estão associados a níveis elevados de citocinas (Phillips, 2000). Foi relatado que níveis elevados de citocinas no plasma foram associados à hipermetilação de genes supressores de tumor em linfócitos periféricos (Daniel *et al.*, 2001). Esses fatores podem afetar de forma independente ou coordenada a metilação do DNA.

A intolerância à glicose nas proles se deu a despeito da massa das células β estarem normais ou até mesmo elevadas (machos M-0,1). A constatação de que as proles M-0,1 não possuem qualquer sinal de resistência periférica a insulina (os dados de ipITT costumam considerar mais o peso do tecido muscular esquelético), nos faz crer que a intolerância tenha mais a ver com alguma disfunção hepática sobre a regulação da gliconeogênese, do que por eventual falha secretória de insulina. Neste sentido, a menor abundância hepática de mRNA para a FOXO-1 pode indicar alguma contribuição deste fator de transcrição para esse processo (Fig. 26D), tema que merece maiores investigações. O que está claro é que a maquinaria hepática de metilação e desmetilação encontra-se modificada por efeito da exposição materna ao pesticida, implicando, ao menos em parte, em uma via epigenética de influência sobre os desfechos da prole adulta.

O grande desafio nos estudo envolvendo agrotóxicos é que não existem populações que estejam livres da exposição (direta ou indireta) destes agentes. E até mesmo os animais utilizados em nosso estudo se enquadram neste contexto. Um estudo realizado por Mesnage e colegas (2015) demonstrou que até mesmo as dietas formuladas para animais de laboratório não estão livres de agrotóxicos, em seu estudo a ração Nuvilab-CR1, ração esta utilizada por nossos animais, apresentou resíduos de agrotóxicos (Pirimifós, Glifosato, Clorpirifós e metais pesados). Entretanto, ressalta-se

que todos os animais tiveram acesso a mesma dieta, e os efeitos observados em nosso estudo, nos animais expostos ao agrotóxico, é creditada ao Malathion uma vez que aqueles que não tiveram contato com esse OP não apresentaram um quadro diabetogênico ou de perturbação metabólica como os demais.

7. Considerações:

Diante da extensão desse estudo (duração prolongada dos desenhos experimentais, bem como pela elevada quantidade de grupos experimentais) não conseguimos responder a algumas questões centrais como, por exemplo, afimar por qual mecanismo precisamente ocorreu a intolerância à glicose nos diversos momentos e grupos estudados. Outro ponto importante de ser mencionado é que durante a execução do nosso trabalho não avaliamos a atividade da paraoxonase (enzima importante no processo de inativação dos OPs), nem quantificamos a biodisponibilidade de malaaxon (um metabólito ativo do Malathion). Ainda, cabe ressaltar que abordamos o composto isolado e não com um coquetel contendo diversos agrotóxicos, o que dificulta a extrapolação dos dados para eventuais eventos como a contaminação indireta (pela ingestão de alimentos com traços de agrotóxicos) e que não pode ser transportado diretamente para humanos.

8. Conclusão:

Em resumo, demonstramos que a exposição controlada ao Malathion em três doses, que procuram mimetizar da exposição mais silenciosa (indireta) a exposição mais direta (laboral/acidental), quando ocorridas num período periconcepcional, predispõe as ratas à intolerância à glicose compatível com o DMG em mulheres. Ressaltamos aqui o efeito causado pela dose ultra baixa que embora não seja capaz de reduzir a atividade da colinesterase, efeito clássico dos OPs, causa importantes alterações metabólicas, por meio de eventos em partes epigenéticos, predispondo a prole adulta a menor tolerância à glicose, compatível com prédiabetes. Assim, concluímos que a exposição subcrônica ao OP Malathion, de forma isolada, independente da dosagem, é fator de risco para o DMG com impactos também sobre a homeostase glicêmica na prole adulta. Tais achados devem servir de alerta para os setores agrícolas, de zoonoses e industriais, e da saúde, que atuam, respectivamente, no manejo dos pesticidas e na atenção à saúde humana.

9. Referências:

- ADA, American Diabetes Association. (2019). Prevention or delay of diabetes: *Standards of Medical Care in Diabetes—2021*. **Diabetes Care**. 42(Suppl. 1):S29–S33.
- AEBI, H. (1974) Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. Methods of enzymatic analysis. **Chemie, Weinheim**: FRG, 673–677.
- AERTS, L., & VAN ASSCHE, F. A. (1977). Rat foetal endocrine pancreas in experimental diabetes. **Journal of Endocrinology**, 73(2), 339–NP.
- AERTS, L., & VAN ASSCHE, F. A. (2006). Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 38(5-6), 894–903.
- AERTS, L., HOLEMANS, K., & VAN ASSCHE, F. A. (1989). Maternal diabetes during pregnancy: Consequence for the offspring. **Diab. Metab. Rev.**, 6, 147–167.
- AFSHAR, S.; FARSHID, A.A.; HEIDARI, R.; ILKHANIPOUR, M. (2008). Histopathological changes in the liver and kidney tissues of Wistar albino rat exposed to fenitrothion, **Toxicol. Ind. Health** 24:581–586.
- AKYILDIZ BN, KONDOLOT M, KURTOG˘LU S, AKIN L. (2009). Organophosphate intoxication presenting as diabetic keto-acidosis. **Ann Trop Paediatr**. 29:155–8.
- ALBUQUERQUE E.X., PEREIRA E.F.R., ARACAVALA Y., FAWCETT W.P., OLIVEIRA M., RANDALL W.R., HAMILTON T.A., KAN R.K., ROMANO J.A., ADLER M. (2006). Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proc Natl Acad Sci USA** 103:13220–13225.
- ALBUQUERQUE EX, DESHPANDE SS, KAWABUCHI M, ARACAVALA Y, IDRIS M, RICKETT DL, AND BOYNE AF. (1985). Multiple actions of anticholinesterase agents on chemosensitive synapses: molecular basis for prophylaxis and treatment of organophosphate poisoning. **Fundam Appl Toxicol** 5:S182–S203.
- ALP, H., AYTEKIN, I., HATIPOGLU, N.K., ALP, A., OGUN, M. (2012). Effects of sulforophane and curcumin on oxidative stress created by acute Malathion toxicity in rats. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci**. 16 (3), 144–148.
- ALUIGI, MG; ANGELINI, C; FALUGI, C. (2005). Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during Development. **Chem Biol Interact**, 157-158:305-316.
- ANDERSEN H, POULSEN PL, MOGENSEN CE, JAKOBSEN J. (1996). Isokinetic muscle strength in long-term IDDM patients in relation to diabetic complications. **Diabetes**; 45:440–445.
- ANDERSEN, H., STÅLBERG, E., GJERSTAD, M. D., & JAKOBSEN, J. (1998). Association of muscle strength and electrophysiological measures of reinnervation in diabetic neuropathy. **Muscle & Nerve**, 21(12), 1647–1654.
- ANINI Y, HANSOTIA T, BRUBAKER PL. (2002). Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: In vivo and in vitro studies in rats. **Endocrinology**. 143:2420–6.
- ARAUJO, E. (2016). Impacto dos agrotóxicos na alimentação, saúde e meio ambiente. Disponível em: <http://www.mobilizadores.org.br/wp-content/uploads/2016/08/Cartilha-Agrototoxicos-final.pdf>, acesso em 08 de Janeiro de 2019.
- AYUD, S., VERMA, J., DAS, N. (2003). Effect of endosulfan and Malathion on lipid peroxidation, nitrite and TNF- release by rat peritoneal macrophages. **Int. Immunopharmacol**. 3, 1819–1828.
- BAKER D, EVANS M, CRYER P, SHERWIN R. (1997). Hypoglycaemia and glucose sensing. **Diabetologia**. Oct;40 Suppl 3:B83-8.
- BALIGAR, P. N.; KALIWAL, B. B. (2001). Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. **Ind. Health**, 39:235-243.
- BARTELS, Ä., & O'DONOGHUE, K. (2011). Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. **Obstetric medicine**, 4(4), 147–151.
- BASIRI, S., ESMAILY, H., VOSOUGH-GHANBARI, S., MOHAMMADIRAD, A., YASA, N., ABDOL- LAHI, M. (2007). Improvement by Satureja khuzestanica essential oil of Malathion-

- induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxylase activities. **Pestic. Biochem. Physiol.** Vol. 89:124–129.
- BERKOWITZ, G. S., LAPINSKI, R. H., WEIN, R., & LEE, D. (1992). Race/Ethnicity and Other Risk Factors for Gestational Diabetes. **American Journal of Epidemiology**, 135(9), 965–973.
- BOCHNER, R. (2015). Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (Sinitox) e as Intoxicações Humanas por Agrotóxicos no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro.
- BOMBARDI, L. M. (2017). Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia / São Paulo: **FFLCH – USP**, 296 pags.
- BOMSER JA, CASIDA JE. (2001). Diethylphosphorylation of rat cardiac M2 muscarinic receptor by chlorpyrifos oxon in vitro. **Toxicol Lett** 119:21–26 .
- BOUCHARD M, GOSSELIN NH, BRUNET RC, SAMUEL O, DUMOULIN MJ, CARRIER G. (2003). A toxicokinetic model of Malathion and its metabolites as a tool to assess human exposure and risk through measurements of urinary biomarkers. **Toxicol Sci**, 73(1):182–94.
- BOVERHOF D.R., CHAMBERLAIN M.P., ELCOMBE C.R., GONZALEZ F.J., HEFLICH R.H., HERNÁNDEZ L.G., JACOBS A.C., JACOBSON-KRAM D., LUIJTEN M., MAGGI A. (2011). Transgenic animal models in toxicology: historical perspectives and future outlook. **Toxicol Sci** 121:207–233.
- BRASIL. (1989). Ministério da Agricultura. **Lei n. 7.802/89** art. 6º, parágrafo 3º, 12 jun. D.O.U., Brasília, p. 11.459-11.460. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em 14 de fevereiro de 2021.
- BRASIL. (2002). Decreto nº 4.074 de 04 jan. 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 jan. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em 10 de fevereiro de 2021.
- BRASIL. (2005). Decreto nº 5.630, de 22 de dezembro. Dispõe sobre a redução a zero das alíquotas da Contribuição para o PIS/PASEP e da COFINS. **Diário Oficial da União**, 23 dez. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2005/Decreto/D5630.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%205.630%2C%20DE%2022%20DE%20DEZEMBRO%20DE%202005.&text=Disp%C3%B5e%20sobre%20a%20redu%C3%A7%C3%A3o%20a%20que%20trata%20o%20art. Acesso em 03 de fevereiro de 2021.
- BRASIL. (2014). MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Anuário estatístico da agroenergia. Brasília: **MAPA/ACS**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/anuario-estatistico-da-agroenergia/anuario-estatistico-da-agroenergia-2014.pdf>. Acesso em 05 de fevereiro de 2021.
- BRASIL. (2016). Decreto nº 8.950, de 29 de dezembro. Aprova a Tabela de Incidência do Imposto sobre Produtos Industrializados - TIPI. **Diário Oficial da União**, 29 dez. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2015-2018/2016/Decreto/D8950.htm#art7. Acesso em 03 de fevereiro de 2021.
- BRASIL. (2019). Alterações das classificações toxicológicas dos produtos formulados, agrotóxicos e afins. Ato nº 58, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: **MAPA/ACS**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-58-de-27-de-agosto-de-2019-213474289>. Acesso em 27 de janeiro de 2021.
- BRASIL. (2021). MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Informações Técnicas: Insumos Agrícolas (Agrotóxicos). Brasília: **MAPA**, Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/PLANILHA_2021_DESBLOQUEADA_NoenviaraoMAPA.xlsx. Acesso em 18 de fevereiro de 2021.
- BRELJE TC, SCHARP DW, LACY PE, OGREN L, TALAMANTES F, ROBERTSON M. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. **Endocrinology**. 132: 879–887.
- BRIZZI P, TONOLO G, ESPOSITO F. (1999). Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**; 181:430–4.

- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. 414:813-820.
- BUCHANAN TA, XIANG AH (2005) Gestational diabetes mellitus. **J Clin Invest** 115(3): 485–491.
- BUCKLEY NA, EDDLESTON M, LI Y, BEVAN M, ROBERTSON J. (2011). Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Issue 2. Art. No.: CD005085.
- BUEGE, J. A., AUST, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol** 52:302-10.
- BUENO A., SINZATO Y. K., SUDANO M. J. (2014). “Short and long-term repercussions of the experimental diabetes in embryo-fetal development,” **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**. Oct;30(7):575-81.
- BURATTI FM, TESTAI E. (2005). Malathion detoxification by human hepatic carboxylesterases and its inhibition by isoMalathion and other pesticides. **J Biochem Mol Toxicol**, 19(6):406–14.
- BUTTE F. (2000). Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr**; 71:1256(s)–61.
- CALLESEN, N. F., RINGHOLM, L., STAGE, E., DAMM, P., & MATHIESEN, E. R. (2012). Insulin Requirements in Type 1 Diabetic Pregnancy: Do twin pregnant women require twice as much insulin as singleton pregnant women? **Diabetes Care**, 35(6), 1246–1248.
- CAPT A, LUZY AP, ESDAILE D, BLANCK O. (2007). Comparison of the human skin grafted onto nude mouse model with in vivo and in vitro models in the prediction of percutaneous penetration of three lipophilic pesticides. **Regul Toxicol Pharmacol**, 47(3):274–87.
- CASIDA JE, QUISTAD GB. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chem Res Toxicol**. 17:983–98.
- CATOV J, BODNAR L, KIP K. (2007). Early pregnancy lipid concentrations and spontaneous preterm birth. **Am J Obstet Gynecol**; 197:610.e1–e7.
- CHAPMAN, S., KADAR, T., GILAT, E. (2006). Seizure duration following sarin exposure affects neuroinflammatory markers in the rat brain. **Neurotoxicology** 27, 277–283.
- CHEMINOVA. (2021). Malathion 1000 EC Cheminova FMC (bulário). Disponível em: <https://www.fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Malathion%201000%20EC.pdf>. Acesso em 24 de fevereiro de 2021.
- CHEN L, MAGLIANO DJ, ZIMMET PZ. (2011). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. **Nat Rev Endocrinol**; 8(4): 228–236.
- CHHABRA SK, HASHIM S, ROA AR. (1993). Modulation of hepatic glutathione system of enzymes in suckling mouse pups exposed transplacentally to Malathion. **J Appl Toxicol**. 13(6):411-416.
- CLAUS, S. P., GUILLOU, H., & ELLERO-SIMATOS, S. (2016). The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? **Npj Biofilms and Microbiomes**, 2(1).
- COSTA, LG. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. **Clin Chim Acta**, 366(1-2):1-13.
- CYPRYK, K.; ATARZYNA, S.; WIESŁAW, C.; LESZEK, S.; MALGORZATA, L. (2008). Gestational diabetes mellitus - An analysis of risk factors. **Endokrynologia Polska**. 59. 393-7.
- DAMASCENO, D.C.; SINZATO, Y.K.; BUENO, A.; NETTO, A.O.; DALLAQUA, B.; GALLEGO, F.Q.; IESSI, I.L.; CORVINO, S. B.; SERRANO, R.G.; MARINI, G.; PICULO, F.; CALDERON, I.M.P.; RUDGE, M.V.C. (2013). Mild Diabetes Models and Their Maternal-Fetal Repercussions. **Journal of Diabetes Research**. Article ID-473575, pg 9 - 21.
- DANIEL, V., HUBER, W., BAUER, K., SUESAL, C., MYTILINEOS, J., MELK, A., CONRADT, C., OPELZ, G. (2001). Association of elevated blood levels of pentachlorophenol (PCP) with cellular and humoral immunodeficiencies. **Arch Environ Health**. 56(1):77–83.
- DESOYE, G., MOUZON., SH. (2007). The human placenta in gestational diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**. 30: 120-126.

- DEFRONZO RA. (2009). Banting lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**. 58(4):773-95.
- DELGADO, E. H. B. (2006). Disfunção respiratória mitocondrial e estresse oxidativo após exposição crônica ao Malathion. **Dissertação** - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.
- DESHPANDE S.S.; VIANA G.B., KAUFFMAN F.C., RICKETT D.L., ALBUQUERQUE E.X. (1986). Effectiveness of physostigmine as a pretreatment drug for protection of rats from organophosphate poisoning. **Fundam Appl Toxicol** 6:566–577.
- DESPAIN K.E., MCDONOUGH J.H., MCMONAGLE J.D., MCGINLEY M.J., EVANS J. (2007). The toxicity of soman in the African Green monkey (*Chlorocebus aethiops*). **Toxicol Mech Methods** 17:255–264.
- DRUCKER, D. J. (2003). Enhancing Incretin Action for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, 26(10), 2929–2940.
- DRURY MI. (1979). Pregnancy in the clinical diabetic. A personal experience of 739 cases. **Ir J Med Sci**. Suppl 2:75-9.
- DUTTARROY A, ZIMLIKI CL, GAUTAM D, CUI Y, MEARS D, WESS J. (2004). Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. **Diabetes** 53:1714–20.
- ELERŠEK, T.; FILIPIČ, M. (2011). Pesticides – The Impacts of Pesticides Exposure. **IntechOpen**. Chapter (12):243-260.
- ENAN EE. (1983). Comparative biochemical effects of three aliphatic organophosphorus insecticides on white rats. **Int Pest Control** 25:42-44.
- FAO (2019). Fao Specifications And Evaluations For Agricultural Pesticides. MALATHION S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate. Disponível: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Malathion_2013.pdf, acesso 12 janeiro.
- FARIA, N. M. X. (2007). Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Revista Ciência & Saúde Coletiva – Agrotóxicos Saúde e Ambiente**. São Paulo, 2: 25-37.
- FAWCETT W.P., ARACAVALA Y., ADLER M., PEREIRA E.F.R., ALBUQUERQUE E.X. (2009). Acute toxicity of organophosphorus compounds in guinea pigs is sex- and age-dependent and cannot be solely accounted for by acetylcholinesterase inhibition. **J Pharmacol Exp Ther** 328:516–524.
- FLEHI-SLIM, I., CHARGUI, I., BOUGHATTAS, S. (2015). Malathion-induced hepatotoxicity in male Wistar rats: biochemical and histopathological studies. **Environ Sci Pollut Res**. 22: 17828.
- FOSS MC, PACCOLA GM, DE SOUZA NV, IAZIGI N. (1989). Type 2 diabetic patients in a population sample from Ribeirão Preto area (São Paulo). **AMB Rev Assoc Med Bras**. Oct-Dec;35(5):179-83.
- FRANCO, J.L.; POSSER, T.; MATTOS, J.J. (2009). Zinc reverses Malathion-induced impairment in antioxidant defenses, **Toxicol. Lett**. 187:137–143.
- FRANKO, K. L., FORHEAD, A. J., FOWDEN, A. L. (2010). Differential effects of prenatal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats, **J. Endocrinol**. 204 (3) 319–329.
- FRASER RB, WAITE SL, WOOD K, MARTIN KL. (2007). Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: *in vitro* experiments using a mouse model. **Hum Reprod**. 22: 3059–3068.
- FRATELLI, M., GOODWIN, L. O., OROM, U. A., LOMBARDI, S., TONELLI, R., MENGOZZI, M., GHEZZI, P. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. **Proc Natl Acad Sci** 102(39):13998–14003.
- FRYE, C. A.; CALAMANDREI, G. ; CALZA, L.; DESSI-FULGHERI, F.; FERNANDEZ, M. (2011). Endocrine Disrupters: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. **Journal of Neuroendocrinology**. 24: 144–159.

- GALLOWAY, T., HANDY, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**. 12(1-4):345–363.
- GARCIA-REPETTO R, MARTINEZ D, REPETTO M. (1995). Malathion and dichlorvos toxicokinetics after the oral administration of Malathion and trichlorfon. **Vet Hum Toxicol**, 37(4):306–9.
- GOKALP, O.; BUYUKVANLI, B.; CICEK, E. (2005) The effects of diazinon on pancreatic damage and ameliorating role of vitamin E and vitamin C, *Pesticide Biochem. Physiol.* 81:123–128.
- GREEN IC, TAYLOR KW (1972) Effects of pregnancy in the rat on the size and insulin secretory response of the islets of Langerhans. **J Endocrinol** 54(2):317–325.
- GUNNELL D, EDDLESTON M, PHILLIPS MR, AND KONRADSEN F. (2007) The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. **BMC Public Health** 7:357.
- GUPTA, A. (2006). Pesticide residue in food commodities. **Agrobios** (India).
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.N.C. (1999). Mechanism of damage of cellular targets by oxidative stress: lipid peroxidation. **Oxford University Press**, Oxford, pp. 284–313.
- HANDY, R.D.; ABD-EL, H.A.; SAMEI, M.F.F. (2002). Bayomy, Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse, **Toxicology** 172:13–34.
- HARIRI, A.T., MOALLEM, S.A., MAHMOUDI, M., MEMAR, B., HOSSEINZADEH, H. (2010). Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. **Food Chem. Toxicol.** 48 (10), 2803–2808.
- HAZRA, D. K., PURKAIT, A. (2019). Role of pesticide formulations for sustainable crop protection and environment management: a review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry** 8:689-693.
- HOLST JJ, KNOP FK, VILSBØLL T, KRARUP T, MADSBAD S. (2011). Loss of incretin effect is a specific, important, and early characteristic of type 2 diabetes. **Diabetes Care** 34(Suppl 2):S251–7.
- HUSAIN F, LATIF S, UDDIN M, NESSA A. (2008). Lipid profile changes in second trimester of pregnancy. **Mymensingh Med J**; 17:17–21.
- HUSAIN K, ANSARI RA, GUPTA PK. (1987). Effect of sub-chronic exposure of Malathion on blood and tissue enzyme activities in female rats. **J Environ Biol** 8(2):137-142.
- IDF - International Diabetes Federation. (2015). IDF Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**.
- IVANOVIĆ S.R., DIMITRIJEVIĆ B., ČUPIĆ V., JEZDIMIROVIĆ M., BOROZAN S., SAVIĆ M., SAVIĆ D. (2016). Downregulation of nicotinic and muscarinic receptor function in rats after subchronic exposure to diazinon. **Toxicol. Rep.** 3:523–530.
- JAIN, H. K. (2010). Green revolution: history, impact, and the future. **Houston: Studium Press**. 1° Ed., pag. 278.
- JARRETT, R. J. (1993). Gestational diabetes: a non-entity? **BMJ**, 306(6869), 37–38.
- JETT DA, NAVOA RV, BECKLES RA, MCLEMORE GL. (2001). Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. **Toxicol Appl Pharmacol.** 174(2):89–98.
- JOSEPHY, P.D., MANNERVIK, B. (2006). Molecular Toxicology. Second Edition By. **Oxford University Press**, New York.
- KALENDER, S., UZUN, F.G., DURAK, D., DEMIR, F., KALENDER, Y. (2010). Malathion induced hepatotoxicity in rats: the effects of vitamins C and E. **Food Chem. Toxicol.** 48, 633–638.
- KALENDER, S.; OGUTCU, A.; UZUNHISARCIKLI, M. (2005). Diazinon induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes, **J. Toxicol.** 197–206.
- KAMEL F, HOPPIN JA. (2004). Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environ Health Perspect.** Vol. 112: 950–58.

- KANAKA-GANTENBEIN, C. (2010). Fetal origins of adult diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1205(1), 99–105.
- KATO, M., NATARAJAN R. (2014). Diabetic nephropathy—emerging epigenetic mechanisms. **Nature reviews Nephrology** 10:517–530.
- KAWABUCHI M., BOYNE A.F., DESHPANDE S.S., ALBUQUERQUE E.X. (1989). The reversible carbamate, (-)physostigmine, reduces the size of synaptic end plate lesions induced by sarin, an irreversible organophosphate. **Toxicol Appl Pharmacol** 97:98–106.
- KENIS, I., TARTAKOVER-MATALON, S., CHEREPNIN, N., DRUCKER, L., FISHMAN, A., POMERANZ, M., LISHNER, M. (2005). Simvastatin has deleterious effects on human first trimester placental explants. **Hum Reprod** 20 (10) : 2866–72.
- KIRWAN, J. P., HAUGUEL-DE MOUZON, S., LEPERCQ, J., CHALLIER, J.-C., HUSTON-PRESLEY, L., FRIEDMAN, J. E., CATALANO, P. M. (2002). TNF- Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. **Diabetes**, 51(7), 2207–2213.
- KJELSDEN, L. S., GHISARI, M., BONEFELD-JORGENSEN, E. C. (2013). Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 272: (2) 453-464.
- KNAAK JB, DARY CC, POWER F, THOMPSON CB, BLANCATO JN. (2004). Physicochemical and biological data for the development of predictive organophosphorus pesticide QSARs and PBPK/PD models for human risk assessment. **Crit Rev Toxicol**, 34(2):143–207.
- KUMAR KJ, NAYAK N. (2011). Organophosphorus poisoning presenting as diabetic ketoacidosis. **Indian Pediatr**. 48:74.
- LASRAM, M. M. (2014 (1)). Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to Malathion in rats. **Environ Toxicol Pharmacol**. Sep;38(2):542-53.
- LASRAM, M. M. (2014 (2)). Changes in glucose metabolism and reversion of genes expression in the liver of insulin-resistant rats exposed to Malathion. The protective effects of N-acetylcysteine. **Life Sci**. 107(1-2):50-8.
- LASRAM, M.M., ANNABI, A.B., ELJ, N., SELMI, S., KAMOUN, A., EL-FAZAA, S., GHARBI, N. (2009). Metabolic disorders of acute exposure to Malathion in adult Wistar rats. **J. Hazard. Mater**. 163, 1052–1055.
- LASSITER TL & BRIMIJOIN S. (2008). Rats gain excess weight after developmental exposure to the organophosphorothionate pesticide, chlorpyrifos. **Neurotoxicol Teratol**. 30(2):125-30.
- LASSITER, T.L., RYDE, I.T., MACKILLOP, E.A., BROWN, K.K., LEVIN, E.D., SEIDLER, F.J., SLOTKIN, T.A. (2008). Exposure of neonatal rats to parathion elicits sex-selective reprogramming of metabolism and alters the response to a high-fat diet in adulthood. **Environ. Health Perspect**. 116, 1456–1462.
- LEDDA, C.; FIORE, M.; SANTARELLI, L.; BRACCI, M.; MASCALI, G.; GRAZIAD'AGATI, M.; BUSÀ, A.; FERRANTE, M.; RAPISARDA, V. (2013). Gestational Hypertension and Organophosphorus Pesticide Exposure: A Cross-Sectional Study. **Bio Med Research International**. Volume 15, Article ID 280891, 5 pag.
- LEE K.N., PELLON S.T., OLIVER E., CHIRWA S. (2014). Characterization of the guinea pig animal model and subsequent comparison of the behavioral effects of selective dopaminergic drugs and methamphetamine. **Synapse** 68:221–233.
- LING C, GROOP L. (2009). Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. **Diabetes** 58:2718–2725.
- LONDRES, F. (2011). Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: **AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**, 190 pgs.
- LUSTER, M. I., SIMEONOVA, P. P., GALLUCCI, R. M., MATHESON, J. M., & YUCESAY, B. (2000). Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity. **International Journal of Immunopharmacology**, 22(12), 1143–1147.

- MACHERA K, GOUMENOU M, KAPETANAKIS E, KALAMARAKIS A, GLASS CR. (2003). Determination of potential dermal and inhalation operator exposure to Malathion in greenhouses with the whole body dosimetry method. **Ann Occup Hyg**, 47(1):61–70.
- MACHIN MGA, MCBRIDE WG. (1989). Placental transfer of Malathion in the rabbit. **Med Sci Res**. 17:743-744.
- MARTIN LJ, DOEBLER JA, SHIH TM, ANTHONY A. (1985). Protective effect of diazepam pretreatment on soman-induced brain lesion formation. **Brain Res** 325:287–289.
- MASTROCOLA, R., REFFO, P., PENNA, F., TOMASINELLI, C. E., BOCCUZZI, G., BACCINO, F. M., COSTELLI, P. (2008). Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: Role of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 44(4), 584–593.
- MAXWELL D.M., BRECHT K.M., KOPLOVITZ I., SWEENEY R.E. (2006). Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? **Arch Toxicol** 80:756–760.
- MELLER D., FRASER I., KRYGER M. (1981). Hyperglycemia in anticholinesterase poisoning. **Canadian Med. J.** 124: 745–748.
- MENA, S., ORTEGA, A., ESTRELA, J. M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutat Res**. 674(1-2):36–44.
- MESNAGE R, DEFARGE N, ROCQUE L-M, SPIROUX DE VENDÔMOIS J, SÉRALINI G-E. (2015). Laboratory Rodent Diets Contain Toxic Levels of Environmental Contaminants: Implications for Regulatory Tests. **PLoS ONE** 10(7): e0128429.
- METZGER BE, GABBE SG, PERSSON B, BUCHANAN TA, CATALANO PA. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**. 33(3):676-82.
- METZGER BE, LOWE LP, DYER AR, TRIMBLE ER, CHAOVARINDR U. (2008). Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med**. 358(19):1991-2002.
- MIHAJLIK, P. REHAK, J. VESEL 'A, 'S. 'CIKO '~S, V. BARAN, AND J. KOPPEL, "Preimplantation embryo development in ICR mice after streptozotocin treatment," **Physiological Research**, vol. 47, no. 1, pp. 67–72, 1998.
- MOELLER HC, RIDER JA. (1962). Plasma and red blood cell cholinesterase activity as indications of the threshold of incipient toxicity of ethyl-p-nitrophenyl thionobenzenephosphonate (EPN) and Malathion in human beings. **Toxicol Appl Pharmacol**, 4(1):123–30.
- MONTGOMERY MP, KAMEL F, SALDANA TM, ALAVANJA MCR, SANDLER DP. (2008). Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993–2003. **Am J Epidemiol**. 167:1235-46.
- MOORE PD, YEDJOU CG, TCHOUNWOU PB. (2010). Malathion induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. **Environ Toxicol**, 25(3):221–6.
- MORGAN MK, SHELDON LS, CROGHAN CW, JONES PA, ROBERTSON GL, CHUANG JC. (2005). Exposures of preschool children to chlorpyrifos and its degradation product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in their everyday environments. **J Exposure Anal Environ Epidemiol**. 15:297–309.
- MOTTA K., GOMES P. R. L., SULIS P. M., BORDIN S., RAFACHO A. (2018). Dexamethasone Administration During Late Gestation Has No Major Impact on Lipid Metabolism, but Reduces Newborn Survival Rate in Wistar Rats. **Front. Physiol**. 9:783.
- MURPHY, S. D. AND K. P. DUBOIS. (1957). Quantitative measurement of inhibition of the enzymatic detoxication of Malathion by EPN (ethyl p-nitrophenyl thionobenzenephosphonate). **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med**. 96:813-818.
- NAIN S, BOUR A, CHALMERS C, SMITS JE. (2011). Immunotoxicity and disease resistance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) exposed to Malathion. **Ecotoxicology**, 20(4):892–900.
- NCBI (2019). Malathion. Compound summary for CID 4004. PubChem Compound Database. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information. Disponível: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4004>, acesso 10 de janeiro.

- NCI - National Cancer Institute. (1978). Bioassay of Malathion for possible carcinogenicity. Carcinogenesis. **Technical Report Series**. No. 24, 118 pgs.
- NEGRATO CA; MONTENEGRO JRM. (2016). Diabetes *mellitus* e gestação. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 716-29.
- NERSESIAN, W., BOOTH, H., HOXIE, D., HINCKLEY, W., SHEHATA, T. (1985) Illness in office attributed to xylene. **Occup Health Saf** 54(4):88.
- NEWBOLD RR. (2007). Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. **Hormones (Athens)**. 9: 206–217.
- NRC - National Research Council. (1993). Pesticides in the diets of infants and children. **National Research Council**. Washington, DC: National Academy Press.
- OHARA-IMAIZUMI, M., KIM, H., YOSHIDA, M., FUJIWARA, T., AOYAGI, K., TOYOFUKU, Y., NAGAMATSU, S. (2013). Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic cells during pregnancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(48), 19420–19425.
- OJHA S, NORTON SP, SHRIVASTAVA N, ET AL. (1992). Toxic effect of Malathion on the reproductive system of albino rats. **Environ Ecol**. 10(4):833-836.
- PANAHI, P., VOSOUGH-GHANBARI, S., POURNOURMOHAMMADI, S., OSTAD, S.N., NIKFAR, S., MINAIE, B., ABDOLLAHI, M. (2006). Stimulatory effects of Malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in langerhans islets, glutamate dehydro- genase and glucokinase. **Toxicol. Mech. Methods**. 16, 161–167.
- PELAEZ, V. M.; SILVA, L. R. da; GUIMARÃES, T. A.; DAL RI, F.; TEODOROVICZ, T. (2015). A (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Inovação**, 14 : 153-178.
- PERES, F., MOREIRA, JC. (2003). É veneno ou é remédio?: **Agrotóxicos, saúde e ambiente** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 384 p. ISBN 85-7541-031-8.
- PHILLIPS, T. M. (2000). Assessing environmental exposure in children: immunotoxicology screening. **J Expo Anal Environ Epidemiol**. 10(6 Pt 2):769–775.
- POURNOURMOHAMMADI, S., OSTAD, S. N., AZIZI, E., GHAREMANI, M. H., FARZAMI, B., MINAIE, B., ABDOLLAHI, M. (2007). Induction of insulin resistance by Malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 88(3), 346–352.
- POURNOURMOHAMMADI, S.; FARZAMI, B.; OSTAD, S.N.; AZIZI, E.; ABDOLLAHI, M. (2005). Effects of Malathion subchronic exposure on rat skeletal muscle glucose metabolism. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 19, p. 191-196.
- PRABHAKARAN S, SHAMEEM F, DEVI KS. (1993). Influence of protein deficiency on hexachlorocyclohexane and Malathion toxicity in pregnant rats. **Vet Hum Toxicol** 35(5):429-433.
- PRABHAKARAN, S., & DEVI, K.S. (1993). Impact of protein deficiency and exposure to hexachlorocyclohexane or Malathion on lipid metabolism in pregnant rats. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, 30 4, 234-8.
- RAAFAT, N. (2012). Organophosphorus insecticide, monocrotophos, possesses the propensity to induce insulin resistance in rats on chronic exposure. **Clin Biochem**, 45:1591-5.
- RAFACHO, A. (2008). Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **Pancreas**; 36:284-293.
- RAFACHO, A. (2010). The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiol (Oxf)**.;200(3):223-35.
- RAHIMI, R. ABDOLLAHI, M. (2007). A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides, **Pesticide Biochem. Physiol**. 88:115–121.
- RAMU A, SLONIM AE, LONDON M. (1973). Hyperglycemia in acute Malathion poisoning. **Isr J Med Sci** 9(5):631-634.

- RAO PV. (2015). Type 2 diabetes in children: clinical aspects and risk factors. **J Endocrinol Metab.** 19(Suppl 1):S47-50.
- RATHISH, D., AGAMPODI, S. B., JAYASUMANA, M. A. C. S., & SIRIBADDANA, S. H. (2016). From organophosphate poisoning to diabetes mellitus: The incretin effect. **Medical Hypotheses**, 91, 53–55.
- RAUH V.A., PERERA F.P., HORTON M.K., WHYATT R.M., BANSAL R., HAO X., LIU J., BARR D.B., SLOTKIN T.A., PETERSON B.S. (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. **Proc Natl Acad Sci USA** 109:7871–7876.
- RETNAKARAN R, QI Y, CONNELLY P, SERMER M, HANLEY A, ZINMAN B. (2010). The graded relationship between glucose tolerance status in pregnancy and postpartum levels of low-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in young women: implications for future cardiovascular risk. **J Clin Endocrinol Metab**; 95:4345–53.
- RIECK S, KAESTNER KH (2010) Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. **Trends Endocrinol Metab** 21(3):151–158.
- ROBINS, J. C.; MARSIT, C. J.; PADBURY, J. F.; SHARMA, S. S. (2011). Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. **Front Biosci**, 3: 690–700.
- ROSAS L.G.; ESKENAZI B. (2008). Pesticides and child neurodevelopment. **Curr Opin Pediatr** 20:191–197.
- RUDGE, M. V. C., CALDERON, I. M. P., RAMOS, M. D., ABBADE, J. F., RUGOLO, L. M. S. (2000). Perinatal Outcome of Pregnancies Complicated by Diabetes and by Maternal Daily Hyperglycemia Not Related to Diabetes. **Gynecol Obstet Invest** 50:108-112.
- RUSYNIAK, D. E.; NAÑAGAS, K. A. (2004). Organophosphate poisoning. **Semin Neurol**, 24(2):197-204.
- SALDANA, T. M., BASSO, O., BAIRD, D. D., HOPPIN, J. A., WEINBERG, C. R., BLAIR, A. (2009). Pesticide exposure and hypertensive disorders during pregnancy. **Environ Health Perspect** 117:1393–1396.
- SALDANA, T.M., BASSO, O., HOPPIN, J.A., BAIRD, D.D., KNOTT, C., BLAIR, A., ALAVANJA, M.C., SANDLER, D.P. (2007). Pesticide exposure and self-reported gestational diabetes mellitus in the Agricultural Health Study. **Diabetes Care**. 30 (3), 529–534.
- SALEH MA, AHMED AE, KAMEL A. (1997). Determination of the distribution of Malathion in rats following various routes of administration by whole-body electronic autoradiography. **Toxicol Ind Health**. 13(6):751-758.
- SALVI, R. M. (2003). Neuropsychiatric evaluation in subjects chronically exposed to organophosphate pesticides. **Toxicol Sci**, 72:267–271.
- SAVVIDOU M, NELSON S, MAKOKA M, MESSOW C, SATTAR N, NICOLAIDES K. (2010). First-trimester prediction of gestational diabetes mellitus: examining the potential of combining maternal characteristics and laboratory measures. **Diabetes**; 59:3017–22.
- SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes (2020). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020. São Paulo: **AC Farmacêutica**.
- SCHUG, T.; JANESICK, A.; BLUMERG, B.; HEINDEL, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 127: 204 - 275.
- SHARARA, F. I.; SEIFER, D. B.; FLAWS, J. A. (1998). Environmental toxicants and female reproduction. **Fertility & Sterility**. 70: (4) 613 - 622.
- SELMI, S.; RTIBI, K.; GRAMI, D.; SEBAI, H.; MARZOUKI, L. (2018). Malathion, an organophosphate insecticide, provokes metabolic, histopathologic and molecular disorders in liver and kidney in prepubertal male mice. **Toxicology Reports**. 5:189–195.
- SELMI, S.; TOUNSI, H.; SAFRA, I.; ABDELLAOUI, A.; RJEIBI, M.R.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. (2015). Histopathological, biochemical and molecular changes of reproductive function after Malathion exposure of prepubertal male mice, **RSC Adv**. 5:137-143.

- SHEPHERD, K. R., LEE, E. S., SCHMUED, L., JIAO, Y., ALI, S. F., ORIAKU, E. T., LAMANGO, N. S., SOLIMAN, K. F., CHARLTON, C. G. (2006). The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** 83(3):349–359.
- SILVEIRA CL, ELDEFRAWI AT, ELDEFRAWI ME. (1990). Putative M2 muscarinic receptors of rat heart have high affinity for organophosphorus anticholinesterases. **Toxicol Appl Pharmacol** 103:474–481.
- SIVAM S.P., HOSKINS B., HO I.K. (1984). An assessment of comparative acute toxicity of diisopropyl-fluorophosphate, tabun, sarin, and soman in relation to cholinergic and GABAergic enzyme activities in rats. **Fundam Appl Toxicol** 4:531–538.
- SKYLER JS, BAKRIS GL, BONIFACIO E. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes.** 7;66:241–255.
- SLOTKIN TA, LEVIN ED, SEIDLER FJ. (2009). Developmental Neurotoxicity of Parathion: Progressive Effects on Serotonergic Systems in Adolescence and Adulthood. **Neurotoxicol Teratol.** 31(1):11–7. doi: 10.1016/j.ntt.2008.08.004.
- SLOTKIN, T. A. (2011). Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity?. **Reproductive Toxicology.** 31 297–301.
- SOLTANINEJAD, K., ABDOLLAHI, M. (2009). Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. **Med Sci Monit.** 15(3):75–90.
- SOMM, E; SCHWITZGEBEL, V. M; VAUTHAY, D. M; AUBERT, M. L; HÜPPI, P.S. (2009). Prenatal nicotine exposure and the programming of metabolic and cardiovascular disorders. **Molecular and Cellular Endocrinology.** 304: 69-77.
- SORENSEN RL, BRELJE TC (1997) Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: Betacell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. **Horm Metab Res** 29(6):301–307.
- SPADOTTO, C. A. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).
- SPRUIT H.E., LANGENBERG J.P., TRAP H.C., VAN DER WIEL H.J., HELMICH R.B., HELDEN H.P., BENSCHOP H.P. (2000). Intravenous and inhalation toxicokinetics of sarin stereoisomers in atropinized guinea pigs. **Toxicol Appl Pharmacol** 169:249–254.
- SUNGUR, M., & GÜVEN, M. (2001). Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. **Critical Care**, 5(4), 211.
- SWAMINATHA, K. (2013). Pesticides and human diabetes: a link worth exploring? **Diabetic Medicine.** 30, pag. 1268 - 1271.
- TIAN, F. Y., MARSIT, C. J. (2018). Environmentally Induced Epigenetic Plasticity in Development: Epigenetic Toxicity and Epigenetic Adaptation. **Curr Epidemiol Rep** 5:450–460.
- ÜNÜVAR, T.; BÜYÜKGEBİZ, A. (2012). Fetal and Neonatal Endocrine Disruptors. **J Clin Res Pediatr Endocrinol.** 4 (2):51-60.
- VALENTIM, E. B.; MARI, C.; BERNSTEIN, A. (2013). A desinformação sobre o uso de agrotóxicos – uma discussão multidisciplinar. **Educação Pública**, Cecierj, Rio de Janeiro.
- VALVI, D. (2012). Prenatal concentrations of polychlorinated biphenyls, DDE, and DDT and overweight in children: a prospective birth cohort study. **Environ Health Perspect.** Mar;120(3):451-7.
- VAN KOPPEN CJ, KAISER B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. **Pharmacol Ther**; 98:197-220.
- VELMURUGAN, G., RAMPRASATH, T., RAMASAMY, S. (2017). Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis. **Genome Biol**, 18(8), 1–18.

- VERALDI, A., COSTANTINI, A. S., BOLEJACK, V., MILIGI, L., VINEIS, P., VAN LOVEREN, H. (2006). Immunotoxic effects of chemicals: A matrix for occupational and environmental epidemiological studies. **Am J Ind Med.** 49(12):1046–1055.
- VOSOUGH-GHANBARI, S., SAYYAR, P., POURNOURMOHAMMADI, S., ALIAHMADI, A., OSTAD, S.N., ABDOLLAHI, M. (2007). Stimulation of insulin and glucagon synthesis in rat Langerhans islets by malathion in vitro: Evidence for mitochondrial interaction and involvement of subcellular non-cholinergic mechanisms. **Pestic Biochem Physiol** 89: 130–136.
- WYMAN A, PINTO AB, SHERIDAN R, MOLEY KH. (2008). One- cell zygote transfer from diabetic to nondiabetic mouse results in congenital malformations and growth retardation in offspring. **Endocrinology.** 149: 466–469.
- XIE W, STRIBLEY JA, CHATONNET A, WILDER PJ, RIZZINO A, MCCOMB RD, TAYLOR P, HINRICHS SH, LOCKRIDGE O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. **J Pharmacol Exp Ther** 293:896–902.
- YU, F., WANG, Z., JU, B., WANG, Y., WANG, J., BAI, D. (2008). Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. **Exp Toxicol Pathol.** 59(6):415–423.
- YU, Y. (2013). Maternal exposure to the mixture of organophosphorus pesticides induces reproductive dysfunction in the offspring. **Environ Toxicol.** Sep;28(9):507-15.
- YURUMEZ, Y., CEMEK, M., YAVUZ, Y., BIRDANE, Y., BUYUKOKUROGLU, M.E. (2007). Beneficial effect of N-acetylcysteine against organophosphate toxicity in mice. **Biol. Pharm. Bull.** 30, 490–494.
- ZIVOT U, CASTORENA JL, GARRIOTT JC. (1993). A case of fatal ingestion of Malathion. **Am J Forensic Med Pathol,** 14(1):51–3.

10. Anexos:

- i.* Certificado de aprovação CEUA
- ii.* Adendo protocolar I aprovado pela CEUA
- iii.* Adendo protocolar II aprovado pela CEUA

i. Certificado de aprovação CEUA;



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS METABÓLICOS NO PÓS-TERMO EM RATAS", protocolada sob o CEUA nº 5095181116 (ID 000329), sob a responsabilidade de **Alex Rafacho e equipe; Maciel Alencar Bruxel** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/12/2016.

We certify that the proposal "IMPACT OF EXPOSURE TO MALATHION ON GLYCEMIC HOMEOSTASE DURING GESTATION AND ITS METABOLIC DESTROYS IN THE POST-TERM IN RATS", utilizing 130 Heterogenics rats (34 males and 96 females), protocol number CEUA 5095181116 (ID 000329), under the responsibility of **Alex Rafacho and team; Maciel Alencar Bruxel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 12/06/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2017** a **12/2019**

Área: **Ciências Fisiológicas**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 meses**

N: **34**

Linhagem: **Rattus norvegicus albinus / wistar**

Peso: **250 a 350 g**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **60 a 75 dias**

N: **96**

Linhagem: **Rattus norvegicus albinus / wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas ? LIDoC, do Departamento de Ciências Fisiológicas (Centro de Ciências Biológicas ? CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina ? UFSC (Rua Roberto Sampaio Gonzaga s/n Trindade, Florianópolis ? SC).

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2021


Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Maurício Laterça Martins

Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ii. Adendo protocolar I aprovado pela CEUA;



Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 07 de abril de 2017
CEUA N5095181116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alex Rafacho
Área: Ciências Fisiológicas

Título da proposta: "IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS METABÓLICOS NO PÓS-TERMO EM RATAS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC (ID 000044)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 13/março/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Trata o presente da solicitação de 20 ratas adicionais para a realização de estudos pilotos. Tal solicitação vem a ser realizada após nos depararmos com o fornecimento de 2 marcas do pesticida alvo do estudo. Encontramos e conseguimos adquirir o produto (Malathion) das marcas: 1) Dipil e 2) Cheminova. No primeiro (Dipil) o pesticida está dissolvido em solventes orgânicos tornando a solução 50% e no segundo (Cheminova) conseguimos adquirir um produto 100% Malathion. Assim, faremos ensaios pilotos para testar: i) a eficiência e possível toxicidade de cada um deles com o intuito de utilizar o que cause menores danos hepáticos. Este piloto fará parte da publicação, ou seja, o incluiremos na ocasião da publicação do estudo, indo ao encontro do ARRIVE. Em nenhum dos casos a dose excederá o já aprovado por esta Comissão. Contando com vossa atenção. À disposição".

Comentário da CEUA: "RESULTADO DA REUNIÃO DA CEUA EM 07/04/2016_ADENDO APROVADO Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou pela Aprovação. - vide pareceres Atenciosamente, Secretaria CEUA PARECER01_APROVADO: Florianópolis, 06 de abril de 2017. Prezados(as) membros da CEUS-UFSC, A justificativa do requerente para inclusão de mais 20 ratas é clara e concisa: Utilizar os animais em um projeto piloto para avaliar eficiência e menor incidência de danos hepáticos das duas marcas, para então escolher qual delas utilizará na execução do projeto já aprovado. Sendo o que tenho para relato, manifesto-me a esta comissão como Favorável à aprovação do que foi solicitado. PARECER02_REPROVADO: Trata-se de solicitação de adendo a protocolo já aprovado para solicitação de mais 20 animais. Autor justifica solicitação pelo fato terem tido contato com 2 marcas diferentes do pesticida alvo do estudo. Uma dissolvida em solventes orgânicos tornando a solução 50% e outra 100% Malathion. Desta forma querem comparar a eficiência e possível toxicidade de cada um deles. Independente da concentração (50 vs 100%) de malathion espera-se que a toxicidade seja equivalente se for mantida dose final total (p.ex. para este projeto dose máxima de (140 mg/kg p.c.).".


Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Maurício Laterça Martins
Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

iii. Adendo protocolar II aprovado pela CEUA;



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Florianópolis, 08 de outubro de 2018
CEUA N 5095181116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alex Rafacho
Área: Ciências Fisiológicas

Título da proposta: "IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO MALATHION SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA DURANTE A GESTAÇÃO E SEUS DESFECHOS METABÓLICOS NO PÓS-TERMO EM RATAS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSC (ID 000430)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 20/setembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "De: Prof. Dr. Alex Rafacho Para: Prof. Dr. Aderbal Silva Aguiar Jr. Presidente da CEUA/UFSC ADENDO 2 PROTOCOLO 5095181116 Prezados Prof. Aderbal, Este documento se trata de um ADENDO que venho propor ao PROTOCOLO de PESQUISA acima referido. O protocolo encontra-se aprovado nesta Comissão com prazo de vencimento em 12/2019 e com o título Impacto da exposição ao malathion sobre a homeostase glicêmica durante a gestação e seus desfechos metabólicos no pós-termo em ratas. Venho solicitar 70 ratas e 25 ratos adicionais para a responder perguntas complementares ao estudo que surgiram ao longo do desenvolvimento do mesmo. Vimos nos deparando com resultados muito significativos em nosso estudo que demonstram o efeito diabetogênico do malathion de acordo com nossa hipótese original. Contudo, temos recebido inúmeras sugestões em diversos colegiados científicos no Brasil e no exterior recomendando que rodemos um lote experimental com o intuito de verificar se tais efeitos seriam preservados em doses muito mais inferiores, doses encontradas em estudos que buscam ação disruptora endócrina (de até mil vezes menores que as doses atuais utilizadas). A princípio utilizaremos uma dose de 140 µg/kg de massa corpórea, equivalente a 1/15.000 da DL50 do malathion para ratos. Seria algo mais ou menos equivalente (é difícil ter essa informação conclusivamente) às concentração de pesticidas encontrados nos alimentos. Estamos buscando elaborar um trabalho mais completo possível, e nosso alvo de publicação é a Environmental Health Perspectives, onde, inclusive, procuraremos incluir dados de humanos. Vale destacar que a dose supracitada está na ordem de 1.000 vezes mais diluída que a maior dose das duas já testadas no projeto em tela (140 mg/kg p.c.). **esta solicitação encontra-se em anexo. "

Comentário da CEUA: "RESULTADO DA REUNIÃO DA CEUA - APROVADO Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela Aprovação. - vide pareceres Atenciosamente, Divisão Administrativa - CEUA Parecer 1: APROVADO - O pesquisador solicita 70 ratas e 25 ratos adicionais para a responder perguntas complementares ao estudo, que surgiram ao longo do desenvolvimento do projeto, sendo que o mesmo já havia solicitado acréscimo de animais (20 ratas). Considerando que há expectativa de resultados mais significativo que se complementam e terão maior impacto científico, sou de parecer favorável, no entanto, sugiro ao pesquisador que se limite a esse número solicitado, uma vez que o prazo estimado para conclusão do projeto é dezembro de 2019. Parecer 2: APROVADO - O presente relato referente ao projeto CEUA N° 5095181116 (Impacto da exposição ao malathion sobre a homeostase glicêmica durante a gestação e seus desfechos metabólicos no pós-termo em ratas) trata de Emenda de solicitação de 70 ratas e 25 ratos adicionais para realização de novo lote de experimentos. Justificou-se a necessidade de averiguação do efeito diabetogênico do malathion em doses muito inferiores (140 microg/kg, equivalente a 1/15.000 da DL50 do malathion para ratos e 1.000 vezes mais diluída que a maior dose já utilizada no projeto-140 mg/kg), conforme inúmeras sugestões que foram feitas por diversos colegiados científicos no Brasil e no exterior. Ressaltou-se que buscam elaborar um trabalho mais completo possível, com alvo de publicação a Environmental Health Perspectives. O projeto tem término previsto para: 12/2019. Arquivos anexados: 1.) Adendo com justificativas 2.) Form20.09.2018 Diante do exposto, sou de parecer pela aprovação da emenda."

Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Maurício Laterça Martins

Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina