



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

José Rodrigo Nascimento Martins

**Efeitos agudos do inseticida Malathion sobre parâmetros ultraestruturais e
moleculares de células beta pancreáticas murina**

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho – CFS/CCB

Co-orientador: Prof. Dr. Vander Baptista

Florianópolis

2022

José Rodrigo Nascimento Martins

Efeitos agudos do inseticida Malathion sobre parâmetros ultraestruturais e moleculares de células beta pancreáticas murina

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Co-orientador: Prof. Dr. Vander Baptista

Florianópolis

2022

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

Martins, José Rodrigo Nascimento Martins
Efeitos agudos do inseticida Malathion sobre parâmetros
ultraestruturais e moleculares de células beta
pancreáticas murina / José Rodrigo Nascimento Martins
Martins ; orientador, Alex Rafacho, coorientador, Vander
Baptista, 2022.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Disruptores endócrinos. 3.
Citotoxicidade. 4. Homeostase glicêmica. 5. Pâncreas
endócrino. I. Rafacho, Alex. II. Baptista, Vander. III.
Baptista, Vander. IV. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. V.
Título.

José Rodrigo Nascimento Martins

Efeitos agudos do inseticida Malathion sobre parâmetros ultraestruturais e moleculares de células beta pancreáticas murina

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado em 07 de julho de 2022 por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Márcia Barbosa Águila Mandarim de Lacerda, Dra.

Instituição (Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes)

Prof. Jamil Assreuy Filho

Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Alex Rafacho

Orientador

Florianópolis, 2022

DEDICATÓRIA

Este trabalho e toda a jornada feita para realizá-lo dedico a todos aqueles sem os quais eu definitivamente não estaria onde estou hoje. Executar um projeto de mestrado é um processo oneroso e difícil para todos, mas executá-lo durante uma pandemia é uma luta diária contra todas as probabilidades possíveis.

Em primeiro lugar, dedico este trabalho e o meu mestrado aos meus pais, assim como tudo o que produzo durante a minha vida. Espero que isso consiga retribuir nem que seja 1% do sacrifício que fizeram durante a vida toda para cuidar de mim e das minhas irmãs.

Em segundo lugar agradeço novamente e dedico este trabalho às minhas irmãs, Wanessa e Andressa, vocês são minhas primeiras e eternas inspirações na vida. Saibam que muito do que sei hoje veio de vocês e da vontade de me espelhar em vocês. Vocês criaram grande parte de quem sou hoje.

Em terceiro lugar dedico este trabalho ao meu orientador, Alex, e aos meus colegas de laboratório que ajudaram enormemente nessa trajetória. Ao Alex, agradeço primeiramente por ter aceitado me orientar mesmo sem ter me conhecido direito. Por confiar a mim um trabalho bastante complexo e que nem sabíamos se seria possível executar na íntegra. Por todo o suporte e ajuda que me ofereceu além da universidade. Pelas oportunidades que ofertou. Por ter feito de tudo para que os experimentos desse trabalho acontecessem em um momento em que muitos não puderam adquirir a experiência e vivência em laboratório. E principalmente pela paciência e compreensão com os momentos em que estive em vulnerabilidade psicológica.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço primeiramente à Thaís por ter tornado a minha chegada em um ambiente completamente novo algo muito leve e divertido, enquanto muitos me recebem com pedras nas mãos. Sempre terei muitas memórias boas dentro e fora do laboratório com você. À Fran e ao Robsom agradeço demais por todos os momentos incríveis que tivemos no laboratório, e também fora dele, vocês me ajudaram muito não só no âmbito profissional mas também pessoal, e o mestrado em meio à pandemia sem vocês teria sido catastrófico. Vocês são amigos incríveis que, mesmo com a distância, quero carregar pra sempre comigo. Além disso, agradeço muito à Milena por ser uma irmã de orientador incrível, por compartilhar tanto conhecimento e experiência comigo, e por ajudar a tornar toda a rotina de atividades no laboratório muito mais positiva. Você me entregou uma notinha que guardei até hoje, e que dizia “eu sei que está difícil mas vai melhorar”, e realmente as coisas melhoraram muito, e sem dúvidas você fez parte dessa melhora.

Por fim, dedico esse trabalho a Anchieta, que me acompanha desde os tempos da graduação, e que mesmo à distância sempre se preocupou em saber como eu estava e conversar comigo, aliviando muito o peso de um momento bastante difícil da minha vida. Além disso, agradeço por todas as discussões teóricas, contribuições e sugestões que me ajudaram muito desde a concepção e execução do projeto, até a escrita dessa dissertação. Você sem dúvidas é alguém que sempre estimula a melhor versão de mim, e que levarei pro resto da vida.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível ser executado graças a um grande número de pessoas e entidades, que contribuíram para que todas as informações aqui apresentadas estivessem presentes.

Em primeiro lugar agradeço imensamente ao meu orientador, o prof. Alex Rafacho, por todos os ensinamentos, quer tenham sido teóricos, práticos ou a nível pessoal, além do cuidado e atenção em ir até a bancada executar experimentos comigo, os quais eu não conseguiria executar sozinho.

Em segundo lugar agradeço ao prof. Gustavo, pela ajuda no desenvolvimento do projeto, auxiliando na definição das técnicas que foram utilizadas, além da contribuição no suprimento de materiais para a execução do projeto sem os quais não conseguiríamos proceder com os experimentos.

Agradeço à equipe do LIDoC. Ao Guilherme por ter me ensinado o processamento das amostras para a microscopia eletrônica, uma contribuição indispensável para este trabalho. À Priscila pelo auxílio não só no ensino das técnicas de dosagem proteica e Western Blotting, mas também em atividades rotineiras como o cuidado com os animais. À Flávia, pela ajuda durante as coletas de ilhotas. E aos alunos do prof. Gustavo, Robson e Francieli, que mesmo ajudando em pontos pequenos, com a organização dos materiais utilizados no projeto, trocas de caixas dos animais e preparação de soluções de rotina, contribuíram grandemente para o seguimento do projeto.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC, agradeço pelo suporte com sua estrutura, materiais e equipamentos, que possibilitaram grande parte dos dados coletados nessa dissertação. Em especial agradeço à técnica Susane Lopes, sua contribuição foi enorme desde o período de desenvolvimento do projeto, processamento de amostras, coleta de dados, até a ajuda em como analisar os dados coletados. Agradeço grandemente por sua contribuição e disponibilidade contínua em nos auxiliar durante este período.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC, agradeço pela estrutura e equipamentos concedidos para a coleta de dados. Especialmente agradeço à Flávia, a qual auxiliou no uso do microscópio confocal, coleta de dados, e mais adiante me ensinando a utilizar o microscópio sozinho, possibilitando a coleta dos dados de forma independente.

Ao PPG em Farmacologia da UFSC, agradeço aos professores e alunos, pelos ensinamentos teóricos que foram muito importante na execução do projeto e redação do presente trabalho, bem como no auxílio com equipamentos para o processamento de amostras, além de treinamentos anteriormente à execução do projeto. Especialmente agradeço ao prof. José Eduardo pelo fornecimento da estrutura do seu laboratório e de seu sonicador, indispensável para o processamento das amostras.

Ao Biotério Central da UFSC, agradeço pelo fornecimento dos animais utilizados neste projeto, bem como de sua ração e maravalha. À veterinária Luciana Honorato agradeço em primeiro lugar pela capacitação no manuseio de animais e pela ajuda nos cuidados com seu bem estar durante o período de manutenção.

Ao CCB, agradeço pela estrutura, e todos o técnicos e servidores integrantes do departamento que ajudaram no seguimento do projeto com a organização de materiais, como as caixas utilizadas para os animais, além da limpeza do laboratório e destinação dos resíduos gerados nesse projeto.

Por fim agradeço à UFSC e à CAPES, pela estrutura e financiamento para a compra de materiais e equipamento de enorme importância para o seguimento deste projeto.

RESUMO

O malathion está entre os pesticidas mais utilizados e menos regulados em países de baixa e média-renda no mundo todo. Dados epidemiológicos e experimentais revelam o papel deste composto sobre o desequilíbrio da homeostase glicêmica e a incidência do Diabetes Mellitus tipo 2 e outras disfunções endócrinas. Neste contexto, investigamos os efeitos deste composto sobre ilhotas pancreáticas isoladas de ratos em diferentes concentrações (0,1 mM, 0,5 mM e 1,0 mM) durante 1 hora. Assim, observamos que o Malathion exerce citotoxicidade sobre as células beta das ilhotas pancreáticas nas concentrações mais elevadas (0,5 mM e 1 mM), reduzindo a viabilidade celular, como determinado por meio da microscopia confocal. Contudo, mesmo na menor concentração utilizada (0,1 mM), sinais de danos celulares característicos da indução da autofagia e necrose puderam ser observados nas células beta pancreáticas de ilhotas expostas ao malathion. Estes sinais de toxicidade se tornaram mais evidentes nas células beta provenientes de ilhotas expostas às concentrações mais elevadas (0,5 mM e 1 mM), observado tanto pela microscopia eletrônica de transmissão, como pela microscopia eletrônica de varredura. Dessa forma, vimos que a exposição aguda ao Malathion exerce citotoxicidade sobre as células beta pancreáticas, realçando a importância no manejo adequado da exposição humana a este pesticida.

Palavras-chaves: disruptores endócrinos; citotoxicidade; homeostase glicêmica; pâncreas endócrino.

ABSTRACT

Malathion is among the most consumed and poorly regulated pesticides in low- and middle-income countries around the world. Epidemiological and experimental data highlight the role of this compound over the disruption of glucose homeostasis and the incidence of type 2 Diabetes Mellitus and other endocrine dysfunctions. In this context, we investigated the effects of this compound over isolated pancreatic islets of rats in different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM) for 1 hour. Thus, we observed that malathion exerts cytotoxicity over pancreatic islets in the higher concentrations (0.5 and 1 mM), reducing cell viability as determined through confocal microscopy. However, even at the lowest concentration used (0.1 mM), signs of cell damage characteristic of the induction of autophagy and necrosis could be observed in pancreatic beta-cells of islets exposed to malathion. These signs of toxicity became more evident in beta-cells from islets exposed to the highest concentrations (0.5 and 1 mM), as seen both through transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. In this manner, we observe that the acute exposure to malathion leads to toxicity in pancreatic beta-cells, highlighting the importance of the adequate handling of human exposure to this pesticide.

Keywords: endocrine disruptors; cytotoxicity; glucose homeostasis; endocrine pancreas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Secreção da Insulina Estimulada pela Glicose.....	19
Figura 2 – Fatores de risco para o desenvolvimento do DM do tipo 2.....	21
Figura 3 – Origem de diferentes disruptores endócrinos.....	23
Figura 4 – Estrutura molecular do Malathion.....	27
Figura 5 - Citotoxicidade induzida em ilhotas pancreáticas isoladas após a incubação com o Malathion	45
Figura 6 - Alterações ultraestruturais em células β pancreáticas decorrentes do tratamento com veículo	46
Figura 7 - Formação de estruturas autofágicas decorrente da incubação com a menor concentração do Malathion	47
Figura 8 - Morte celular decorrente do tratamento com Malathion.....	48
Figura 9 - Necrose de células β pancreáticas após o tratamento com Malathion	49
Figura 10 - Malathion leva a alterações morfológicas extracelulares em ilhotas pancreáticas	50
Figura 11 - A visão extracelular revela alterações ultraestruturais observadas com o tratamento com Malathion em ilhotas pancreáticas.....	51
Figura 12 - Artefatos observados nas imagens de microscopia confocal de ilhotas tratadas com o Malathion por 3 horas	71
Figura 13 - Efeitos do Malathion sobre o nível de proteínas da maquinaria apoptótica	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico clínico do Diabetes	21
Tabela 2 – Comparação da Distribuição Tecidual do Malathion em Diferentes Estudos	28
Tabela 3 – Sumário de estudos in vivo e principais desfechos metabólicos observados com a exposição de animais ao Malathion	30
Tabela 4 – Efeitos in vitro observados com a incubação do Malathion em diferentes tipos celulares	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
Akt	Proteína cinase B
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
C3h	Grupo controle com 3 horas de incubação
CAT	Catalase
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ChE	Colinesterase
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Science
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropinas
CTL	Grupo controle com 1 hora de incubação
CYP	Citocromo P 450
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
GDH	Glutamato Desidrogenase
GDM	Diabetes Mellitus Gestacional
GK	Glicocinase
GLUT	Transportador de Glicose
GP	Glicogênio Fosforilase
GPX	Glutationa Peroxidase

GSH	Glutationa
GSIS	Secreção de Insulina Estimulada por Glicose
GST	Glutationa S-Transferase
HbA _{1c}	Hemoglobina A _{1c} Glicada
HK1	Hexocinase 1
HMDS	Hexametildisilazano
HO	Hoechst 33342
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDF	Federação Internacional do Diabetes
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Sintase de Óxido Nítrico Induzível
IP	Iodeto de Propídio
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
JNK	Cinase c-Jun N-terminal
K _{ATP}	Canais para Potássio Sensíveis ao ATP
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LDH	Lactato Desidrogenase
LIDoC	Laboratório de Investigação em Doenças Crônicas
M1_0,1	Grupo incubado com 0,1 mM de Malathion por 1 hora
M1_0,5	Grupo incubado com 0,5 mM de Malathion por 1 hora
M1_1,0	Grupo incubado com 1,0 mM de Malathion por 1 hora

M3_0,1	Grupo incubado com 0,1 mM de Malathion por 3 horas
M3_0,5	Grupo incubado com 0,5 mM de Malathion por 3 horas
M3_1,0	Grupo incubado com 1,0 mM de Malathion por 3 horas
MDA	Malondialdeído
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OGTT	Teste de Tolerância à Glicose Oral
p38 MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógeno p38
PAHO	Organização da Saúde Pan-Americana
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxicinase
POPs	Poluidores Orgânicos Persistentes
<i>redox</i>	Redução-Oxidação
RI	Resistência à Insulina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
T3	Triiodotironina
TG	Triglicerídios
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	DOENÇAS CRÔNICAS E DIABETES MELLITUS	17
1.1.1	Epidemiologia	17
1.1.2	Fisiopatologia.....	17
1.1.3	Fatores de risco	21
1.2	DISRUPTORES ENDÓCRINOS	22
1.2.1	Definições e classificações	22
1.2.2	Poluidores persistentes orgânicos	23
1.3	PESTICIDAS E DIABETES	24
1.3.1	Consumo e associação com doenças crônicas	24
1.3.2	Pesticidas Organofosforados.....	25
1.3.3	Exposição ao Malathion e diabetes	26
1.4	PÂNCREAS ENDÓCRINO E MALATHION	29
1.4.1	Efeitos endócrinos	29
1.4.2	Efeitos sobre as ilhotas pancreáticas	32
1.4.3	Efeitos sobre outros tipos celulares em cultivo	33
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	LOCAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO	37
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	37
3.3	ANIMAIS, MANEJO E MANUTENÇÃO	38
3.4	ISOLAMENTO DE ILHOTAS	39
3.5	INCUBAÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS	39
3.6	VIABILIDADE CELULAR: COLORAÇÃO COM HO 342 E IP	40
3.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	41
3.7.1	Microscopia eletrônica de varredura	42
3.8	WESTERN BLOT	42
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
4	RESULTADOS	44
4.1	INCUBAÇÃO COM MALATHION INDUZ MORTE CELULAR EM ILHOTAS PANCREÁTICAS	44
4.2	INCUBAÇÃO COM MALATHION RESULTA EM FENÓTIPO APOPTÓTICO DAS CÉLULAS B PANCREÁTICAS	45

4.3	MALATHION CAUSA PREJUÍZOS NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	49
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	58
	APÊNDICE A – Artefatos de técnica observados em ilhotas pancreáticas através da microscopia confocal.....	71
	APÊNDICE B – Quantificação proteica em ilhotas pancreáticas.....	72
	APÊNDICE C – Manuscrito em preparação para submissão no <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i>	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CRÔNICAS E DIABETES MELLITUS

1.1.1 Epidemiologia

As doenças crônicas, como as doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas, são a principal causa de morte no mundo. Esse contexto decorre de diversos fatores, destacando-se a ampla exposição dos indivíduos aos principais fatores de risco, como o tabagismo, alcoolismo, dietas de alto teor energético e baixo teor nutricional, estresse e sedentarismo (BENNETT *et al.*, 2018; PAHO, 2019). Apesar da mortalidade por estas doenças ser preocupante, há uma preocupação ainda maior com a morbidade apresentada nos indivíduos acometidos por estas patologias crônicas (WHO, 2020).

O número de adultos afetados pelo diabetes tem aumentado ao longo dos anos, e os números projetados têm sido ultrapassados a cada ano, mostrando a necessidade no manejo adequado desta patologia (IDF, 2021). Ainda que a mortalidade prematura em adultos seja preocupante, a exposição aos fatores de risco ocorre desde a infância. Assim, o número de crianças e jovens com obesidade e diabetes também vem aumentando nas últimas décadas, realçando a preocupação com a morbidade destas patologias (WHO, 2013). Isto destaca a necessidade em identificar os fatores responsáveis pelo alto número de indivíduos diabéticos.

1.1.2 Fisiopatologia

O Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico e se caracteriza principalmente por uma diminuição na capacidade regulatória da homeostase glicêmica no organismo, quer seja pela insuficiência na produção da insulina endógena, ou pela redução na resposta deste hormônio hipoglicemiante nos tecidos periféricos (IDF, 2021). Os prejuízos na homeostase glicêmica observados no DM, culminam não só em distúrbios metabólicos, mas também cardiovasculares e inflamatórios, levando à presença de outras comorbidades nos indivíduos acometidos. Por este motivo, o DM é considerado uma doença multisistêmica, a qual promove prejuízos a nível de macro- e micro-circulação, aumento o risco de óbito por doenças cardiovasculares de duas a quatro vezes (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020).

A fisiopatologia do DM está fortemente relacionada à função do pâncreas endócrino. Este órgão endócrino é o principal responsável pela manutenção da homeostase glicêmica, sendo organizado em estruturas denominadas ilhotas pancreáticas. As ilhotas pancreáticas são compostas por tipos celulares distintos, que se comunicam de maneira endócrina, parácrina e autócrinas, para realizar a regulação dos níveis glicêmicos. Dentre estes tipos celulares, as células β , responsáveis pela síntese, armazenamento e secreção da insulina, se apresentam em maior número, seguido das células α , responsáveis pela síntese e liberação do glucagon, havendo entretanto heterogeneidade nessa distribuição populacional de acordo com a espécie (BRISSOVA *et al.*, 2005). Além destas, as células δ , as quais sintetizam a somatostatina, são importantes para a regulação da atividade das células α e β , bem como o controle da liberação da somatotrofina, um importante hormônio hiperglicemiante (DA SILVA XAVIER, 2018).

De forma ultraestrutural, as células beta pancreáticas podem ser distinguidas identificadas pela sua ultraestrutura particular, caracterizada pela presença de um grande número de mitocôndrias e grânulos secretórios de insulina, os quais apresentam núcleo central elétron denso envolto por um saco membranoso e halos periféricos típicos (LACY; HARTROFT, 1959; MARCHETTI *et al.*, 2017). Esta estrutura se relaciona fortemente com a sua função secretória, que está particularmente ligada com a patologia do DM.

O processo de secreção da insulina é complexo e está esquematizado na Figura 1. Este tipo celular expressa majoritariamente as isoformas dos transportadores da glicose (*glucose transporter* – GLUT) do tipo 2, em camundongos e ratos, e GLUT1 e GLUT3, em humanos, as quais permitem o influxo da glicose independentemente da ação da insulina e de acordo com a oscilação na concentração plasmática (BERGER; ZDZIEBLO, 2020). Após a entrada, a glicose é fosforilada pela enzima glicocinase (*glucokinase* – GK), sendo direcionada para a via glicolítica que resulta no aumento dos níveis citoplasmáticos de trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate* – ATP) e este produto interage com os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em sua subunidade $K_{ir6.2}$, a qual compõe o poro do canal (TUCKER *et al.*, 1997; VELASCO *et al.*, 2016). Dessa forma, a condutância do canal é diminuída, impedindo o efluxo de K^+ por estes canais, e levando o potencial de membrana a valores menos eletronegativos pela retenção do K^+ na face intracelular

da membrana plasmática. Com isso, canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v) são ativados, levando ao influxo de Ca^{2+} no citoplasma das células beta, causando despolarização e secreção da insulina, sendo este processo denominado secreção da insulina estimulada pela glicose (*glucose-stimulated insulin secretion – GSIS*) (MACDONALD; JOSEPH; RORSMAN, 2005).

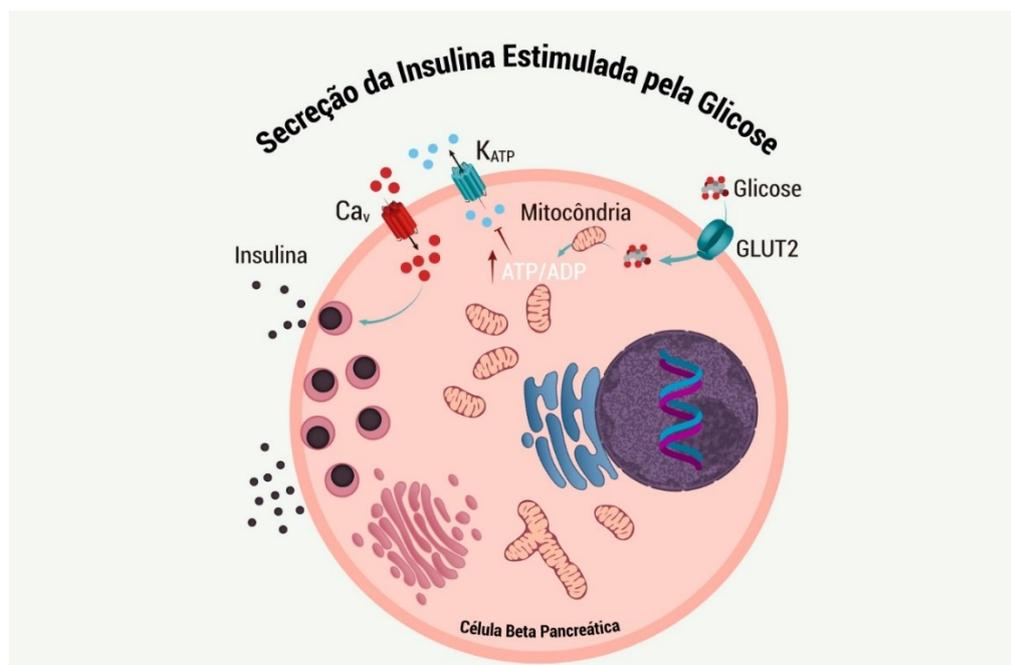


Figura 1 – Secreção da Insulina Estimulada pela Glicose.

Ilustração esquemática do mecanismo de secreção da insulina estimulada pela glicose em células beta pancreáticas. A glicose é internalizada pelo transportador da glicose tipo 2 (GLUT2), sendo fosforilada pela enzima glicocquinase, sendo metabolizada pela glicólise e pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos, causando um aumento na razão intracelular do trifosfato de adenosina (ATP), com relação ao difosfato de adenosina (ADP), assim os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) são fechados, levando à retenção do K^+ e elevação do potencial de membrana, abrindo canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v), despolarizando a célula e levando à secreção da insulina. Fonte: Autor (2022).

Em estado saudável, a ultraestrutura das células β pancreáticas é bem documentada pela presença de grânulos de insulina característicos deste tipo celular, se apresentando com um núcleo central elétron denso envolto por um saco membranoso. Além disso, estas células apresentam elevado número de mitocôndrias com matriz elétron densa e morfologia cilíndrica, e núcleo esférico (LACY; HARTROFT, 1959; MARCHETTI *et al.*, 2017). A ultraestrutura destas células, no entanto, é alterada em situações patológicas, como no DM de tipo 1 (DM1) (MURALIDHARAN *et al.*, 2021), e no DM de tipo 2 (DM2), tanto em humanos (MASINI *et al.*, 2017), quanto em modelos animais (MOMOSE *et al.*, 2006).

De acordo com a etiologia do DM, diferentes tipos desta patologia são identificados. Os principais são o DM1 e o DM2. O DM1 resulta de respostas autoimunes onde são produzidos anticorpos específicos contra as células β pancreáticas reduzindo assim a capacidade de produção endógena da insulina no indivíduo acometido. Essa condição pode ser resultante de uma multitude de fatores que incluem predisposição genética associada ou não a infecções virais ou parasitárias, que estimulam a reatividade contra autoantígenos nas células β pancreáticas (NERUP *et al.*, 1974; ROEP *et al.*, 2021).

O DM2, por sua vez, está associado a outro distúrbio conhecido por resistência à insulina (RI). Esse distúrbio se manifesta em órgãos em que o influxo da glicose está regulado pela presença dos transportadores de glicose do tipo 4 (*glucose transporter 4* – GLUT4), assim ditos como órgãos insulino-dependentes, como o músculo esquelético e o tecido adiposo, principalmente. Todavia, o principal órgão estimulado pela ação da insulina é o fígado, apesar de não necessitar de sua ação para a captação da glicose, uma vez que neste órgão o transportador da glicose expresso é o GLUT2, um transportador bidirecional constitutivo (NOLAN *et al.*, 2015). Uma vez que o fígado exerce um importante papel na regulação dos níveis glicêmicos, a insulina participa de sua função regulando as vias de gliconeogênese, glicogênese, glicogenólise, bem como as vias de β -oxidação de ácidos graxos. Além disso, a maior parte da insulina liberada é metabolizada no fígado. Assim, o fígado, como um dos mais importantes alvos da insulina, acaba por sua vez como um dos primeiros sítios de manifestação da RI (MARUŠIĆ *et al.*, 2021). Diversos fatores podem ocasionar a redução na sinalização celular da insulina, estando entre os principais a ativação de determinadas vias pró-inflamatórias, principalmente aquelas ativadas pelo fator de necrose tumoral α (*tumour necrosis factor α* – TNF α) (BERBUDI *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2021).

Apesar dos diferentes tipos de DM, e independentemente de qual seja, um dos principais sintomas encontrados nesta patologia é a hiperglicemia. Clinicamente, os principais parâmetros utilizados para fins de diagnóstico estão resumidos na Tabela 1. Assim, é possível perceber a importância da homeostase glicêmica na fisiopatologia do diabetes, e, portanto, no monitoramento e manejo apropriado dos fatores que modificam os níveis fisiológicos deste nutriente.

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico clínico do Diabetes

Teste	Glicemia de jejum	Glicemia no teste de tolerância à glicose oral (OGTT)	Hemoglobina A _{1c} glicada (HbA _{1c})	Glicemia na presença de sintomas de hiperglicemia
*Diabetes	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL	6,5%	≥ 200 mg/dL

Tabela modificada do IDF (IDF, 2021). * Estando presentes um ou mais dos critérios.

1.1.3 Fatores de risco

A incidência do DM é associada a uma série de fatores de risco já bem descritos, os quais estão esquematizados na Figura 2. O estilo de vida do indivíduo, a sobrecarga de energia, sobretudo oriunda da glicose, em conjunto com o sedentarismo, figuram entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM (SAMPATH KUMAR *et al.*, 2019; SCHWINGSHACKL *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

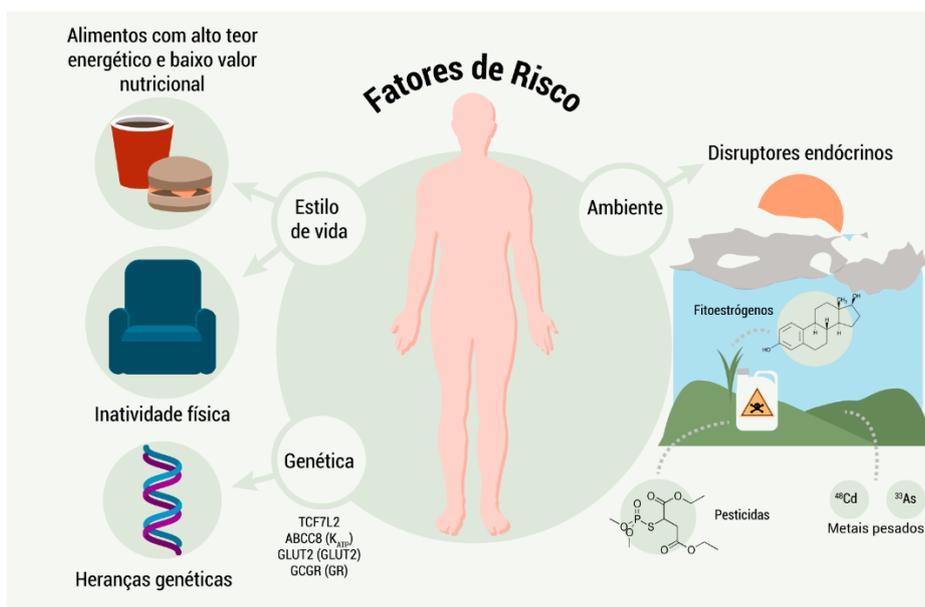


Figura 2 – Fatores de risco para o desenvolvimento do DM do tipo 2.

Ilustração representativa dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2, como os relacionados ao estilo de vida, fatores genéticos, e fatores ambientais. ABCCB - ATP

Binding Cassette Subfamily C Member 8, GCCR – receptor do glugagon, GLUT2 – transportador da glicose 2. Fonte: Autor (2022).

Além dos fatores associados ao estilo de vida, a idade do indivíduo é o principal indicador do risco do desenvolvimento do DM. Ademais, fatores genéticos podem também contribuir com o risco elevado para esta fisiopatologia, podendo ser relacionados à etnia do indivíduo (WHO, 2016).

Adicionalmente, o estudo dos fatores de risco ambientais tem ajudado na compreensão do aumento da incidência mundial do DM, com um destaque para aqueles classificados como disruptores endócrinos (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017; SONG *et al.*, 2016), uma vez que evidências pré-clínicas já demonstraram a transferência de alguns destes compostos através da placenta e do leite materno (MACHIN; MCBRIDE, 1989; CHHABRA *et al.*, 1993 apud ATSDR, 2003), relacionando assim a exposição precoce aos fatores de risco com o desenvolvimento de prejuízos no funcionamento do sistema endócrino e, conseqüentemente, das doenças crônicas como o DM na vida adulta.

1.2 DISRUPTORES ENDÓCRINOS

1.2.1 Definições e classificações

Atualmente, várias moléculas são reconhecidas como disruptores endócrinos (Figura 3), sendo estes xenobióticos capazes de interferir em qualquer aspecto da função hormonal, desde a sua expressão gênica, liberação e ação nos tecidos alvos (GORE *et al.*, 2014; THOMAS ZOELLER *et al.*, 2012).

Vários compostos químicos já são reconhecidos como disruptores endócrinos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas, plásticos, metais pesados, agentes farmacológicos e fitoestrógenos. Assim, pode ser percebido que os disruptores endócrinos podem ser moléculas de ocorrência natural, bem como de origem sintética, podendo também exercer seu papel quando se acumulam nos tecidos orgânicos (YILMAZ *et al.*, 2020). A título de exemplo, alguns metais pesados como o cádmio já foram relacionados com a incidência de distúrbios endócrinos tanto em humanos como em animais, em estudos clínicos e pré-clínicos, levando a patologias como doenças metabólicas, cardiovasculares, disfunções renais e, até mesmo, o câncer (BIMONTE *et al.*, 2021). Além disso, alguns derivados do petróleo também apresentam esta capacidade de deposição e disrupção, como o caso dos bisfenóis e

dos ftalatos, moléculas presentes em resinas e polímeros plásticos (BASAK; DAS; DUTTAROY, 2020).

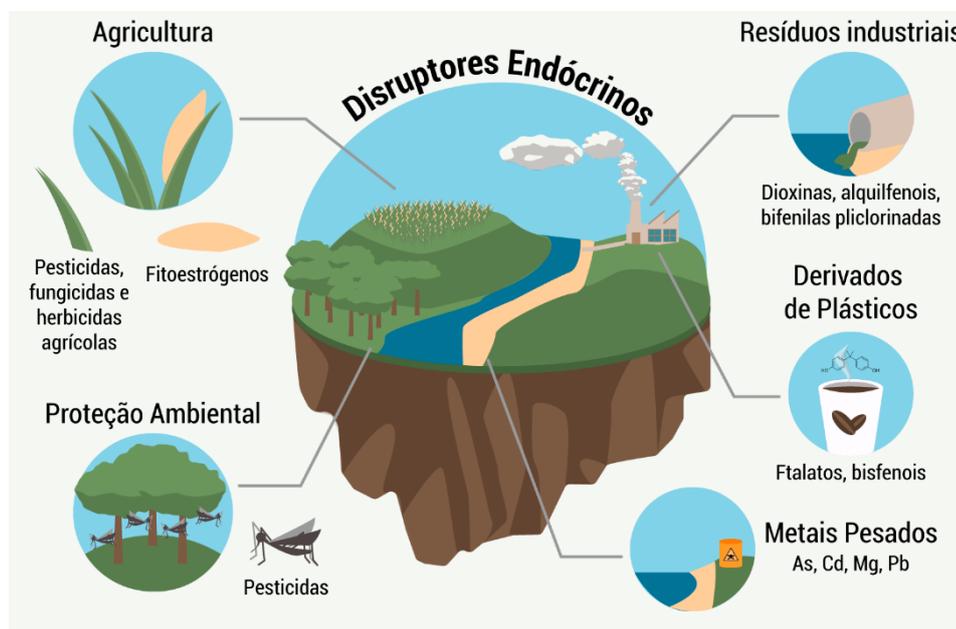


Figura 3 – Origem de diferentes disruptores endócrinos.

Esquema ilustrativo de compostos ou classes de agentes representatites de diferentes classes de disruptores endócrinos. Fonte: Autor (2022).

Outra classe importante de disruptores endócrinos são os poluidores persistentes orgânicos (*persistent organic poluters - POPs*), que incluem químicos com ação inseticida, herbicida, fungicida e rodenticida. Tais compostos possuem essa denominação por persistirem no ambiente, mesmo em baixas concentrações, se depositando no solo ou leitos aquáticos, onde animais não-humanos e humanos podem se contaminar, podendo induzir distúrbios metabólicos a longo prazo (HOYECK *et al.*, 2022; JAACKS; STAIMEZ, 2015).

1.2.2 Poluidores persistentes orgânicos

A exposição animal aos POPs é um problema bem reconhecido. Uma vez que uma das principais utilização dos POPs é em lavouras e plantações agrícolas, além de serem gerados como subprodutos de processos industriais ou de combustão, sendo assim investigados a bastante tempo (MAGLIANO *et al.*, 2014).

Com os estudos acerca da ação dos POPs, foi identificado seu potencial teratogênico com a exposição de mulheres gestantes (SPINDER *et al.*, 2019). Assim, várias moléculas previamente muito utilizadas comercialmente são

atualmente banidas em vários países. Contudo, principalmente em países subdesenvolvidos, como o Brasil, alguns destes compostos continuam sendo utilizados devido ao seu baixo custo de produção (IBAMA, 2020). Dessa forma, nestes países a exposição a estes compostos através de alimentos é bem documentada, mas principalmente em populações de regiões rurais e especialmente em indivíduos que trabalham em lavouras, sendo diretamente expostos aos POPs (AGUILAR-GARDUÑO *et al.*, 2013; FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007; SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013). Esta exposição já foi associada ao desencadeamento de diversas alterações fisiológicas, sobre as quais seu papel como fato de risco culmina no desenvolvimento de fisiopatologias crônicas, como no caso do DM2 (SONG *et al.*, 2016; XIAO; CLARK; PARK, 2017).

Um importante setor relacionado com a exposição aos POPs é a agricultura, onde a exposição ocupacional de trabalhadores rurais já foi bastante relatada, com uma série de casos de alterações hormonais e metabólicas identificadas (AGUILAR-GARDUÑO *et al.*, 2013; RAAFAT; ABASS; SALEM, 2012). Além disso, a contaminação ambiental também se mostra um problema, ocorrendo através dos solos, efluentes aquáticos e até dos organismos terrestres e aquáticos por meio da bioacumulação e biomagnificação destes compostos (SPADOTTO *et al.*, 2004). Assim, a identificação dos principais compostos, bem como os mecanismos pelos quais levam a alterações hormonais em humanos, é uma questão de saúde pública muito relevante.

1.3 PESTICIDAS E DIABETES

1.3.1 Consumo e associação com doenças crônicas

Um dos principais POPs utilizados mundialmente são os pesticidas. Este grande uso está relacionado com a atividade no setor da agricultura, que possui um enorme impacto econômico e social no mundo. Com a crescente expansão da população mundial, a produção de alimentos se faz cada vez mais necessária em quantidades cada vez maiores. Além disso, não só a busca por produtos agrícolas leva à necessidade da expansão da área cultivar. A pecuária também traz a necessidade para uma produção ainda maior de alimentos, destacando-se os cereais e leguminosas, para comportar o número elevado de animais em criação, levando assim a um aumento cada vez maior nas últimas décadas no consumo de pesticidas (BOMBARDI, 2017).

Para sustentar tamanha área de cultivo, são necessárias alternativas para evitar os prejuízos acometidos pela presença de insetos, animais e outros tipos de pragas, que causam uma redução substancial na produtividade agrícola ao redor do mundo. Para este fim, os pesticidas, já há muito tempo utilizados, continuam sendo altamente consumidos ao redor do mundo, mesmo apresentando limitações nos âmbitos ambiental e de saúde pública. Os pesticidas podem ser divididos em várias classes de acordo com seu mecanismo de ação nos sistemas biológicos e, com isso, de acordo também com seus alvos (WHO, 2010). De acordo com o relatório anual de consumo de agrotóxicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) do ano de 2020, os pesticidas mais vendidos no Brasil foram os herbicidas, como o glifosato e seus sais, além do ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e atrazina, seguido dos fungicidas, como o mancozebe e clorotalonil, e os pesticidas, com destaque para os organofosforados, sendo os mais consumidos o acefato, o Malathion, e o clorpirifós (IBAMA, 2020).

1.3.2 Pesticidas Organofosforados

Uma importante classe de pesticidas utilizada são os pesticidas organofosforados. Este grupo é composto por mais de 150 compostos diferentes, e são utilizados a mais de 70 anos para o controle pragas agrícolas, como insetos e nematódeos, sendo também utilizado medicinalmente, como anti-helmíntico. Este amplo uso se justificou inicialmente como uma alternativa para a utilização de pesticidas organoclorados, os quais apresentavam toxicidade humana bastante elevada. Todavia, os pesticidas organofosforados não são isentos de atividade tóxica em humanos, sendo assim a sua utilização bastante controversa (HOYECK *et al.*, 2022). Apesar dos problemas com seu uso, a utilização destes compostos ainda é pouco regulada em vários países, existindo assim uma tendência na manutenção de sua utilização agrícola, devido ao seu amplo espectro de ação, baixo custo de produção e depuração ambiental rápida (CASIDA; QUISTAD, 2004; NAUGHTON; TERRY, 2018).

A toxicidade mediada pelos organofosforados ocorre pela inativação de colinesterases (ChE) em fendas sinápticas e junções neuroefetoras e neuromusculares, como a acetilcolinesterase (AChE), no sistema nervoso central, e, principalmente, a butirilcolinesterase (BChE), presente na corrente sanguínea, bem como outros tecidos regulados por ação colinérgica (VALE; LOTTI, 2015). Como

mencionado, um dos pesticidas mais utilizados no Brasil atualmente é o (dimetoxitiofosforil) succinato de dietila, conhecido comercialmente como Malathion (IBAMA, 2020). Este pesticida organofosforado exerce toxicidade por meio de um metabólito denominado malaoxon, o qual é um produto da metabolização do sistema de enzimas hepáticas microsossomais do citocromo P450 (*cytochrome P450* – CYP) nas isoformas CYP1A2 e CYP2B6, em menores concentrações do Malathion, e CYP3A4 em maiores concentrações deste pesticida (BURATTI *et al.*, 2005; GALÁNTAI *et al.*, 2011). Este metabólito oxidante se conjuga com as ChEs de forma irreversível, bloqueando a degradação da acetilcolina e provocando uma grande estimulação colinérgica sobre tecidos efetores, como fígado, trato gastrointestinal, glândulas endócrinas, sistema nervoso central, dentre outros, sendo este o principal mecanismo de ação para este grupo de compostos visando a intoxicação de insetos (DURKIN, 2008).

1.3.3 Exposição ao Malathion e diabetes

Uma vez que é amplamente utilizado como inseticida ao redor do mundo, um grande número de casos de intoxicação com o Malathion pode ser observado, podendo resultar também em números preocupantes de óbitos (SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013). Entretanto, um problema ainda maior para a saúde pública está ligado à exposição ocupacional a longo prazo, que poderia se relacionar com a susceptibilidade no desenvolvimento do DM em indivíduos expostos. Esta relação já foi demonstrada em alguns casos, como em um grupo de trabalhadores rurais expostos a este composto que apresentaram correlação positiva entre a concentração plasmática do Malathion e indicadores de resistência à insulina, bem como um aumento no níveis de glicose e insulina plasmáticas em jejum nos indivíduos expostos, comparados com indivíduos não-expostos (RAAFAT; ABASS; SALEM, 2012). A estrutura molecular do Malathion pode ser visualizada na Figura 4.

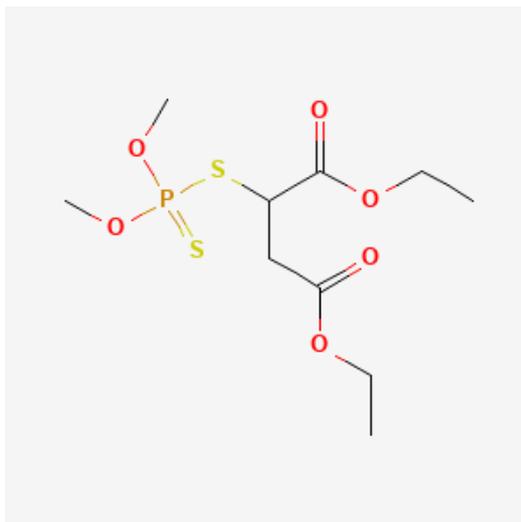


Figura 4 – Estrutura molecular do Malathion.

Fonte: National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 4004, Malathion. Retrieved June 15, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Malathion>.

Para compreender como o Malathion pode atingir os tecidos endócrinos e levar a alterações metabólicas sistêmicas, são relevantes os estudos que investigam a sua distribuição tecidual, revelando os principais sítios de deposição deste composto, como também suas características farmacocinéticas relacionadas à sua via de administração, distribuição, metabolização e excreção. A distribuição do Malathion nos diferentes tecidos varia de acordo com a via de administração e a determinação precisa da sua concentração tecidual é dificultada pelas taxas de metabolização rápidas em alguns tecidos, e lentas em outros. Conquanto, os estudos para este fim se baseiam principalmente na extração do composto de tecidos coletados em autópsias utilizando técnicas cromatográficas, nos casos de intoxicação humana, ou na administração do ^{14}C -Malathion radiomarcado e detecção *post mortem* de sua distribuição tecidual, no caso de estudos em animais (ATSDR, 2003).

Os achados de diferentes estudos utilizando modelos humanos ou animais com relação à distribuição tecidual do Malathion, estão sumarizados na Tabela 2. Com o conjunto de dados na literatura, é possível perceber que o Malathion apresenta absorção rápida, bem como rápida metabolização hepática, e excreção através dos aparelhos gastrointestinal e renal. Todavia, alguns tecidos podem se apresentar como reservatórios para o Malathion e seus metabólitos, como o tecido adiposo e a

pele. Estes achados podem sugerir uma via pela qual a exposição crônica através da alimentação a baixas concentrações do composto, podem induzir distúrbios metabólicos em importantes órgãos para o metabolismo glicêmico, como o fígado, intestino delgado e pâncreas. Ademais, a identificação da pele como um reservatório para este composto, pode explicar a correlação positiva com o desenvolvimento da resistência à insulina e DM2, em casos de exposição crônica como no caso de um estudo realizado com trabalhadores rurais que manipulavam o Malathion (RAAFAT; ABASS; SALEM, 2012).

Tabela 2 – Comparação da Distribuição Tecidual do Malathion em Diferentes Estudos

Autor, Ano	MORGADE; BARQUET 1982	REDDY <i>et al.</i> , 1982	JADHAV <i>et al.</i> , 1992	SALEH <i>et al.</i> , 1997
Modelo Experimental	Autopsia em caso de intoxicação	Ratos	Autópsia em casos de intoxicação	Ratos
Via de Exposição	Oral	Oral, gavagem diária (15 dias) em doses de 40 ou 800 mg/Kg	Oral	Oral (dose única de 128,75 µCi/Kg), Dérmica (dose única de 217,45 µCi/Kg)
Distribuição Gástrica	--	--	Conteúdos gástricos: 452-989 µg/mL	Oral: 74,61% estômago, 18,33% intestino delgado, 7,06% saliva* Dérmica: 23,23% intestino delgado*
Distribuição Hepática	--	0,3%*	198-383 µg/g	Oral: 3,12%* Dérmica: 5,38%*
Distribuição no Tecido Adiposo	80,4 µg/mL 8,2 ug/mL**	--	--	--
Distribuição Plasmática	--	--	175-517 µg/mL	Oral: 0,75%* Dérmica: 1,27%*

Distribuição Renal	--	90%*	280-616 µg/g	Oral: 1,51%* Dérmica: 0,82%*
Distribuição Dérmica	--	--	--	Oral: -- Dérmica: 57,2%*

*Referente à porcentagem da autoradiografia detectada nos tecidos com base na dose administrada.

**Referente à concentração de Malaoxon.

Como mencionado anteriormente, uma grande problemática no desenvolvimento de doenças crônicas, é a exposição precoce aos fatores de risco, ocorrendo desde a infância (WHO, 2013). No caso dos pesticidas e do Malathion, a transferência do composto através da placenta e do leite materno já foi também demonstrada em estudos anteriores (MACHIN; MCBRIDE, 1989; CHHABRA et al., 1993 apud ATSDR, 2003). Outros trabalhos, já demonstraram também a ocorrência de prejuízos neurais, bem como alterações nas principais proteínas responsáveis pela regulação do balanço de redução-oxidação (*redox*) celular, levando a um aumento no estresse oxidativo, na prole de camundongos prenhes tratadas com o Malathion (OUARDI et al., 2019). Assim, se faz evidente a compreensão dos mecanismos pelos quais o Malathion pode atuar como um fator de risco para as doenças crônicas, especialmente o DM.

1.4 PÂNCREAS ENDÓCRINO E MALATHION

1.4.1 Efeitos endócrinos

Os efeitos endócrinos resultantes da exposição ao Malathion podem ou não estar relacionados à sua atividade como inibidor de ChEs. Contudo, a realização de tratamentos em animais com doses menores, insuficientes para realizar a inibição do sistema de ChEs, levou a identificação de uma série de diferentes mecanismos pelo qual o Malathion induz distúrbios celulares, resultando em alterações metabólicas significantes ao longo do tempo.

Diferentes desfechos metabólicos já foram demonstrados em animais de maneira variável de acordo com tratamentos subcrônicos ou agudos. Um sumário dos principais achados em vários estudos pode ser visto na Tabela 3. De maneira sistêmica, alterações metabólicas resultantes do tratamento com Malathion já foram relatadas, especialmente sobre o aumento na liberação de alguns hormônios envolvidos no metabolismo glicêmico, como a corticosterona (REZG et al., 2010) e a

insulina (LASRAM *et al.*, 2014; PANAHI *et al.*, 2006; POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007).

Além dos efeitos endócrinos sobre a liberação hormonal, o tratamento com Malathion também leva a alterações nas atividades de algumas enzimas relacionadas com o metabolismo glicêmico, como a fosfoenolpiruvato carboxicinase (*phosphoenolpyruvate carboxykinase* – PEPCK) e a glicogênio fosforilase (*glycogen phosphorylase* – GP) (ABDOLLAHI *et al.*, 2004b; REZG *et al.*, 2008), bem como a hexocinase 1 (HK1) (REZG *et al.*, 2008). Com isso, é frequentemente relatado o aumento nos índices glicêmicos e insulinêmicos nos animais tratados associados a uma resistência periférica à insulina (ABDOLLAHI *et al.*, 2004a; LASRAM *et al.*, 2014; PANAHI *et al.*, 2006; POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007), além de maiores concentrações de triglicerídeos (TG) (REZG *et al.*, 2010) e porcentagem de hemoglobina glicada (LASRAM *et al.*, 2014).

Contudo, esses efeitos não se limitam ao sistema endócrino, se manifestando também sobre parâmetros inflamatórios, que se relacionam com as alterações metabólicas observadas. Destacam-se no tecido hepático o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, assim como de enzimas oxidativas, e diminuição na atividade de enzimas antioxidantes, causando prejuízos gerais no *status redox* celular (LASRAM *et al.*, 2014), levando a danos celulares e histológicos, como observado em ilhotas pancreáticas, os quais podem resultar em prejuízos funcionais nestas ilhotas, como a redução na GSIS relatada em ilhotas de animais expostos ao Malathion (POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Sumário de estudos *in vivo* e principais desfechos metabólicos observados com a exposição de animais ao Malathion

Autores/Ano	Desenho Experimental	Principais Desfechos
REZG <i>et al.</i> , 2010	Tratamento por via oral em ratos Wistar durante 32 dias, dose de 100 mg/kg	Redução de mRNA do CRH hipotalâmico Aumento de mRNA da iNOS hipotalâmica Aumento na concentração de TG para $0,668 \pm 0,35 \text{ g/L}^{-1}$ (concentração controle = $0,338 \pm 0,038 \text{ g/L}^{-1}$)

LASRAM <i>et al.</i> , 2014	Tratamento por via oral em ratos Wistar durante 28 dias, dose de 200 mg/kg	<p>Aumento no conteúdo hepático e expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1β e IFN-γ</p> <p>Diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (GSH, GST, GPX, SOD) e aumento de enzimas oxidativas (CAT)</p> <p>Aumento na glicemia, insulinemia e porcentagem de hemoglobina glicada</p>
ABDOLLAHI <i>et al.</i> , 2004	Tratamento por via oral através da dieta em ratos Wistar durante 4 semanas, doses de 100, 200 e 400 ppm	<p>Aumento na atividade hepática da PEPCK e GP</p> <p>Aumento na concentração de glicose plasmática</p>
REZG <i>et al.</i> , 2008	Tratamento agudo por via oral de ratos Wistar, dose única de 100 mg/kg	<p>Redução nos níveis hepáticos e atividade da GP</p> <p>Aumento nos níveis hepáticos e atividade da HK1</p>
POURNOURMOHAMMADI <i>et al.</i> , 2007	Tratamento por via oral através da dieta em ratos Wistar durante 4 semanas, doses de 100, 200 e 400 ppm	<p>Diminuição da GSIS (doses de 200 e 400 ppm) em ilhotas pancreáticas</p> <p>Aumento nas concentrações de glicose (todas as doses) e insulina (doses 200 e 400 ppm) plasmáticas</p> <p>Prejuízos histológicos em ilhotas pancreáticas de acordo com a dose</p>
PANAHI <i>et al.</i> , 2006	<p>Subcrônico: Tratamento por via oral através da dieta em ratos Wistar durante 4 semanas, doses de 100, 200 e 400 ppm;</p> <p>Agudo: Tratamento agudo por via intraperitoneal, doses de 3, 15 e 75 mg/kg</p>	<p>Subcrônico: Aumento na concentração de glicose plasmática e atividade da GDH em ilhotas pancreáticas de acordo com a dose</p> <p>Aumento na concentração plasmática de insulina e atividade da GK nas doses de 200 e 400 ppm</p> <p>Agudo: Aumento na concentração de glicose plasmática e atividade da GDH em ilhotas pancreáticas de acordo com a</p>

		dose
		Aumento na concentração plasmática de insulina e atividade da GK nas doses de 15 e 75 mg/kg

1.4.2 Efeitos sobre as ilhotas pancreáticas

Apesar de importantes os estudos acerca dos desfechos metabólicos em ilhotas pancreáticas decorrentes do tratamento em animais com o Malathion, a realização de tratamentos diretamente nestas estruturas é uma ferramenta válida para o entendimento da progressão dos distúrbios celulares com a exposição crônica ao Malathion. No entanto, o número de estudos com este modelo *ex vivo* ainda é limitado.

Com o cultivo de ilhotas pancreáticas, os efeitos deste pesticida sobre a secreção da insulina já foram descritos. Por exemplo, a redução na secreção e no conteúdo da insulina e do glucagon, foram demonstrados como resultado do tratamento *ex vivo* de ilhotas de ratos com concentrações do Malathion de 25, 125 e 625 µg/ml, por 1, 3 ou 5 horas. Neste mesmo trabalho, foi percebido que após 3 e 5 horas de exposição em todas as doses utilizadas, ocorreu o aumento do conteúdo de glucagon, enquanto o conteúdo de insulina não foi afetado. Pôde ser visto também um aumento no conteúdo da insulina e peptídeo C após 5 horas de tratamento. Um achado interessante, foi que o Malathion causou uma diminuição na secreção da insulina estimulada pela glicose após um período de 30 min de exposição, ao passo que a secreção basal da insulina foi aumentada em resposta ao tratamento em todas as concentrações (VOSOUGH-GHANBARI *et al.*, 2007).

As alterações mediadas pelo Malathion sobre a secreção da insulina podem se relacionar com a indução de disfunção mitocondrial nas células β pancreáticas, como relatado anteriormente através de tratamentos *in vivo* com o Malathion, onde a secreção da insulina estimulada pela glicose foi diminuída, enquanto a secreção estimulada pelo KCl se manteve inalterada em resposta ao tratamento (HOYECK *et al.*, 2022; POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007). Assim, é visto que mesmo em concentrações baixas, o Malathion pode prejudicar a função das ilhotas pancreáticas, bem como das células β pancreáticas.

1.4.3 Efeitos sobre outros tipos celulares em cultivo

Compreendendo as alterações a nível de ilhotas pancreáticas, se faz importante também avaliar as alterações a nível celular e molecular, utilizando modelos de tratamento com Malathion *in vitro*. Detalhes acerca dos tempos de incubação, concentrações utilizadas e principais desfechos nos trabalhos citados nesta seção estão sumarizados na Tabela 4.

Devido à significância da sinalização da insulina para os desfechos do DM, linhagens celulares de tecidos responsivos à insulina são bem estudadas, dentre as quais as células da musculatura esquelética (linhagem de mioblastos L6) podem ser destacadas. Nesta linhagem foram observados redução na sinalização da insulina como resultado do aumento na fosforilação de algumas proteínas envolvidas no processo de transdução do sinal dos receptores da insulina, como as proteínas cinases ativadas por mitógeno (*p38 mitogen-activated protein kinases* - p38MAPK) e a cinase c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal Kinase* – JNK), e diminuição na fosforilação da proteína cinase B, conhecida como Akt, e do substrato para o receptor de insulina 1 (*insulin receptor substrate 1* - IRS-1), com o cultivo destas células em 10 e 20 mg/l de Malathion por 18 horas (SHRESTHA *et al.*, 2018).

Além das linhagens de células da musculatura esquelética, os efeitos do Malathion também foram avaliados sobre células hepáticas. Utilizando células de carcinoma hepático (linhagem HepG2), foi demonstrado que o tratamento com concentrações de 6, 12, 18 e 24 mM de Malathion em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO), por 48 horas, levou ao aumento na viabilidade celular na concentração mais baixa enquanto causou efeito oposto nas outras concentrações. Em todas as concentrações utilizadas, foi identificado peroxidação lipídica e dano ao DNA de forma concentração-dependente (MOORE; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2009), explicando assim os efeitos hepatotóxicos e relacionando com as alterações metabólicas observadas nos modelos *in vivo*.

Linhagens de células neurais são também bastante utilizadas para a compreensão dos efeitos tóxicos do Malathion, uma vez que o tecido neural é bastante susceptível à sua ação. O tratamento de células de neuroblastoma de camundongos (linhagem N2a) com este pesticida em concentrações de 0,25 a 1 mM por períodos de incubação de 4, 8 e 12 horas, levou a uma redução na viabilidade celular a partir da concentração de 1 mM, com a liberação da enzima lactato

desidrogenase (*lactate dehydrogenase* – LDH) aumentando a partir da mesma concentração. Paralelamente, foi observado que concentrações menores do composto (0,25 mM) levaram as células a estágios iniciais da apoptose, enquanto concentrações mais elevadas (0,5 e 1 mM) conduziram as células a estágios tardios de apoptose (VENKATESAN *et al.*, 2017).

A citotoxicidade sobre linhagens neurais de tumor hipofisário também foi relatada. Foi visto que o Malathion estimula a proliferação celular dependente dos hormônios tireoideanos em células de tumor hipofisário (linhagem GH3), utilizando concentrações de 10 μ M a 50 μ M. Além disso, os efeitos citotóxicos foram testados, através da liberação da enzima LDH, e observados apenas na concentração mais elevada 50 μ M (GHISARI *et al.*, 2015).

Além das linhagens celulares supracitadas, um importante tipo celular afetado pelo Malathion são as células do sistema imunológico. Um importante efeito observado com o tratamento *in vitro* deste pesticida em linhagens de células imunológicas é a degranulação, como observado em células de leucemia basofílica de ratos (*rat basophilic leukemia* – RBL-1) tratadas com 1 mg/mL do Malathion por 1 hora (RODGERS; ELLEFSON, 1992). Também foi demonstrada a liberação da histamina pelas células RBL-1 em resposta ao tratamento com diferentes concentrações do malaoxon (0,1, 1 e 10 μ g/mL) por 1 e 4 horas. Neste trabalho foi visto que o Malathion não conseguiu induzir a mesma resposta nas mesmas concentrações e tempos de incubação, contudo ao ser incubado por 4 horas, a degranulação pode ser observada, sugerindo que as células estariam metabolizando o Malathion (XIANG; RODGERS, 1997).

Adicionalmente, os efeitos deste pesticida sobre linfócitos também foram testados *in vitro*. Foi constatado que o Malathion, mesmo em doses muito baixas (10 μ g/mL) afeta a síntese de RNA em cultura primária de linfócitos humanos (WISZKOWSKA *et al.*, 1986), além de já terem sido observado o seu potencial mutagênico em linfócitos T humanos, incubados com Malathion nas concentrações de 50, 450 e 600 μ g/mL por 5-8 dias (PLUTH *et al.*, 1996). Além destes, a incubação de linfócitos primários com o Malathion nas concentrações de 100 e 150 μ g/mL por 24 horas, levaram à redução na viabilidade celular, além de induzir um prejuízo no *status redox* celular (OLAKKARAN *et al.*, 2020). Dessa maneira, é evidente que o Malathion exerce citotoxicidade principalmente através do aumento no estresse

oxidativo, alteração do *status redox* celular, levando à diminuição da viabilidade celular. Contudo, os efeitos deste relevante composto sobre as ilhotas pancreáticas e as células β pancreáticas ainda é pouco investigado, apesar de a correlação da exposição a este pesticida com a incidência do DM já ser relatada. Assim, o presente trabalho se baseou na hipótese de que o tratamento *ex vivo* com o Malathion, poderia conduzir as ilhotas pancreáticas a um estado pró-apoptótico, levando a uma redução na viabilidade celular, prejudicando assim a função destes micro-órgãos.

Tabela 4 – Efeitos *in vitro* observados com a incubação do Malathion em diferentes tipos celulares

Autores/Ano	Linhagem Celular	Tempo de Incubação	Concentração Utilizada	Principais Desfechos
SHRESTHA <i>et al.</i> , 2018	Mioblastos L6	18 horas	10 e 20 mg/L	Aumento na fosforilação da p38MAPK e JNK Diminuição na fosforilação da Akt e IRS1
MOORE; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2009	Hepatócito HepG2	48 horas	6, 12, 18 e 24 mM	Aumento na viabilidade celular (6 mM), peroxidação lipídica (6, 12 e 18 mM), e dano ao DNA (24 mM) Diminuição na viabilidade celular (12, 18 e 24 mM)
VENKATESAN <i>et al.</i> , 2017	Neuroblastoma N2a	4, 8 e 12 horas	0,25, 0,5 e 1 mM	Redução na viabilidade celular (1 mM) Aumento na liberação da LDH (1 mM), razão de Bax:Bcl-2 (concentração-dependente, 8 h), Caspase 3 clivada (0,5 e 1 mM, 8 h)
GHISARI <i>et al.</i> , 2015	Tumor hipofisiário GH3	4 horas	10 a 50 μ M	Aumento na proliferação celular dependente de T3 (10 a 50 μ M) Aumento na liberação de

				LDH (50 μ M)
RODGERS; ELLEFSON, 1992	Basófilos de ratos RBL-1	1 hora	32, 62, 125 e 250 μ g/mL	Baixa liberação de β - hexosaminidase (malathion e parathion) e alta liberação (paraoxon)
XIANG; RODGERS, 1997	Basófilos de ratos RBL-1	1 e 4 horas	0,1, 1 e 10 μ g/mL	1 hora: Aumento na liberação da histamina (malaoxon e isomalathion) não observado no malathion 4 horas: Aumento na liberação da histamina (malathion)
WISZKOWSKA <i>et al.</i> , 1986	Linfócitos humanos primários	1 hora	10, 40 e 70 μ g/mL	Diminuição na atividade de RNA polimerases a até 30% (70 μ g/mL)
PLUTH <i>et al.</i> , 1996	Linfócitos T humanos	5 a 8 dias	30, 50, 80, 150, 300, 450 e 600 μ g/mL	Aumento na frequência de mutações (50, 450 e 600 μ g/mL)
OLAKKARAN <i>et al.</i> , 2020	Linfócitos primários humanos	24 horas	50, 100 e 150 μ g/mL	Redução na viabilidade celular (100 e 150 μ g/mL) Aumento na formação de MDA (100 e 150 μ g/mL) Aumento na atividade da SOD e CAT (100 μ g/mL) Redução na atividade da SOD (150 μ g/mL) Aumento na atividade da GST (100 e 150 μ g/mL) Redução na atividade da GSH (50 a 150 μ g/mL)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou avaliar se a exposição aguda ao Malathion afeta a viabilidade e a integridade das ilhotas pancreáticas de ratos, em especial das células β pancreáticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Por meio da exposição aguda ao Malathion e em três concentrações distintas visamos os seguintes parâmetros:

- i) Viabilidade celular das ilhotas pancreáticas;
- ii) Ultraestrutura das células β pancreáticas;
- iii) Fenótipo externo das ilhotas pancreáticas;
- iv) Conteúdo de diferentes proteínas da maquinaria de morte celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC), no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), lotados nos Departamentos de Ciências Fisiológicas e de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas (CCB), bem como o Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UFSC (protocolo 9212220420). Todos os procedimentos desse estudo foram realizados 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 (CONCEA), e pelas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA de 2016. As metodologias experimentais (manipulação e

eutanásia) seguiram as normas éticas brasileiras (Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016), bem como os 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).

3.3 ANIMAIS, MANEJO E MANUTENÇÃO

Foram utilizados ratos Wistar (machos) provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram recebidos com cerca de 40 dias de idade pelo Biotério Central da UFSC e subsequentemente mantidos no Biotério Setorial de Ratos do LIDoC em condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro-escuro 12h) com acesso à água e ração fornecida pela UFSC *ad libitum* até atingirem 3 meses de idade.

Nenhum procedimento *in vivo* foi realizado em nenhum animal neste projeto, exceto para a manutenção que envolve a limpeza das caixas. Os animais foram alojados em caixas plásticas de polipropileno, específicas para ratos, numa densidade de 5 animais por caixa. Na ocorrência de casos em que a condição clínica de algum animal indicasse a necessidade de intervenção para conter a dor ou o estresse, foram consultados o orientador e/ou médica veterinária Dra. Luciana Aparecida Horonato do Centro de Ciências Biológicas (CCB-UFSC) para avaliar a necessidade de administração de algum medicamento ou eutanásia humanitária. Nos casos pertinentes, os animais foram removidos do projeto e eutanasiados (human endpoint) através da inalação do anestésico halotano como preconizado em ENV/JM/MONO (2000) da OECD “Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation” seguido por decapitação em guilhotina.

Os animais foram eutanasiados de acordo com as normativas do CONCEA supracitadas por meio de inalação de halotano seguido por decapitação em guilhotina.

3.4 ISOLAMENTO DE ILHOTAS

As ilhotas pancreáticas foram extraídas pelo método de digestão com colagenase, e coletadas por aspiração em estereomicroscópio. Para isso, os animais foram submetidos à eutanásia por decaptação em guilhotina após a sua anestesia completa com o uso do halotano, administrado por inalação em dessecador. Após isso, foi realizada uma incisão abdominal externa, seguida da oclusão da extremidade duodenal do ducto biliar. Foi então inserido um cateter na parte proximal do ducto para perfusão com 10 mL de tampão de Hank (136,8 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 1,3 mM de CaCl₂.2H₂O, 0,8 mM de MgSO₄.7H₂O, 0,4 mM de Na₂HPO₄.2H₂O, 0,4 mM de KH₂PO₄, 4,2 mM de NaHCO₃, pH 7,4), contendo colagenase (0,8 µg/mL) de *Clostridium histolyticum* proveniente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Após perfundido, o pâncreas foi cuidadosamente dissecado, cortado e transferido para um tubo tipo falcon de 15 mL para incubação em banho maria a 37°C por 22 minutos, para digestão da porção exócrina. A digestão completa foi obtida com agitação vigorosa do tubo, para obtenção de uma solução de viscosidade homogênea. A solução obtida foi então filtrada com o auxílio de uma peneira de aço inoxidável, para remoção de estruturas não digeridas, transferida para um becker, e diluída com solução de Hank (glicose 2,8 mM) até um volume 40-80 mL. A solução com ilhotas foi lavada 3 vezes com solução de Hank (glicose 2,8 mM), garantindo a remoção da colagenase e interrupção da digestão enzimática (CROSS *et al.*, 2012) e, por fim, as ilhotas foram coletadas individualmente em placas de Petri com fundo preto, contendo 15 mL de solução de Hank (glicose 2,8 mM) e albumina (3 mg/mL), sob auxílio de uma lupa e pipeta de vidro estirada. Finalmente, as ilhotas (500-1000 por animal) foram submetidas aos procedimentos experimentais seguintes.

3.5 INCUBAÇÃO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS

Após o isolamento das ilhotas pancreáticas, o *pool* de ilhotas coletado de cada animal foi dividido entre os diferentes grupos experimentais propostos para a incubação com o Malathion (Malathion 1000 EC, Cheminova, Lemvig, Dinamarca). As ilhotas foram então adicionadas a placas de petri para cultura celular, o excesso de solução de Hank foi cuidadosamente removido à luz do estereomicroscópio, e a solução para tratamento foi adicionada aos respectivos grupos. As soluções de tratamento consistiram na diluição das soluções de Malathion em DMSO 1%,

seguida da adição das soluções de Malathion + DMSO 1% em solução de Krebs (115 mM de NaCl, 10 mM de NaHCO₃, 1,5 M de HEPES, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl₂*6H₂O, 2,5 mM de CaCl₂*2H₂O) para atingir as molaridades finais desejadas para cada grupo. Para os grupos controle com incubação de 1 hora (CTL) e 3 horas (C3h), a solução de tratamento consistia em 7 mL de solução de Krebs e DMSO 1%. Para os grupos incubados com a menor concentração, em 1 hora (M1_0,1) e 3 hora (M3_0,1), as placas foram preenchidas com 7 mL de solução de contendo 1% de DMSO e 0,1 mM de Malathion. Os grupos incubados na concentração intermediária, em 1 hora (M1_0,5) e 3 hora (M3_0,5), foram tratados com o mesmo volume de solução de Krebs contendo 1% de DMSO e 0,5 mM de Malathion. Por fim, os grupos incubados com a maior concentração foram tratados no mesmo volume de solução de Krebs contendo 1% de DMSO e 1 mM de Malathion, por 1 hora (M1_1,0) e 3 horas (M3_1,0). As placas foram incubadas em aparato suspenso em banho maria, com perfusão de mistura carbogênica (95% de O₂ + 5% de CO₂), e após os períodos de incubação, as ilhotas foram removidas das placas, e lavadas 3 vezes com solução de Krebs para o procedimento dos protocolos seguintes.

As concentrações utilizadas para incubação das ilhotas foram baseadas em estudos anteriores que utilizadas o mesmo modelo *ex vivo*, em que alterações funcionais puderam ser observadas como resultado da exposição ao composto, sobretudo sobre a GSIS (VOSOUGH-GHANBARI *et al.*, 2007).

3.6 VIABILIDADE CELULAR: COLORAÇÃO COM HO 342 E IP

A viabilidade celular foi avaliada através da incubação das ilhotas recém coletadas, após seus respectivos tratamentos, com os corantes de DNA Hoechst 33342 (HO) e Iodeto de Propídeo (IP) e visualizados por microscopia confocal, como descrito anteriormente (ABDELLI *et al.*, 2007; HOORENS *et al.*, 1996). Para isso agregados de cerca de 300 ilhotas foram incubados com solução de Hank contendo 20 µg/ml de HO e 10 µg/ml de IP, por 10 minutos a 37°C. Em seguida, as ilhotas foram fixadas por 15 minutos com formalina 10% tamponada (90 mL de H₂O_d, 10 mL de formaldeído, 0,045 M de Na₂HPO₄, 0,033 M de NaH₂PO₄, pH 6,8), e plotadas nos poços de placas para microscópio confocal. O HO é um corante de DNA que permeia membranas íntegras ou danificadas, colorindo o núcleo das células vivas

em azul, enquanto o IP é um corante de DNA polar, conseguindo adentrar apenas células com integridade da membrana afetada, colorindo o núcleo em vermelho.

Após a fixação em temperatura ambiente, as ilhotas foram examinadas através de um microscópio confocal (Leica DMI6000 B Microscope) com excitação de laser UV em 405 nm para o HO e diodo em 514 nm para o IP. Células viáveis ou necróticas foram identificadas pela presença de coloração do núcleo em azul, para viáveis, ou roxa e vermelha, indicando a presença do HO ou do HO + IP, respectivamente. Foram coletadas cerca de 15 imagens de diferentes posições no eixo z em cada ilhota, de forma a capturar seções desde a periferia da ilhota até o seu centro (onde a penetração dos marcadores é baixa). Para cada grupo, 15 ilhotas foram fotografadas, exceto pelo grupo CTL, onde apenas 10 ilhotas foram fotografadas.

Para calcular o número de células viáveis e necróticas, foram selecionadas três imagens de diferentes eixos z, evitando imagens em sequência, de forma a não contar a mesma célula em cortes diferentes. A contagem foi então realizada com o auxílio do *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, USA), considerando apenas os núcleos com contorno nuclear evidente, e realizada por 2 pesquisadores diferentes cegados. O total de células viáveis e necróticas foi contado para cada ilhota, e porcentagem de morte celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{morte celular (\%)} = \left(\frac{\text{núcleos marcados com IP} \times 100}{\text{total de núcleos}} \right)$$

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para visualizar o fenótipo das células β pancreáticas, *pools* de ilhotas foram fixados em *ependorfs* com fixador de *Karnovsky* (KARNOVSKY, 1965) (2,5% glutaraldeído, 0,1 M Cacodilato de Sódio, 2% paraformaldeído) por 12 horas a 4°C. Após fixação, as amostras foram lavadas com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M três vezes, por 15 minutos, e pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M por 2 hora em temperatura ambiente. Após a pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M, três vezes por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona concentrações crescentes de acetona, partindo da acetona a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, por 15 minutos de incubação em cada concentração. As ilhotas foram subsequentemente infiltradas com resina *Spurr* e acetona, em proporções de 1:3 (12 h), 1:2 (12 h), 1:1

(24 h), 2:1 (24 h), 3:1 (24 h) e resina pura (24 h). Os blocos foram então incubados em estufa a 70°C por 48 horas, para endurecimento da resina. Os blocos foram levados para o LCME para a realização dos cortes ultrafinos (50-75 µm) em lâminas de vidro, os quais foram coletados em grades de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS, 1963) para visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

3.7.1 Microscopia eletrônica de varredura

O processamento das amostras para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), seguiu um protocolo similar àquele realizado para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), seguindo até o momento da desidratação das amostras. Após esta etapa, as ilhotas foram alocadas em *Stubs* com fita de carbono, e desidratadas com o hexametildisilazano (HMDS), e processadas para visualização no microscópio eletrônico de varredura.

3.8 WESTERN BLOT

A abundância de proteínas relacionadas à maquinaria de morte celular foi verificada com a realização de ensaios de *western blot*. Para isso, *pools* de ilhotas foram homogeneizados com o auxílio de aparelho homogeneizador de amostras com 3 pulsos de 15 segundos, além de um sonicador por 30 segundos em 50% da potência máxima, em tampão RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 140 mM de NaCl, 1 mM PMSF). A concentração de proteínas no homogenato foi determinada por ensaio de Bradford.

Após a determinação, alíquotas de 40 µg de proteínas foram incubadas por 8 min a 70°C com 50% do volume total com o tampão de amostra de Laemmli 2x concentrado (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8, 26,3% glicerol, 2,1% SDS, 0,01% azul de bromofenol). As amostras foram então separadas por eletroforese em SDS-PAGE 12%, por 20 minutos a 60 V, para empacotamento, e cerca de 2 horas a 140 V, para corrida. Após a separação por eletroforese, os géis foram levados a um aparato para transferência elétrica por 2 h a 100 V na presença de 20% de metanol, de maneira a transferir as proteínas contidas para membranas de nitrocelulose.

A eficiência da transferência foi testada por coloração com *Ponceau S*. As membranas foram então bloqueadas com solução de 5% de leite desnatado em

TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 2 horas em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas tampão de lavagem TBST (3 x 5 min). Após o bloqueio as membranas foram incubadas com os anticorpos primários contra Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology) e Caspase 3 (Cell Signalling; Santa Cruz Biotechnology) em TBST, acrescido de 3% de leite desnatado, por 12 horas a 4°C. As membranas foram então lavadas com TBST (3 x 5 min) e incubadas com os anticorpos secundários anti-rabbit conjugados à peroxidase em TBST, acrescido de 1% de leite desnatado, em temperatura ambiente e, novamente, lavadas. A conjugação dos anticorpos foi detectada por um substrato de quimiluminescência SuperSignal® West Pico (Pierce, Rockford, Ill) e por fim reveladas em fotodocumentador (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e analisadas em *software* específico (*ImageJ*, NIH, Bethesda, MD, USA). Os resultados de quantificação proteica podem ser vistos no Apêndice B.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism versão 8.01 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos como média \pm D.P (desvio padrão) para dados paramétricos ou mediana e interquartis para dados não paramétricos. A simetria dos dados foi testada pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, e D'Agostino e Pearson. Comparações múltiplas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA de 1 via), seguido do teste pós *hoc* de Tukey. As análises de correlação foram feitas por regressão linear. Em todos os testes, foi adotado 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 INCUBAÇÃO COM MALATHION INDUZ MORTE CELULAR EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

Durante a execução do presente trabalho, buscamos avaliar inicialmente a viabilidade celular nas ilhotas pancreáticas isoladas de rato, frente ao tratamento com o Malathion. Através do ensaio de viabilidade celular por microscopia confocal, foi possível visualizar um aumento na fluorescência do IP em resposta a incubação com o Malathion de forma dose-dependente (Figura 5A). Como pode ser observado através das marcações com HO e IP (Figura 5A) e pela porcentagem de morte celular calculada (Figura 5B), o tratamento das ilhotas com o Malathion por 1 hora não causou alterações significativas na sobrevivência celular nas ilhotas expostas à concentração de 0,1 mM, quando comparadas ao grupo controle, tratado apenas com o veículo. Todavia, quando analisamos as ilhotas incubadas com 0,5 mM e 1 mM de Malathion, foi encontrado maior número de células em processo de morte celular (Figura 5A-setas e Fig. 5B). A relação concentração-resposta na porcentagem de morte celular induzida pelo Malathion, contudo, analisada pelo teste de correlação por regressão linear, relatou uma associação moderada entre as concentrações utilizadas e a porcentagem de morte celular nas ilhotas analisadas ($r^2=42\%$) (Figura 5C).

Pools de ilhotas pancreáticas foram também isoladas e tratadas com as mesmas concentrações pelo período de 3 horas. Contudo, artefatos de técnica foram percebidos na captura das imagens, inviabilizando a contagem das ilhotas tratadas por este período (Apêndice A). Por este motivo, as análises seguintes foram realizadas apenas utilizando os grupos incubados pelo período de 1 hora.

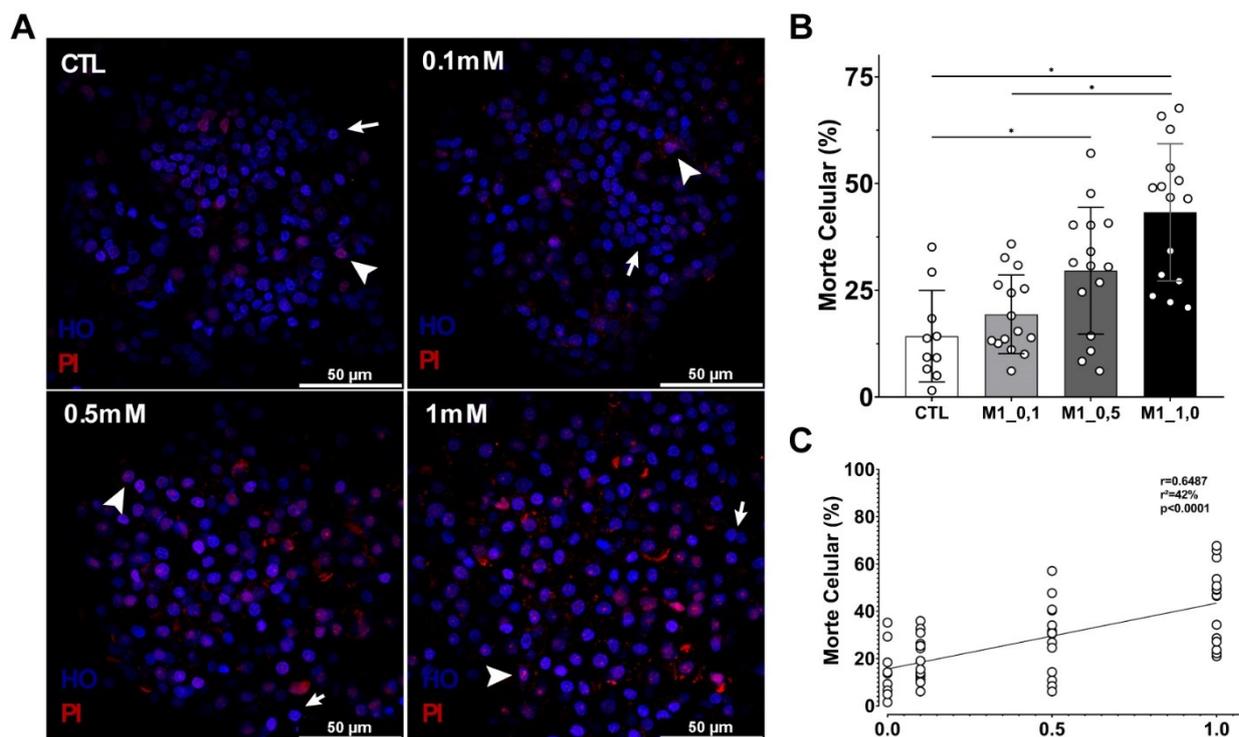


Figura 5 - Citotoxicidade induzida em ilhotas pancreáticas isoladas após a incubação com o Malathion

Legenda: Ilhotas pancreáticas isoladas de ratos incubadas com veículo (CTL) ou diferentes concentrações de Malathion (0.1 mM, 0.5 mM ou 1 mM). (A) Imagens obtidas através de microscópio confocal (x63). Setas representam núcleos considerados viáveis, e pontas de seta representam núcleos considerados necróticos. (B) Porcentagem de núcleos necróticos ($\frac{\text{núcleos marcados com PI} \times 100}{\text{total de núcleos no campo}}$) identificados nas ilhotas analisadas. (C) Associação entre a concentração utilizada na incubação e porcentagem de morte celular observada de acordo com os tratamentos realizados. A associação foi analisada através da regressão linear das médias de morte celular (% de núcleos necróticos) das ilhotas pancreáticas individuais de cada grupo. A porcentagem de núcleos necróticos (B) foi analisada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Barras representam média \pm desvio padrão da porcentagem de núcleos contados com 3 campos de eixo z de ilhotas CTL (n=10 ilhotas), e tratadas (n=15 ilhotas), oriundas de 10 ratos. (*) p<0,05 e (***) p<0,0001.

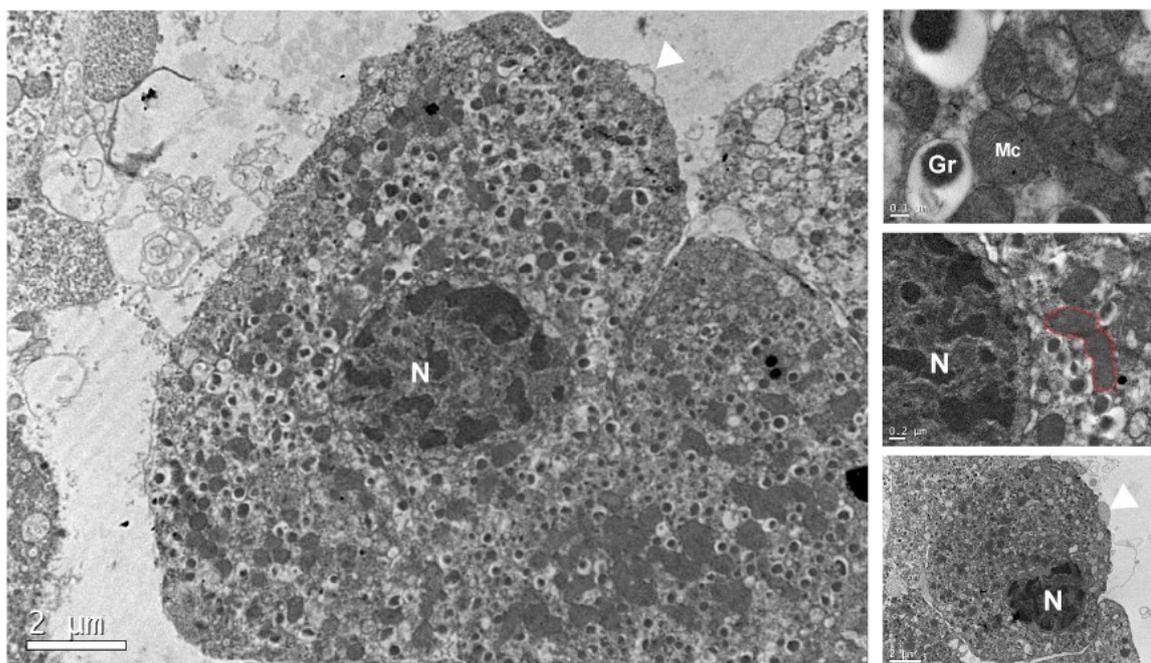
4.2 INCUBAÇÃO COM MALATHION RESULTA EM FENÓTIPO APOPTÓTICO DAS CÉLULAS B PANCREÁTICAS

Com a identificação do efeito citotóxico do Malathion sobre as ilhotas pancreáticas, buscamos avaliar quais alterações ultraestruturais estariam ocorrendo nas células que compõem as ilhotas pancreáticas, especificamente nas células beta pancreáticas, se relacionando com o aumento na morte celular de acordo com a exposição.

As imagens obtidas através da MET revelaram integridade nas células beta analisadas, provenientes das amostras CTL. Foi possível observar a presença de mitocôndrias (Mc) com formato esférico ou alongado, e redes mitocondriais tubulares, bem observados em células beta imortalizadas ou primárias (STILES; SHIRIHAI, 2012).. O núcleo celular apresentou morfologia íntegra (N), com evidente separação entre heterocromatina e eucromatina, integridade da membrana plasmática e morfologia celular geral preservadas. Contudo, foi percebido a presença de protuberâncias na membrana plasmática.

Figura 6 - Alterações ultraestruturais em células β pancreáticas decorrentes do tratamento com veículo

Legenda: Ultraestrutura de células β pancreáticas após o isolamento das ilhotas e tratamento por 1 hora com o veículo. (Gr) indica os grânulos de insulina característicos de células β , (Mc) indica



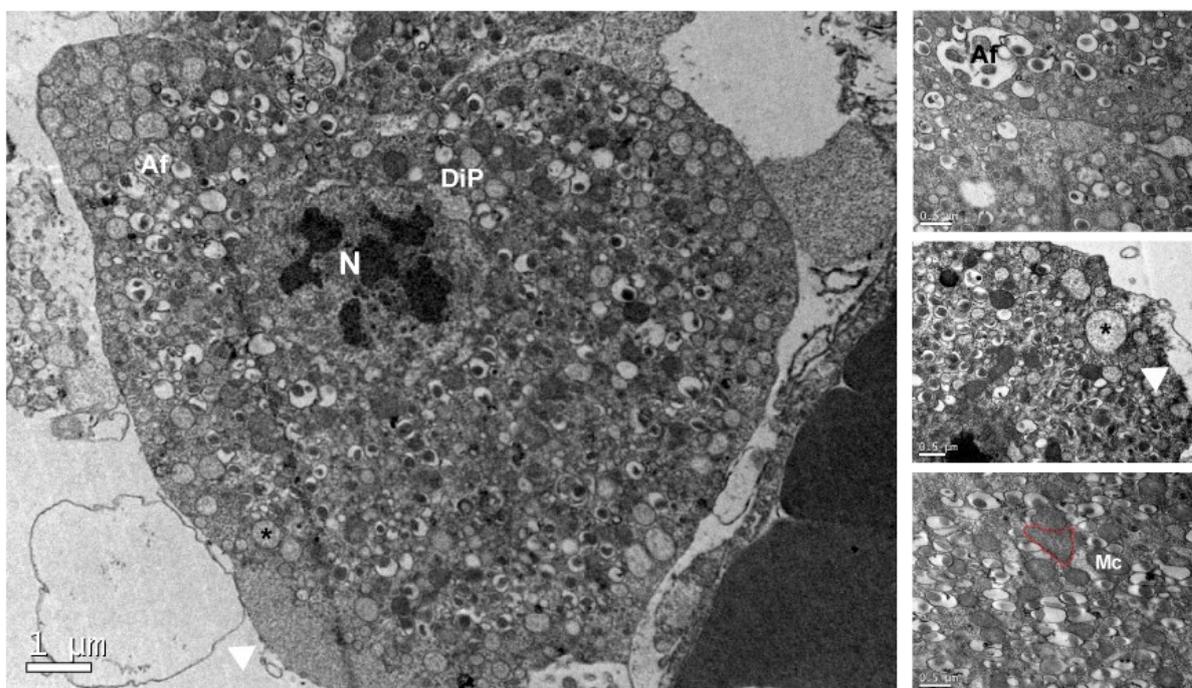
mitocôndrias e (N) refere-se ao núcleo íntegro, pontas de seda indicam bolhas de membrana e rede mitocondrial destacada em linhas tracejadas vermelhas.

Quando analisadas as imagens capturadas de células β nas amostras do grupo M1_0,1 foi detectado a formação de estruturas autofágicas, contudo a integridade celular geral foi mantida (Figura 7 e inserts). As células deste grupo apresentaram um aumento na vacuolização, demonstrando estruturas como autofagossomos (Af), caracterizados pela forma de vacúolos com organelas e estruturas intracelulares em seu interior, bem como microvesículas. Apesar da membrana plasmática se apresentarem íntegras, a formação de bolhas de membrana se tornou evidente, com bolhas tendo um aparente maior tamanho. As

bolhas de membrana podem ser decorrentes de eventos de migração celular ou do início de processos apoptóticos (AOKI *et al.*, 2020).

As mitocôndrias (Mc) foram identificadas em compatibilidade estrutural àquelas do grupo CTL, com formato arredondado ou cilíndrico. Todavia, em alguns casos foi possível perceber mitocôndrias dilatadas e sem matriz visível, sugerindo permeabilização da membrana externa mitocondrial e o possível extravasamento de proteínas da maquinaria apoptótica (JAVADOV; CHAPA-DUBOCQ; MAKAROV, 2018; RASOLA; BERNARDI, 2011), reforçado também pela identificação de dilatações no espaço perinuclear (DiP).

Figura 7 - Formação de estruturas autofágicas decorrente da incubação com a menor concentração do Malathion



Legenda: Ultraestrutura de células β pancreáticas após a incubação com 0,1 mM de Malathion e DMSO 1% por 1 hora, revelando edema celular, vacuolização e formação de estruturas autofágicas. (Af) refere-se a autofagossomos, (DiP) indica dilatações do espaço perinuclear, (N) representa o núcleo íntegro, (Mc) indica mitocôndrias, pontas de seta indicam bolhas de membrana, mitocôndria dilatada destacada em linhas tracejadas vermelhas e (*) se refere a vacúolos.

O desencadeamento do processo de morte celular tornou-se mais evidente quando analisadas as células pertencentes ao grupo M1_0,5. Neste grupo, as células beta apresentaram colapso das estruturas intracelulares, degeneração nuclear (NecN) e perda da integridade da membrana plasmática (Figura 8 e inserts). Foi identificado a condensação da cromatina e degeneração do envelope nuclear, demonstrando núcleos em cariorrexe e picnose, característicos de morte celular

necrótica ou apoptótica. A vacuolização celular demonstrou-se mais intensa, com a formação de macrovacúolos (Figura 8 e inserts). As células também apresentaram formação de bolhas de membrana, neste caso exibindo a perda da integridade da membrana e extravasamento dos conteúdos celulares, indicados pelas pontas de seta na Figura 8. As mitocôndrias (Mc) nas células deste grupo apresentaram-se apenas em morfologia esférica, sugerindo fissão mitocondrial (MOLINA *et al.*, 2009), como observado nas alterações de dinâmica mitocondrial entre ilhotas de animais diabéticos e não-diabéticos (STILES; SHIRIHAI, 2012).

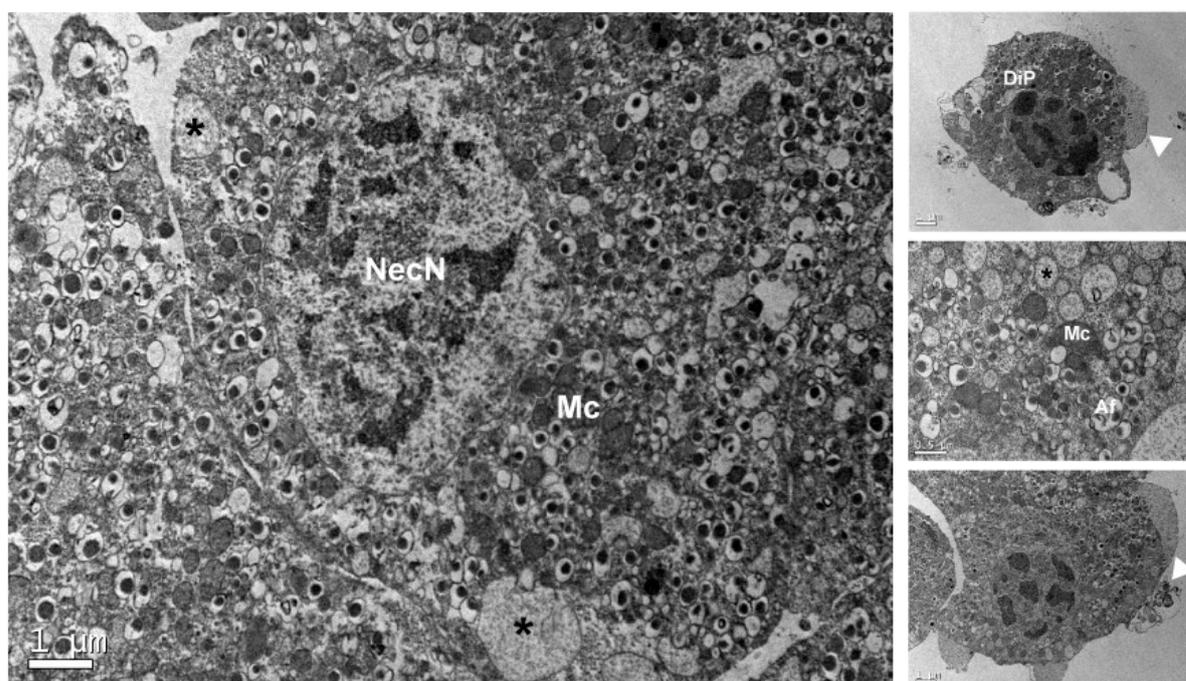


Figura 8 - Morte celular decorrente do tratamento com Malathion

Legenda: Ultraestrutura de células β pancreáticas após a incubação com 0,5 mM de Malathion e DMSO 1% por 1 hora, demonstrando perda da integridade da membrana plasmática, aumento na formação de vacúolos e autofagossomos, cariólise e cariorrexe, e degeneração das bolhas de membrana plasmática. (Af) refere-se a autofagossomos, (DiP) indica dilatações do espaço perinuclear, (Mc) indica mitocôndrias, (NecN) representa o núcleo necrótico, pontas de seta indicam bolhas de membrana plasmática e (*) se refere a vacúolos.

Por fim, as células tratadas com a maior concentração do Malathion, pertencentes ao grupo M1_1,0, apresentaram o maior grau de degeneração e morte celular (Figura 9 e inserts). Nestas células, as membranas plasmáticas se degeneraram, com extravasamento dos conteúdos celulares e presença de grande número de vesículas exocíticas extracelulares (anotado com # na Figura 9). Os núcleos apresentaram-se em picnose e cariorrexe (NecN). Bolhas de membrana

extensas puderam ser percebidas, bem como extensa vacuolização (*) em células que ainda não se apresentaram lisadas.

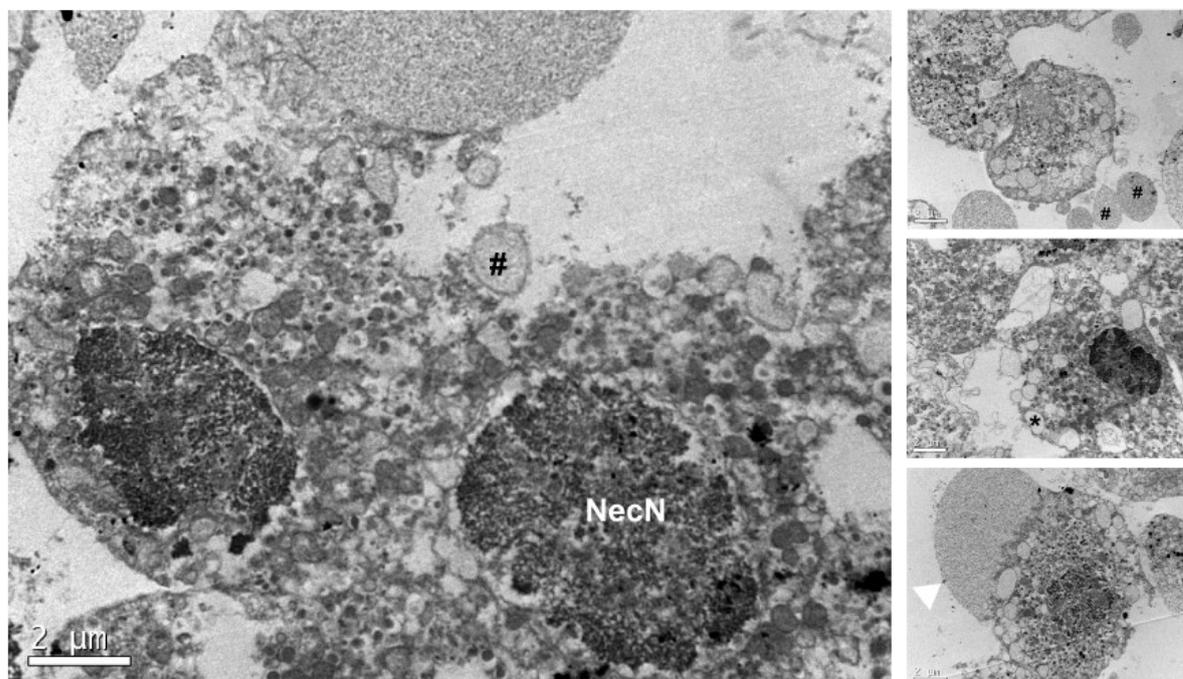


Figura 9 - Necrose de células β pancreáticas após o tratamento com Malathion

Legenda: Ultraestrutura de células β pancreáticas após a incubação com 1 mM de Malathion e DMSO 1% por 1 hora, exibindo degeneração celular intensa com perda da integridade da membrana plasmática, extensa vacuolização, cariorrexe, bolhas de membrana plasmática, e grande número de vesículas extracelulares. (NecN) representa o núcleo necrótico, pontas de seta indicam bolhas de membrana plasmática, (*) se refere a vacúolos e (#) se refere a vesículas exocíticas extracelulares.

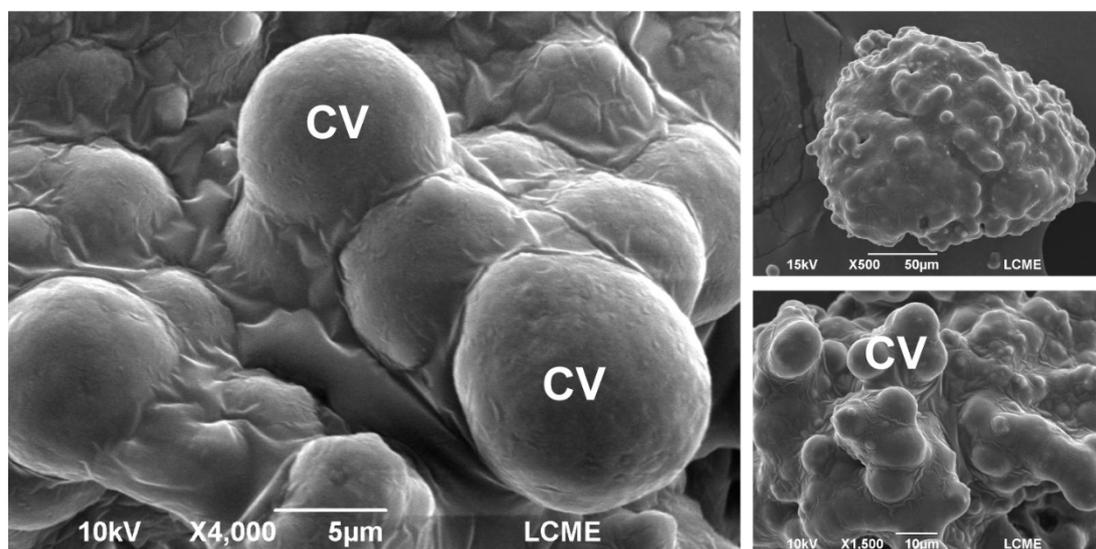
4.3 MALATHION CAUSA PREJUÍZOS NA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Após a realização dos testes para verificar a ação do Malathion sobre a viabilidade e integridade celular em ilhotas pancreáticas, e a obtenção das imagens pela MET, buscamos verificar quais alterações poderiam ocorrer nas ilhotas pancreáticas com o tratamento, amplificando a visualização por meio da microscopia eletrônica de varredura, de maneira a melhor relacionar os dados obtidos até este ponto.

As imagens capturadas revelaram ilhotas com estrutura tridimensional íntegra, especialmente nos grupos CTL e M1_0,1 (Figura 10 e inserts). Nestes grupos foi possível identificar um formato arredondado e a integridade da cápsula (CV) de tecido conjuntivo fibroso que as envolve, bem como um elevado número de células íntegras com poucas células lisadas (CL) nas várias ilhotas coletadas. No caso das

ilhas nos grupos M1_0,5 e M1_1,0, foi notável a degeneração da cápsula de tecido conjuntivo das ilhotas, bem como a presença de várias células lisadas (CL).

Grupo CTL



Grupos Tratados com Malathion

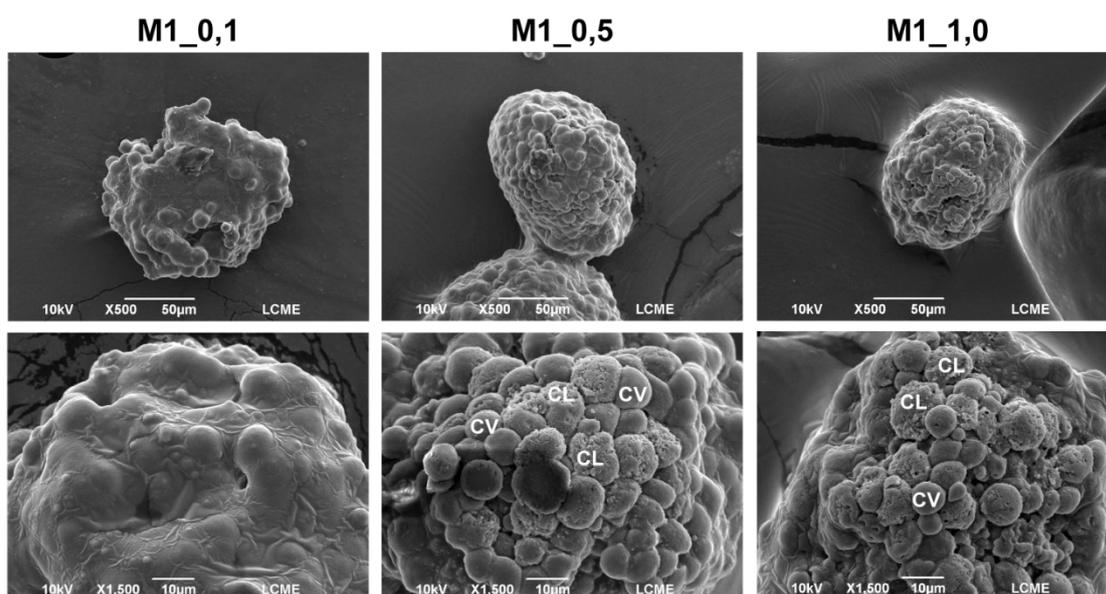


Figura 10 - Malathion leva a alterações morfológicas extracelulares em ilhotas pancreáticas

Legenda: Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando ilhotas pancreáticas isoladas, após a incubação com o Malathion. Grupos e escalas estão destacados na imagem. (CL) indica células lisadas, (CV) indica células vivas, (CTL) refere-se ao grupo controle, (M1_0,1) refere-se ao grupo incubado com Malathion 0,1 mM, (M1_0,5) refere-se ao grupo incubado com Malathion 0,5 mM e (M1_1,0) refere-se ao grupo incubado com Malathion 1 mM.

Ao serem visualizadas em maior aumento, as ilhotas CTL e M1_0,1 exibiram presença de protuberâncias na membrana plasmática, classificadas como bolhas de

membrana (Bm), com maior sutileza no grupo CTL e mais proeminentes no grupo M1_0,1 (Figura 11), corroborando com a presença dessas estruturas nas imagens obtidas pela MET nos respectivos grupos, como descrito em 4.2. Contudo, as ilhotas dos grupos M1_0,5 e M1_1,0 apresentaram muito comprometimento da integridade da membrana plasmática e alto grau de lise celular.

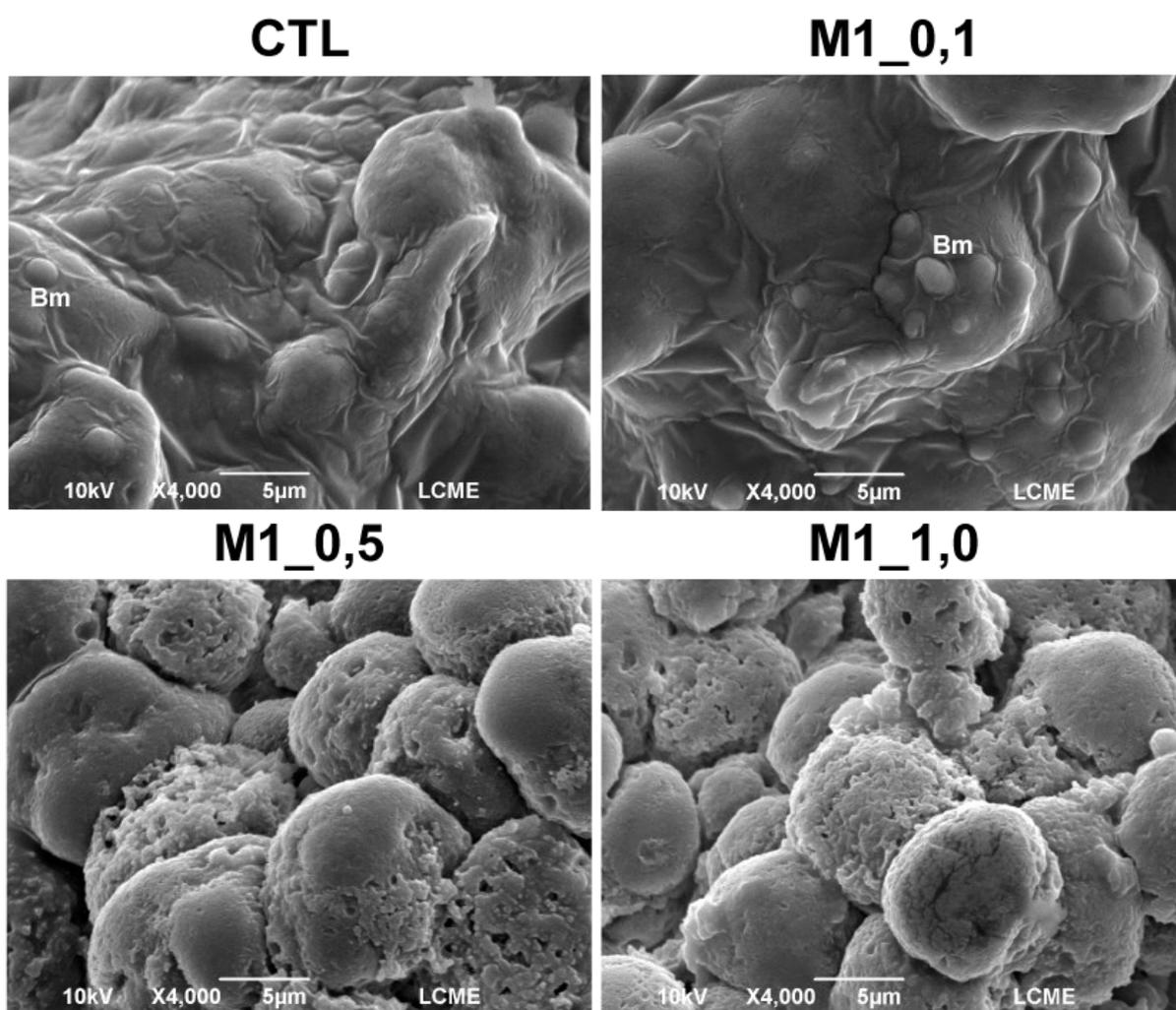


Figura 11 - A visão extracelular revela alterações ultraestruturais observadas com o tratamento com Malathion em ilhotas pancreáticas

Legenda: Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelando a presença de bolhas de membrana plasmática, e perda da integridade da cápsula da ilhota pancreática e da membrana plasmática nos grupos tratados. (Bm) indica bolhas de membrana plasmática, (CTL) refere-se ao grupo controle, (M1_0,1) refere-se ao grupo incubado com Malathion 0,1 mM, (M1_0,5) refere-se ao grupo incubado com Malathion 0,5 mM e (M1_1,0) refere-se ao grupo incubado com Malathion 1 mM.

5 DISCUSSÃO

O DM é uma doença crônica com incidência global (IDF, 2021). No Brasil, o alto uso de pesticidas (BOMBARDI, 2017) chama a atenção para uma melhor compreensão dos seus efeitos celulares em indivíduos expostos, haja vista que podem ter efeitos como disruptores endócrinos e/ou afetar processos metabólicos (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

Sendo uma das principais unidades funcionais do pâncreas endócrino, as células β pancreáticas apresentam sua função ligada à ativação do metabolismo oxidativo para a síntese do ATP e secreção da insulina. Estas células apresentam elevada capacidade oxidativa, ao passo que exibem baixa expressão de enzimas antioxidantes como a SOD (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996) e a CAT (PULLEN *et al.*, 2010), tornando-as altamente susceptíveis aos agentes oxidativos (GERBER; RUTTER, 2017). Em concordância, os efeitos do Malathion sobre a indução do estresse oxidativo já foram demonstradas anteriormente com a incubação de linfócitos humanos primários tratados com concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes a 0.3 e 0.4 mM, respectivamente, nos quais houve redução na viabilidade celular, sendo relacionada com a diminuição da atividade enzimática das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST (OLAKKARAN *et al.*, 2020). De tal forma, é possível especular que a redução da viabilidade celular observada por meio dos nossos experimentos com HO/IP, em ilhotas incubadas com o Malathion, pode ser o resultado da ação deste pesticida na desregulação do balanço *redox* intracelular, o qual está ligado à capacidade de sobrevivência celular. Todavia, não é possível afirmar com veemência esta constatação, uma vez que não realizamos nenhum teste afim de mensurar a formação de ROS.

Em modelos de tratamento com o Malathion *in vivo*, a indução do estresse oxidativo também foi descrita, relacionada à diminuição nas atividades da SOD, CAT e GST, bem como um aumento na formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica (OUARDI *et al.*, 2019). Como discutido por Ouardi e colaboradores (2019), o estresse oxidativo induzido pelo Malathion, ocasiona a peroxidação lipídica em membranas de importantes estruturas intracelulares, como a membrana plasmática, membrana mitocondrial e retículo endoplasmático. Por meio da peroxidação essas membranas podem se tornar mais permeáveis, causando o aumento das concentrações iônicas intracelulares, principalmente do Ca^{2+} , além de permitir o extravasamento do citocromo C mitocondrial, ativando as vias apoptóticas,

como descrito anteriormente no tratamento de células β com arsênio (LU *et al.*, 2011), um metal reconhecido como disruptor endócrino. Esse mecanismo pode explicar o aumento na morte celular observada em nossos experimentos.

Em nosso trabalho, observamos redução na viabilidade celular de ilhotas pancreáticas nas concentrações de 0.5 e 1 mM, concentrações equivalentes às aquelas encontradas no plasma de indivíduos intoxicados (JADHAV *et al.*, 1992). Entretanto, a incubação com o Malathion na concentração de 0.1 mM não afetou a viabilidade celular. Essa ausência de efeito também foi relatada em células N2a incubadas por 8 horas na presença de 0.1 mM de Malathion (VENKATESAN *et al.*, 2017), sugerindo que nesta concentração os efeitos agudos do Malathion sobre a viabilidade celular são pouco significativos. Tal ausência de efeito foi relatada também em estudos *in vitro* com hepatócitos (HepaRG) incubados com concentrações de malathion de 0,1-0,5 mM por 24 horas (JOSSE *et al.*, 2014).

Ao avaliar os efeitos citotóxicos do malathion devemos nos ater também à relação temporal, uma vez que os períodos de incubação podem revelar efeitos diferentes nas células tratadas, sendo relacionados com a metabolização do Malathion e conversão em seus metabólitos mais reativos, Malaoxon e Isomalathion. Esse fenômeno foi demonstrado num estudo tempo-dependente onde a incubação por 1 hora com 1.2 mM de Malathion não induziu a degranulação de células RBL-1, ao passo que o mesmo tratamento com 0.1 mM de Malaoxon resultou na liberação da histamina. Contudo, a incubação destas células com o Malathion por 4 horas promoveu sua degranulação, sugerindo que as células estariam metabolizando o Malathion em Malaoxon (XIANG; RODGERS, 1997). Este último, por ser mais reativo, mesmo em concentrações menores, como a menor concentração utilizada em nosso trabalho (0.1 mM), foi capaz de reduzir a viabilidade celular de células neurais em um tratamento por 24 horas (RIEGER *et al.*, 2017).

Os efeitos do malathion sobre a viabilidade celular foram reportados anteriormente, sendo apresentados como uma curva de concentração-resposta não monotônica, compreendendo uma característica farmacológica denominada hormese, onde concentrações menores (6 mM) induziram a proliferação celular, ao passo que a elevação das concentrações (12 a 24 mM) incubadas em células HepG2 levou a uma redução concentração-dependente da viabilidade celular. Apesar desta

característica, uma relação forte entre concentração-efeito foi reportada sobre a viabilidade de hepatócitos expostos ao malathion (MOORE; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2009). Dessa forma, a ausência de efeitos sobre a viabilidade celular na concentração de 0,1 mM no nosso trabalho, bem como a correlação moderada ($r^2=42\%$) entre a morte celular e as diferentes concentrações utilizadas, podem ser explicados pelos efeitos distintos do pesticida de acordo com as diferentes concentrações do mesmo. Ademais, o número reduzido de concentrações distintas utilizadas em nossos experimentos, podem ter dificultado a observação de uma relação concentração-efeito mais robusta.

Apesar de promissores os dados acerca de viabilidade observados em nosso trabalho, as concentrações utilizadas se mostram acima daquelas observadas no sangue de animais tratados. Ratos Wistar tratados por 4 semanas com o Malathion por via oral, na dose de 150 mg/kg, tem alcançado concentrações plasmáticas do Malathion entre 0.001 a 0.01 mM. Ainda assim, demonstram aumento no estresse oxidativo no lisado sanguíneo e maiores valores glicêmicos em relação ao animais controle (HOSSEINI; ZARANDI; KARAMI-MOHAJERI, 2021). Contudo, a constatação de maiores concentrações de malathion no fígado e no tecido adiposo, em detrimento ao observado no plasma, por ser uma molécula lipofílica (SALEH *et al.*, 1997), pode sugerir que os órgãos endócrinos sejam alvos para a deposição do Malathion, explicando os efeitos endócrinos mesmo em baixas concentrações plasmáticas. Assim, a menor viabilidade celular nas ilhotas pancreáticas observada nesse trabalho pode decorrer de um aumento no estresse oxidativo mediado pelo Malathion. Contudo, técnicas para avaliar a formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), bem como a peroxidação lipídica, frente a este tratamento precisariam ser realizadas para confirmar esta hipótese. Além disso, uma vez que importantes elementos da toxicidade do Malathion são seus metabólitos e impurezas (DURKIN, 2008), a expressão das principais enzimas microsossomais envolvidas em seu metabolismo (CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4), assim como a detecção de seus diferentes metabólitos poderiam ampliar nosso entendimento de ação deste inseticida sobre as ilhotas pancreáticas.

A partir da constatação do efeito do Malathion sobre a morte celular em ilhotas pancreáticas, buscamos avaliar quais alterações ultraestruturais poderiam ser observadas como resultado deste tratamento, auxiliando assim no entendimento de

como o Malathion reduz a sobrevivência celular neste micro-órgão. Devido à importância das células β pancreáticas na fisiopatologia do DM, imagens de MET foram capturadas visando este tipo celular, para as análises de ultraestrutura. Com isso, conseguimos observar alterações ultraestruturais como resultado do tratamento das ilhotas pancreáticas com o Malathion. Na presença do Malathion na menor concentração (0,1 mM) (Figura 7), a morfologia mitocondrial se apresentou similar à observada nas células de ilhotas tratadas apenas com o veículo (Figura 6). Contudo, nas concentrações mais elevadas (0,5 e 1 mM), as mitocôndrias assumiram formato esférico e hipertrófico (Figura 8 e Figura 9). Alterações ultraestruturais sobre a morfologia mitocondrial em células β frente à exposição à pesticidas já foram documentadas, como no caso do tratamento de ratos Wistar com 2 mg/kg com o endossulfan, um pesticida organoclorado, causando dilatação das mitocôndrias e dissolução da matriz mitocondrial (KALENDER *et al.*, 2004). Em células β pancreáticas de indivíduos diabéticos, a alteração da morfologia mitocondrial já foi demonstrada, as quais assumem um formato arredondado e hipertrófico, relacionado às adaptações intracelulares na tentativa de diminuir a produção de ROS e superar o estresse oxidativo presente nesta patologia (ANELLO *et al.*, 2005). Assim, as alterações na morfologia mitocondrial em células β tratadas com o Malathion podem indicar a indução da disfunção mitocondrial, como relatado anteriormente em ilhotas pancreáticas (POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007) e outros tipos celulares (CHEN *et al.*, 2006; KARAMI-MOHAJERI *et al.*, 2014; VENKATESAN *et al.*, 2017).

Os fenótipos celulares descritos no presente trabalho, como resultado da incubação de ilhotas pancreáticas com o Malathion podem ser paralelos a alterações a nível molecular, que já são descritas na literatura. Uma vez que as mitocôndrias são organelas importantes envolvidas na regulação das vias de morte celular (BOCK; TAIT, 2020), a disfunção mitocondrial pode resultar na ativação de proteases apoptóticas, levando à morte celular. Em outros trabalhos o tratamento agudo com 400 mg/kg do Malathion em ratos levou a uma redução na expressão gênica da proteína de linfoma de células B 2 (*B-cell lymphoma-2* - Bcl-2), além de outra proteína da família Bcl-2, a proteína X associada a Bcl-2 (*Bcl-2 associated protein X* – Bax), em tecido muscular esquelético (KARAMI-MOHAJERI *et al.*, 2014). Além disso, em células de neuroblastoma, a incubação com o Malathion causou um

aumento concentração-dependente, com concentrações similares às utilizadas em nosso trabalho (0,25, 0,5 e 1 mM), na abundância proteica da isoforma ativa da Caspase 3, Bax e citocromo c citoplasmático, além de ter causado uma diminuição nos conteúdos proteicos da Bcl-2 e citocromo c mitocondrial, indicando assim a ativação da apoptose nas células tratadas (VENKATESAN *et al.*, 2017). Com base nesses dados, podemos inferir que o fenótipo mitocondrial aqui descrito, pode ser resultado na ativação de proteínas apoptóticas, explicando também o aumento na morte celular através do tratamento com o Malathion. Todavia, seria necessário quantificar os níveis proteicos de tais proteínas para afirmar se essas alterações moleculares se fazem presente em nosso estudo.

Além da morfologia mitocondrial, o Malathion causou outras alterações ultraestruturais características da indução da autofagia e morte celular. Foi observado nas maiores concentração (0,5 e 1 mM) nas células β pancreáticas a dilatação dos espaços perinucleares. Uma vez que o envelope nuclear é composto por uma membrana interna e uma membrana externa, e o retículo endoplasmático é interconectado com ambas essas membranas. O espaço entre essas membrana pode variar de acordo com o tipo celular (SHIBATA; VOELTZ; RAPOPORT, 2006). Entretanto, a dilatação do espaço perinuclear pode indicar defeitos nas proteínas responsáveis pela manutenção da integridade estrutural destas organelas, como resultado de mutações (ZWERGER *et al.*, 2010), ou através da peroxidação lipídica da membrana nuclear, sendo esta uma característica da morte celular por necroptose (MIYAKE *et al.*, 2020). O estresse de retículo endoplasmático já é conhecido nos estudos envolvendo o tratamento com o Malathion e outros pesticidas organofosforados. Em células β pancreáticas, o Dimetoato, um pesticida organofosforado, resulta em dilatação do retículo endoplasmático no tecido pancreático de animais tratados (HAGAR; AZZA H; FAHMY, 2002). Com relação ao Malathion, a indução da peroxidação lipídica foi descrita como um dos seus mecanismos de toxicidade mediada pela indução do estresse oxidativo (AKHGARI *et al.*, 2003), além causar o aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (CHEN *et al.*, 2006).

As alterações ultraestruturais observadas neste trabalho, somente nas concentrações mais elevadas do Malathion (0,5 e 1 mM) estiveram de acordo com os resultados obtidos com as análises de viabilidade celular por microscopia

confocal, onde apenas nessas concentrações as ilhotas exibiram menor número de células viáveis. Além das alterações em organelas relacionadas com o estresse oxidativo, como as mitocôndrias e retículo endoplasmático, foi observado também um aumento na vacuolização, bem como a formação de bolhas de membrana e autofagossomos, também observadas através das imagens de MET e MEV. Estes eventos celulares são característicos da indução da apoptose mediada pelo Malathion, como discutido anteriormente (CHEN *et al.*, 2006; POURNOURMOHAMMADI *et al.*, 2007; VENKATESAN *et al.*, 2017), também indicada pela presença de células com núcleos picnóticos e necróticos nas células analisadas neste trabalho.

Com isso, observamos que o Malathion é capaz de induzir toxicidade em ilhotas pancreáticas, causando uma redução na viabilidade celular em concentrações de 0,5 mM e 1 mM, em paralelo com alterações ultraestruturais indicativas da ativação da apoptose nas mesmas concentrações. Apesar de inconclusivos os dados moleculares obtidos, a literatura também mostra a ação do Malathion sobre a modulação de proteínas envolvidas na apoptose, conduzindo as células a um estado pró-apoptótico.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que a exposição aguda de ilhotas pancreáticas ao Malathion resulta em menor viabilidade celular que vem acompanhada de alterações ultraestruturais envolvidas com a sobrevivência das células β pancreáticas. Nossos achados reforçam a importância do manejo adequado deste inseticida bem como alerta para os riscos metabólicos dos trabalhadores direta ou indiretamente envolvidos com a aplicação deste pesticida.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI, M.; DONYAVI, M.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SAADAT, M. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 137, n. 4, p. 343–347, 2004a. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.009>.

ABDOLLAHI, M.; DONYAVI, M.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SAADAT, M. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 137, n. 4, p. 343–347, abr. 2004b. DOI 10.1016/j.cca.2004.03.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153204560400050X>.

AGUILAR-GARDUÑO, C.; LACASAÑA, M.; BLANCO-MUÑOZ, J.; RODRÍGUEZ-BARRANCO, M.; HERNÁNDEZ, A. F.; BASSOL, S.; GONZÁLEZ-ALZAGA, B.; CEBRIÁN, M. E. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. **Toxicology**, v. 307, p. 55–65, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.001>.

AKHGARI, M.; ABDOLLAHI, M.; KEBRYAEZADEH, A.; HOSSEINI, R.; SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Human and Experimental Toxicology**, 2003. DOI 10.1191/0960327103ht346oa. Disponível em: <http://www.mendeley.com/catalogue/biochemical-evidence-free-radicalinduced-lipid-peroxidation-mechanism-subchronic-toxicity-malathion>.

AMARAL, M. E. C.; CUNHA, D. A.; ANHÊ, G. F.; UENO, M.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A.; BORDIN, S.; BOSCHERO, A. C. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **Journal of**

Endocrinology, v. 183, n. 3, p. 469–476, 2004. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05547>.

ANELLO, M.; LUPI, R.; SPAMPINATO, D.; PIRO, S.; MASINI, M.; BOGGI, U.; DEL PRATO, S.; RABUAZZO, A. M.; PURRELLO, F.; MARCHETTI, P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 48, n. 2, p. 282–289, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>.

AOKI, K.; SATOI, S.; HARADA, S.; UCHIDA, S.; IWASA, Y.; IKENOUCI, J. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb. **Molecular Biology of the Cell**, v. 31, n. 8, p. 833–844, 2020. <https://doi.org/10.1091/MBC.E19-12-0691>.

ATSDR. **Toxicological Profile for Malathion**. Atlanta: [s. n.], 2003. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp154.pdf>.

BASAK, S.; DAS, M. K.; DUTTARROY, A. K. Plastics derived endocrine-disrupting compounds and their effects on early development. **Birth Defects Research**, v. 112, n. 17, p. 1308–1325, 2020. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1741>.

BENNETT, J. E.; STEVENS, G. A.; MATHERS, C. D.; BONITA, R.; REHM, J.; KRUK, M. E.; RILEY, L. M.; DAIN, K.; KENGNE, A. P.; CHALKIDOU, K.; BEAGLEY, J.; KISHORE, S. P.; CHEN, W.; SAXENA, S.; BETTCHER, D. W.; GROVE, J. T.; BEAGLEHOLE, R.; EZZATI, M. NCD Countdown 2030: worldwide trends in non-communicable disease mortality and progress towards Sustainable Development Goal target 3.4. **The Lancet**, v. 392, n. 10152, p. 1072–1088, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31992-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31992-5).

BERBUDI, A.; RAHMADIKA, N.; TIAHJADI, A. I.; RUSLAMI, R. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. **Current Diabetes Reviews**, v. 16, n. 5, p. 442–449, 2019. <https://doi.org/10.2174/1573399815666191024085838>.

BERGER, C.; ZDZIEBLO, D. Glucose transporters in pancreatic islets. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 472, n. 9, p. 1249–1272, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02383-4>.

BIMONTE, V. M.; BESHARAT, Z. M.; ANTONIONI, A.; CELLA, V.; LENZI, A.; FERRETTI, E.; MIGLIACCIO, S. The endocrine disruptor cadmium: a new player in the pathophysiology of metabolic diseases. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 44, n. 7, p. 1363–1377, 2021. DOI 10.1007/s40618-021-01502-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01502-x>.

BOCK, F. J.; TAIT, S. W. G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 85–100, 2020. DOI 10.1038/s41580-019-0173-8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1uRgO057EGY59I880BfPBu8LcviBpFD2V/view>.

BRISSOVA, M.; FOWLER, M. J.; NICHOLSON, W. E.; CHU, A.; HIRSHBERG, B.; HARLAN, D. M.; POWERS, A. C. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 53, n. 9, p. 1087–1097, 2005. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>.

BURATTI, F. M.; D'ANIELLO, A.; VOLPE, M. T.; MENEGUZ, A.; TESTAI, E. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 3, p. 295–302, 2005. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001693>.

CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Organophosphate toxicology: Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 8, p. 983–998, 2004. <https://doi.org/10.1021/tx0499259>.

CHEN, X. Y.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X.; LIU, X. M. Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 1–2, p. 36–45, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.010>.

CROSS, S. E.; HUGHES, S. J.; CLARK, A.; GRAY, D. W. R.; JOHNSON, P. R. V. Collagenase does not persist in human islets following isolation. **Cell Transplantation**, v. 21, n. 11, p. 2531–2535, 2012. <https://doi.org/10.3727/096368912X636975>.

DA SILVA XAVIER, G. The cells of the islets of langerhans. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 1–17, 2018. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J. P.; GIUDICE, L. C.; HAUSER, R.; PRINS, G. S.; SOTO, A. M.; ZOELLER, R. T.; GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293–342, 2009. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>.

DURKIN, P. R. Malathion: Human Health and Ecological Risk assessment Final Report. n. 315, p. 73–75, 2008. .

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: Os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25–38, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100008>.

GALÁNTAI, R.; EMODY-KISS, B.; SOMOSY, Z.; BOGNÁR, G.; HORVÁTH, G.; FORGÁCS, Z.; GACHÁLYI, A.; SZILASI, M. Does malaoxon play a role in the geno- and cytotoxic effects of malathion on human choriocarcinoma cells? **Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes**, v. 46, n. 8, p. 773–779, 2011. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.597703>.

GALICIA-GARCIA, U.; BENITO-VICENTE, A.; JEBARI, S.; LARREA-SEBAL, A.; SIDDIQI, H.; URIBE, K. B.; OSTOLAZA, H.; MARTÍN, C. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–34, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.

GERBER, P. A.; RUTTER, G. A. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 26, n. 10, p. 501–518, 2017. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>.

GHISARI, M.; LONG, M.; TABBO, A.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 284, n. 3, p. 292–303, 2015. DOI 10.1016/j.taap.2015.02.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.004>.

GORE, A. C.; CREWS, D.; DOAN, L. L.; MERRIL, M. L.; PATISAUL, H.; ZOTA, A. **Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs): A Guide for Public Interest Organizations and Policy-Makers**. [S. l.: s. n.], 2014.

HAGAR, H. H.; AZZA H; FAHMY. A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. **Toxicology Letters**, v. 133, n. 2–3, p. 161–170, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00128-5).

HE, F.; HUANG, Y.; SONG, Z.; ZHOU, H. J.; ZHANG, H.; PERRY, R. J.; SHULMAN, G. I.; MIN, W. Mitophagy-mediated adipose inflammation contributes to type 2 diabetes with hepatic insulin resistance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 2021. <https://doi.org/10.1084/JEM.20201416>.

HOSSEINI, S. A.; ZARANDI, A. F.; KARAMI-MOHAJERI, S. Effects of malathion exposure on glucose tolerance test in diabetic rats; emphasis on oxidative stress and blood concentration of malathion by gas chromatography mass spectrometry. **Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal**, v. 4, n. 2, p. 60–71, 2021. <https://doi.org/10.24200/amecj.v4.i02.141>.

HOYECK, M. P.; MATTEO, G.; MACFARLANE, E. M.; PERERA, I.; BRUIN, J. E. Persistent organic pollutants and β -cell toxicity: a comprehensive review. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 322, n. 5, p. E383–E413, 2022. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00358.2021>.

IBAMA. **Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil (2020)**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>.

IDF. **IDF Diabetes Atlas 10th edition**. 10. ed. [S. l.: s. n.], 2021.

JAACKS, L. M.; STAIMEZ, L. R. Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-related health outcomes in Asia: A systematic review. **Environment International**, v. 76, p. 57–70, 2015. DOI 10.1016/j.envint.2014.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.001>.

JADHAV, R. K.; SHARMA, V. K.; RAO, G. J.; SARAF, A. K.; CHANDRA, H. Distribution of malathion in body tissues and fluids. **Forensic Science International**, v. 52, n. 2, p. 223–229, 1992. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90111-9](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90111-9).

JAVADOV, S.; CHAPA-DUBOCQ, X.; MAKAROV, V. Different approaches to modeling analysis of mitochondrial swelling. **Mitochondrion**, v. 38, n. August, p. 58–70, 2018. DOI 10.1016/j.mito.2017.08.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2017.08.004>.

JOSSE, R.; SHARANEK, A.; SAVARY, C. C.; GUILLOUZO, A. Impact of isomalathion on malathion cytotoxicity and genotoxicity in human HepaRG cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 209, n. 1, p. 68–76, 2014. DOI 10.1016/j.cbi.2013.12.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.002>.

KALENDER, Y.; KALENDER, S.; UZUNHISARCIKLI, M.; OGUTCU, A.; AÇIKGOZ, F.; DURAK, D. Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. **Toxicology**, v. 200, n. 2–3, p. 205–211, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.017>.

KAMPMANN, U.; KNORR, S.; FUGLSANG, J.; OVESEN, P. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, n. 1, p. 1–9, 19 nov. 2019. DOI 10.1155/2019/5320156. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2019/5320156/>.

KARAMI-MOHAJERI, S.; HADIAN, M. R.; FOULADDEL, S.; AZIZI, E.; GHAHRAMANI, M. H.; HOSSEINI, R.; ABDOLLAHI, M. Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. **Human and Experimental Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 251–263, 2014. <https://doi.org/10.1177/0960327113493300>.

KARNOVSKY, M. J. **A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy**. [S. l.: s. n.], 1965. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/1604673>.

LACY, P. E.; HARTROFT, W. S. ELECTRON MICROSCOPY OF THE ISLETS OF LANGERHANS*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 82, n. 2, p. 287–300, 15 dez. 1959. DOI 10.1111/j.1749-6632.1959.tb44909.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1959.tb44909.x>.

LASRAM, M. M.; DHOUIB, I. B.; BOUZID, K.; LAMINE, A. J.; ANNABI, A.; BELHADJHMIDA, N.; AHMED, M. Ben; FAZAA, S. El; ABDELMOULA, J.; GHARBI, N. Association of inflammatory response and oxidative injury in the pathogenesis of liver steatosis and insulin resistance following subchronic exposure to malathion in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 542–553, 2014. DOI 10.1016/j.etap.2014.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.007>.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 463–466, 1996. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)02051-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02051-5).

LU, T. H.; SU, C. C.; CHEN, Y. W.; YANG, C. Y.; WU, C. C.; HUNG, D. Z.; CHEN, C. H.; CHENG, P. W.; LIU, S. H.; HUANG, C. F. Arsenic induces pancreatic β -cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 1, p. 15–26, 2011. DOI 10.1016/j.toxlet.2010.11.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.019>.

MACDONALD, P. E.; JOSEPH, J. W.; RORSMAN, P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic β -cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society B:**

Biological Sciences, v. 360, n. 1464, p. 2211–2225, 2005.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1762>.

MAGLIANO, D. J.; LOH, V. H. Y.; HARDING, J. L.; BOTTON, J.; SHAW, J. E. Persistent organic pollutants and diabetes: A review of the epidemiological evidence. **Diabetes and Metabolism**, v. 40, n. 1, p. 1–14, 2014. DOI 10.1016/j.diabet.2013.09.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2013.09.006>.

MARCHETTI, P.; BUGLIANI, M.; DE TATA, V. D.; SULEIMAN, M.; MARSELLI, L. Pancreatic beta cell identity in humans and the role of type 2 diabetes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. MAY, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00055>.

MARUŠIĆ, M.; PAIĆ, M.; KNOBLOCH, M.; LIBERATI PRŠO, A. M. NAFLD, Insulin Resistance, and Diabetes Mellitus Type 2. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 2021, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6613827>.

MASINI, M.; MARTINO, L.; MARSELLI, L.; BUGLIANI, M.; BOGGI, U.; FILIPPONI, F.; MARCHETTI, P.; DE TATA, V. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 33, n. 6, 2017. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2894>.

MIYAKE, S.; MURAI, S.; KAKUTA, S.; UCHIYAMA, Y.; NAKANO, H. Identification of the hallmarks of necroptosis and ferroptosis by transmission electron microscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 839–844, 2020. DOI 10.1016/j.bbrc.2020.04.127. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.127>.

MOLINA, A. J. A.; WIKSTROM, J. D.; STILES, L.; LAS, G.; MOHAMED, H.; ELORZA, A.; WALZER, G.; TWIG, G.; KATZ, S.; CORKEY, B. E.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial networking protects β -cells from nutrient-induced apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2303–2315, 2009. DOI 10.2337/db07-1781. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19581419/>.

MOMOSE, K.; NUNOMIYA, S.; NAKATA, M.; YADA, T.; KIKUCHI, M.; YASHIRO, T. Immunohistochemical and electron-microscopic observation of β -cells in pancreatic islets of spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **Medical Molecular Morphology**, v. 39, n. 3, p. 146–153, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00795-006-0324-9>.

MOORE, P. D.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. **Environmental Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 221–226, 27 abr. 2009. DOI

10.1002/tox.20492. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.20492>.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549–599, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>.

MOYCE, B. L.; DOLINSKY, V. W. Maternal β -Cell adaptations in pregnancy and placental signalling: Implications for gestational diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19113467>.

MURALIDHARAN, C.; CONTEH, A. M.; MARASCO, M. R.; CROWDER, J. J.; KUIPERS, J.; DE BOER, P.; LINNEMANN, A. K. Pancreatic beta cell autophagy is impaired in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 64, n. 4, p. 865–877, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05387-6>.

NAUGHTON, S. X.; TERRY, A. V. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. **Toxicology**, v. 408, p. 101–112, 2018. DOI 10.1016/j.tox.2018.08.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>.

NERUP, J.; PLATZ, P.; ANDERSEN, O. O.; CHRISTY, M.; LYNGSØE, J.; POULSEN, J. ; RYDER, L. ; THOMSEN, M.; NIELSEN, L. S.; SVEJGAARD, A. HL-A ANTIGENS AND DIABETES MELLITUS. **The Lancet**, v. 304, n. 7885, p. 864–866, out. 1974. DOI 10.1016/S0140-6736(74)91201-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067367491201X>.

NOLAN, C. J.; RUDERMAN, N. B.; KAHN, S. E.; PEDERSEN, O.; PRENTKI, M. Insulin resistance as a physiological defense against metabolic stress: Implications for the management of subsets of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 3, p. 673–686, 2015. <https://doi.org/10.2337/db14-0694>.

OLAKKARAN, S.; KIZHAKKE PURAYIL, A.; ANTONY, A.; MALLIKARJUNIAH, S.; HUNASANAHALY PUTTASWAMYGOWDA, G. Oxidative stress-mediated genotoxicity of malathion in human lymphocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 849, p. 503138, 2020. DOI 10.1016/j.mrgentox.2020.503138. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503138>.

OUARDI, F. Z.; ANARGHOU, H.; MALQUI, H.; OUASMI, N.; CHIGR, M.; NAJIMI, M.; CHIGR, F. Gestational and Lactational Exposure to Malathion Affects Antioxidant Status and Neurobehavior in Mice Pups and Offspring. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 17–27, 12 set. 2019. DOI 10.1007/s12031-018-1252-6. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12031-018-1252-6>.

PAHO. **NCDs at a Glance: Mortality and Risk Factor Prevalence in the Americas**. Washington, D.C.: [s. n.], 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51696>.

PANAHI, P.; VOSOUGH-GHANBARI, S.; POURNOURMOHAMMADI, S.; OSTAD, S. N.; NIKFAR, S.; MINAIE, B.; ABDOLLAHI, M. Stimulatory effects of malathion on the key enzymes activities of insulin secretion in Langerhans islets, glutamate dehydrogenase and glucokinase. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 16, n. 4, p. 161–167, 2006. <https://doi.org/10.1080/15376520500191623>.

PLUTH, J. M.; NICKLAS, J. A.; O'NEILL, J. P.; ALBERTINI, R. J. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. **Cancer Research**, v. 56, n. 10, p. 2393–2399, 1996. .

POURNOURMOHAMMADI, S.; OSTAD, S. N.; AZIZI, E.; GHAHREMANI, M. H.; FARZAMI, B.; MINAIE, B.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 346–352, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.02.001>.

PULLEN, T. J.; KHAN, A. M.; BARTON, G.; BUTCHER, S. A.; SUN, G.; RUTTER, G. A. Identification of genes selectively disallowed in the pancreatic islet. **Islets**, v. 2, n. 2, p. 89–95, 2010. <https://doi.org/10.4161/isl.2.2.11025>.

RAAFAT, N.; ABASS, M. A.; SALEM, H. M. Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 18, p. 1591–1595, 2012. DOI 10.1016/j.clinbiochem.2012.07.108. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.07.108>.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222–233, 2011. DOI 10.1016/j.ceca.2011.04.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.007>.

REYNOLDS, E. S. THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. **Journal of Cell Biology**, v. 17, n. 1, p. 208–212, 1 abr. 1963. DOI 10.1083/jcb.17.1.208. Disponível em: <https://rupress.org/jcb/article/17/1/208/1220/THE-USE-OF-LEAD-CITRATE-AT-HIGH-pH-AS-AN>.

REZG, R.; MORNAGUI, B.; BENAHMED, M.; GHARSALLA CHOUCANE, S.; BELHAJHMIDA, N.; ABDELADHIM, M.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N.

Malathion exposure modulates hypothalamic gene expression and induces dyslipidemia in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1473–1477, 2010. DOI 10.1016/j.fct.2010.03.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.013>.

REZG, R.; MORNAGUI, B.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N. Caffeic acid attenuates malathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity. **Toxicology**, v. 250, n. 1, p. 27–31, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.017>.

RIEGER, D. K.; DOS SANTOS, A. A.; SUÑOL, C.; FARINA, M. Involvement of superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 19–21, p. 1106–1115, 2017. DOI 10.1080/15287394.2017.1357305. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357305>.

RODGERS, K.; ELLEFSON, D. Mechanism of the modulation of murine peritoneal cell function and mast cell degranulation by low doses of malathion. **Agents and Actions**, v. 35, n. 1–2, p. 57–63, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF01990952>.

ROEP, B. O.; THOMAIDOU, S.; VAN TIENHOVEN, R.; ZALDUMBIDE, A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 3, p. 150–161, 2021. DOI 10.1038/s41574-020-00443-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-020-00443-4>.

SALEH, M. A.; AHMED, A. E.; KAMEL, A.; DARY, C. Determination of the distribution of malathion in rats following various routes of administration by whole-body electronic autoradiography. **Toxicology and Industrial Health**, v. 13, n. 6, p. 751–758, 1997. <https://doi.org/10.1177/074823379701300605>.

SAMPATH KUMAR, A.; MAIYA, A. G.; SHASTRY, B. A.; VAISHALI, K.; RAVISHANKAR, N.; HAZARI, A.; GUNDMI, S.; JADHAV, R. Exercise and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 62, n. 2, p. 98–103, 2019. DOI 10.1016/j.rehab.2018.11.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2018.11.001>.

SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. E. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 598–606, jun. 2013. DOI 10.1590/S0034-8910.2013047004306. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102013000300598&lng=pt&tlng=pt.

SCHWINGSHACKL, L.; HOFFMANN, G.; LAMPOUSI, A. M.; KNÜPPEL, S.; IQBAL, K.; SCHWEDHELM, C.; BECHTHOLD, A.; SCHLESINGER, S.; BOEING, H. Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **European Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 5, p. 363–375, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10654-017-0246-y>.

SHIBATA, Y.; VOELTZ, G. K.; RAPOPORT, T. A. Rough Sheets and Smooth Tubules. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 435–439, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>.

SHRESTHA, S.; KUMAR SINGH, V.; KUMAR SARKAR, S.; SHANMUGASUNDARAM, B.; JEEVARATNAM, K.; CHANDRA KONER, B. Effect of sub-toxic exposure to Malathion on glucose uptake and insulin signaling in L6 myoblast derived myotubes. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2018. DOI 10.1080/01480545.2018.1531881. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1531881>.

SONG, Y.; CHOU, E. L.; BAECKER, A.; YOU, N. C. Y.; SONG, Y.; SUN, Q.; LIU, S. Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Diabetes**, v. 8, n. 4, p. 516–532, 2016. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12325>.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. de. Monitoramento do risco ambiental do agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, v. 42, p. 29, 2004. .

SPINDER, N.; PRINS, J. R.; BERGMAN, J. E. H.; SMIDT, N.; KROMHOUT, H.; BOEZEN, H. M.; DE WALLE, H. E. K. Congenital anomalies in the offspring of occupationally exposed mothers: a systematic review and meta-analysis of studies using expert assessment for occupational exposures. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 34, n. 5, p. 903–919, 2019. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez033>.

STILES, L.; SHIRIHAI, O. S. Mitochondrial dynamics and morphology in beta-cells. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 725–738, dez. 2012. DOI 10.1016/j.beem.2012.05.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.004>.

TASCETTO, A. P. D.; ZIMATH, P. L.; SILVÉRIO, R.; DOS SANTOS, C.; BOSCHERO, A. C.; DOS SANTOS, G. J.; RAFACHO, A. Reduced insulin sensitivity and increased β/α cell mass is associated with reduced hepatic insulin-degrading enzyme activity in pregnant rats. **Life Sciences**, v. 277, n. April, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119509>.

THOMAS ZOELLER, R.; BROWN, T. R.; DOAN, L. L.; GORE, A. C.; SKAKKEBAEK, N. E.; SOTO, A. M.; WOODRUFF, T. J.; VOM SAAL, F. S. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: A statement of principles from the Endocrine Society. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4097–4110, 2012. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>.

TUCKER, S. J.; GRIBBLE, F. M.; ZHAO, C.; TRAPP, S.; ASHCROFT, F. M. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. **Nature**, v. 387, n. 6629, p. 179–183, maio 1997. <https://doi.org/10.1038/387179a0>.

VALE, A.; LOTTI, M. **Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier B.V., 2015. v. 131, . DOI 10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X>.

VELASCO, M.; DÍAZ-GARCÍA, C. M.; LARQUÉ, C.; HIRIART, M. Modulation of ionic channels and insulin secretion by drugs and hormones in pancreatic beta cells. **Molecular Pharmacology**, v. 90, n. 3, p. 341–357, 2016. <https://doi.org/10.1124/mol.116.103861>.

VENKATESAN, R.; PARK, Y. U.; JI, E.; YEO, E.-J.; KIM, S. Y. Malathion increases apoptotic cell death by inducing lysosomal membrane permeabilization in N2a neuroblastoma cells: a model for neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, p. 17007, 24 dez. 2017. DOI 10.1038/cddiscovery.2017.7. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cddiscovery20177>.

VOSOUGH-GHANBARI, S.; SAYYAR, P.; POURNOURMOHAMMADI, S.; ALIAHMADI, A.; OSTAD, S. N.; ABDOLLAHI, M. 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. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 2, p. 130–136, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.05.001>.

WHO. **Global action plan for the prevention and control of non communicable diseases 2013-2020**. Geneva: WHO Press, 2013.

WHO. **Global Report on Diabetes**. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204871/9789241565257_eng.pdf?sequence=1.

WHO. **Noncommunicable diseases progress monitor 2020**. Geneva: CC BY-NC-SA 3.0 IGO, 2020.

WHO. **The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009**. 1. ed. Geneva: [s. n.], 2010. Disponível em: http://www.ghbook.ir/index.php?name=های رسانه و فرهنگ&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chkhashk=ED9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component.

WISZKOWSKA, H.; KULAMOWICZ, I.; MALINOWSKA, A.; WALTER, Z. The effect of malathion on RNA polymerase activity of cell nuclei and transcription products in lymphocyte culture. **Environmental Research**, v. 41, n. 2, p. 372–377, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(86\)80132-3](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(86)80132-3).

XIANG, S.; RODGERS, K. Effects of malathion metabolites on degranulation of and mediator release by human and rat basophilic cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 51, n. 2, p. 159–175, 1997. <https://doi.org/10.1080/00984109708984019>.

XIAO, X.; CLARK, J. M.; PARK, Y. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 456–474, 2017. DOI 10.1016/j.fct.2017.05.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.003>.

YILMAZ, B.; TEREKECI, H.; SANDAL, S.; KELESTIMUR, F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 1, p. 127–147, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09521-z>.

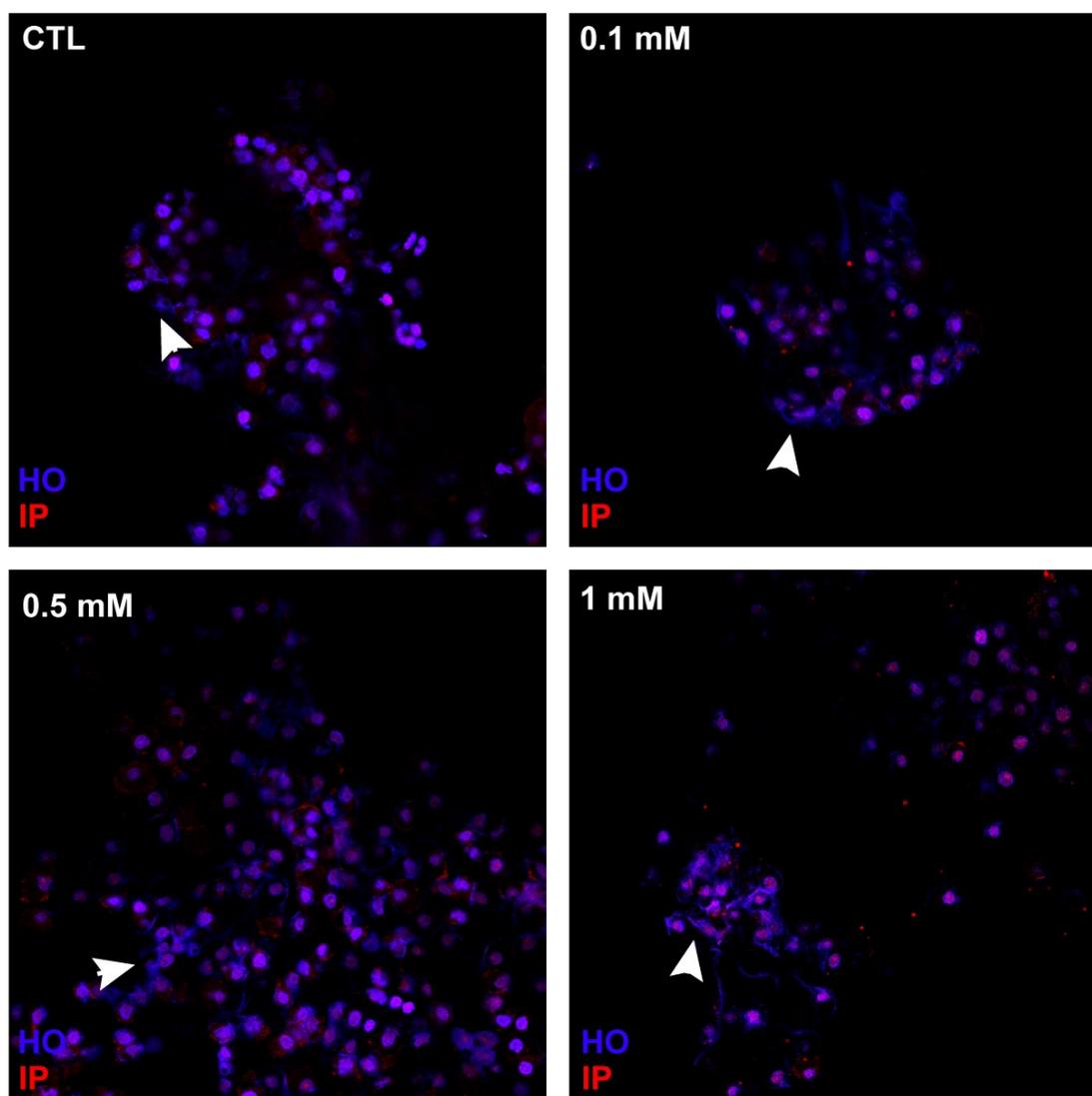
ZHANG, Y.; PAN, X. F.; CHEN, J.; XIA, L.; CAO, A.; ZHANG, Y.; WANG, J.; LI, H.; YANG, K.; GUO, K.; HE, M.; PAN, A. Combined lifestyle factors and risk of incident type 2 diabetes and prognosis among individuals with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Diabetologia**, v. 63, n. 1, p. 21–33, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-04985-9>.

ZWERGER, M.; KOLB, T.; RICHTER, K.; KARAKESISOGLOU, I.; HERRMANN, H. Induction of a massive endoplasmic reticulum and perinuclear space expansion by expression of lamin B receptor mutants and the related sterol reductases TM7SF2 and DHCR7. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, n. 2, p. 354–368, 2010. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-08-0739>.

APÊNDICE A – Artefatos de técnica observados em ilhotas pancreáticas através da microscopia confocal

As ilhotas pancreáticas isoladas para a avaliação da viabilidade celular por microscopia confocal, com marcação dupla com os corantes de DNA HO e IP, foram incubadas nas mesmas concentrações descritas em 3.6 pelo período adicional de **3 horas** para a avaliações de efeitos genômicos do Malathion sobre as ilhotas pancreáticas. Entretanto, ao serem analisadas as imagens das ilhotas tratadas por este período, foi observado a presença de artefatos que dificultaram a contagem dos núcleos nas amostras incubadas por este tempo (Figura 12).

Figura 12 - Artefatos observados nas imagens de microscopia confocal de ilhotas tratadas com o Malathion por 3 horas



Legenda: Além do tratamento por 1 hora, ilhotas pancreáticas isoladas foram incubadas com o Malathion nas concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM por 3 horas. Contudo, foram observadas estruturas que inviabilizaram a contagem dos núcleos viáveis nestas imagens, mesmo as ilhotas do grupo CTL.

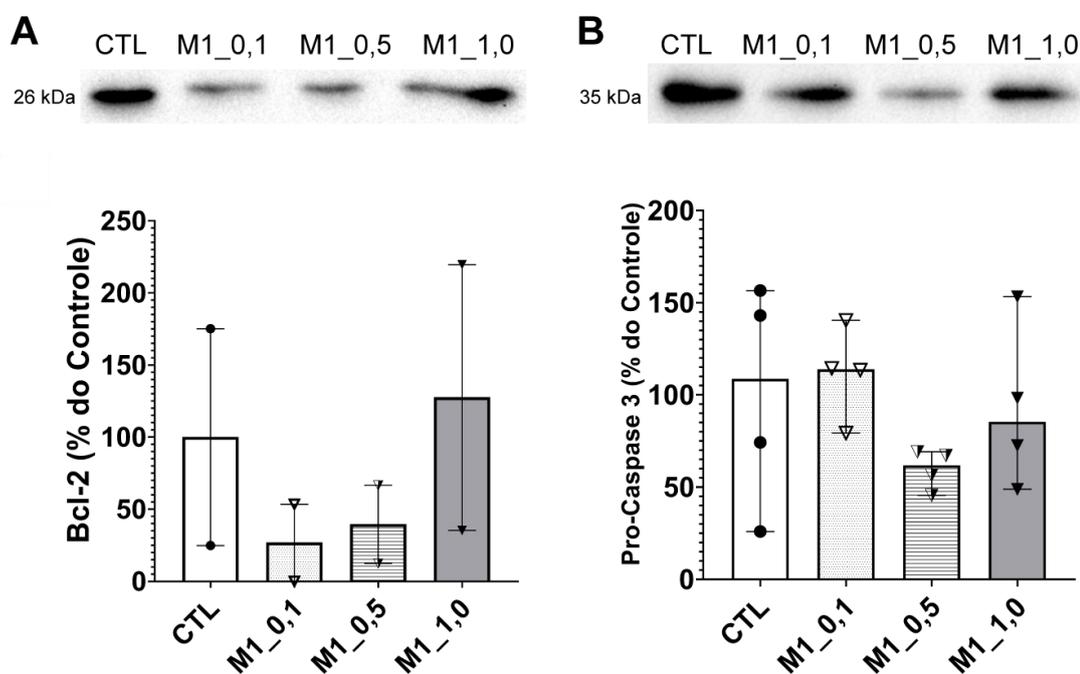
APÊNDICE B – Quantificação proteica em ilhotas pancreáticas

Para verificar a nível molecular quais proteínas poderiam estar alteradas como desfecho dos tratamentos em ilhotas pancreáticas isoladas com as diferentes concentrações do Malathion, os conteúdos proteicos de algumas proteínas relacionadas com a maquinaria da via intrínseca da apoptose foram quantificados.

Buscamos realizar a quantificação proteica para proteínas da família Bcl-2, sendo elas as anti-apoptóticas (Bcl-2), as efetoras Bax, bem como proteases efetoras do processo apoptótico em sua forma inativa (pró-Caspase 3) e ativa (Caspase 3 clivada). Todavia, devido a avarias na integridade dos anticorpos utilizados, só foram possíveis ser revelados os conteúdos proteicos para as proteínas Bcl-2 e pró-Caspase 3.

As imagens de quimiluminescência indicaram ampla variância entre os grupos decorrentes dos tratamentos com o Malathion e como não pudemos normalizar por um controle interno, não é possível chegar a qualquer conclusão (Figura 13A-B).

Figura 13 - Efeitos do Malathion sobre o nível de proteínas da maquinaria apoptótica



Legenda: (A) Níveis da proteína Bcl-2 e representações das análises de densitometria óptica realizadas para a Bcl-2 (n = 2). (B) Níveis da proteína pró-Caspase 3 e representações das análises de densitometria óptica realizadas para pró-Caspase 3 (n = 4), avaliados por Western blot utilizando os anticorpos correspondentes. A respectivas membranas incubadas com o *Ponceau S* foram utilizadas como controles internos. Dados representados como mediana \pm amplitude.

APÊNDICE C – Manuscrito em preparação para submissão no Environmental Toxicology and Pharmacology

Acute effects of organophosphate malathion on pancreatic β and α cell structure and electrophysiologic properties

Martins JRN^{1,2}, Lopes S³, Hurtado HN⁴, da Silva FN^{1,2}, Villard DR⁵, Taboga SR⁶, Souza KLA⁵, Quesada I^{4,7}, Soriano S⁴, Rafacho A^{1,2,*}

¹ Laboratory of Investigation in Chronic Diseases – LIDoC, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brazil

² Graduate Program in Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brazil

³ Central Laboratory of Electron Microscopy – LCME, PROPESQ, Federal University of Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brazil

⁴ Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain.

⁵ Federal University of Rio de Janeiro - UFRJ, CCS, Bss24, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil.

⁶ Department of Biological Sciences, Laboratory of Microscopy and Microanalysis, Universidade Estadual Paulista-UNESP, São Paulo, Brazil.

⁷ Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain.

**Corresponding author:* Alex Rafacho. Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 88040-900, Florianópolis, Brazil. e-mail: alex.rafacho@ufsc.br Website: www.lidoc.ccb.ufsc.br

Abstract

Malathion is among the most poorly regulated and consumed pesticides in middle- and low-income countries worldwide. The wealth of epidemiological and experimental data point to the role of this compound in the incidence of type 2 diabetes and other endocrine dysfunctions. We determined the effects of different concentrations of the organophosphate pesticide malathion over the cell survival, structure, and electrophysiologic properties of pancreatic β and α cells. Malathion exposure only affected the viability of pancreatic islet cells at higher concentrations (0.5 or 1 mM). However, even at the lowest concentration exposed to the isolated islets (0.1 mM), signs of cell damage in α and β cells were observed through ultrastructural assessments. The exposure of immortalized β cells (RINm5F) to malathion confirmed the reduction of β -cell viability at lower concentrations after 24 h of exposure (0.01 to 100 μ M), being more pronounced after 48 h of exposure (0.001 to 100 μ M). The electrophysiological analyses showed that the acute (1 h) exposure of primary mouse pancreatic β and α cells to a low concentration (3 nM) of malathion did not affect K_v currents. However, chronic exposure for 24 h led to increased K_v currents only in α -cells. Our findings suggest a non-specific effect of malathion, highlighting a time and concentration dependency for the reduction of cell viability. Additionally, our results indicate that α -cells are more sensitive to malathion toxicity over the K_v current changes and apoptosis induced by the pesticide than β cells, shedding light on the role of this pesticide over the disruption of the endocrine pancreas.

Keywords: Malathion, persistent organic pollutants, islets of Langerhans, K_{ATP} , endocrine disruptor

1 Introduction

Every year, around 2 million tonnes of pesticides are used worldwide (Sharma et al., 2019). However, the poor regulation of the use of some of these compounds in underdeveloped countries results in the widespread use of pesticides with known and even unknown toxicological effects on humans where the organophosphate pesticide (diethyl-dimethoxythiophosphorylthio)succinate, commercially known as malathion, is included (Donley, 2019; Hoyeck et al., 2022).

The primary mechanism of action of insecticide malathion is the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine in cholinergic synapses (Vale e Lotti, 2015). In mammal cells, malathion also induces the expression of different xenobiotic-metabolizing enzymes in high concentrations, such as CYP3A2, and in low concentrations, CYP1A2 and CYP2B6 (Buratti et al., 2005; Galántai et al., 2011). Malathion metabolism produces metabolites with higher potency and toxicity such as malaoxon (Rieger et al., 2017; Xiang e Rodgers, 1997), causing a temporal and concentration dependency on the effects of malathion. Malathion exposure in rodents has been reported to impair glucose tolerance and islet response to glucose through the involvement of oxidative stress (Hoyeck et al., 2022; Nili-Ahmadabadi et al., 2013). Metabolic impairments have also been reported as a result of malathion exposure in humans (Aguilar-Garduño et al., 2013; Pluth et al., 1996; Raafat et al., 2012), relating its exposure to the prevalence of chronic diseases such as type 2 diabetes mellitus (T2D) (Ramirez-Vargas et al., 2018; Xiao et al., 2017).

Diabetes mellitus is one of the most relevant chronic diseases in the world, with T2D being the most prevalent type (IDF, 2021). The main physiological alterations driven by T2D are hyperglycemia and impaired glucose tolerance, which arise from a reduction in the action of insulin in insulin-dependent organs, such as the liver, skeletal muscle, and adipose tissue, and later a reduction in insulin release (Galicia-Garcia et al., 2020). Several factors may contribute to the disruption of insulin action and release, such as age, adiposity, sedentarism, alcoholism, genetic polymorphisms (WHO, 2016), and exposure to substances known as endocrine-disrupting chemicals (EDC), which includes organophosphate pesticides (Mostafalou e Abdollahi, 2017; Song et al., 2016).

The endocrine pancreas is composed of clusters of different cell types called pancreatic islets. These islets are enveloped by a thin capsule of basement membrane (Korpos et al., 2013), and present insulin-, glucagon-, somatostatin-, pancreatic polypeptide- and ghrelin-cells, which compose the β -, α -, δ -, PP and ϵ cells, respectively (Brissova et al., 2005; Da Silva Xavier, 2018). Among these cells, the pancreatic α - and β -cells play a crucial role in energy homeostasis, and disturbances in their function or survival may lead to the development of diabetes mellitus (Galicia-Garcia et al., 2020; Marroquí et al., 2014). Accordingly, it has been

reported that *in vivo* exposure to malathion may lead to reductions in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in rats (Pournourmohammadi et al., 2007), as well as alterations in the levels of antioxidant enzymes, such as glutamate dehydrogenase (Panahi et al., 2006).

The process of GSIS has been well-reviewed elsewhere (Rorsman e Ashcroft, 2018). Briefly, glucose is transported into the cytoplasm of the pancreatic β -cells through the glucose transporter isoform 2 (GLUT2), in rodents, and is phosphorylated by the enzyme glucokinase and subsequently metabolized through the glycolysis pathway, leading to ATP synthesis through the tricarboxylic acid cycle. ATP molecules then bind to the $K_{ir6.1}$ subunit of the ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}), inducing the closure of the pore of the channels and blockade of K^+ efflux, increasing the membrane potential and resulting in the activation of voltage dependant calcium channels (Ca_v), causing an increase in intracellular Ca^{2+} levels, which mediates insulin granule coupling to the plasma membrane and exocytosis (Ashcroft e Rorsman, 2013). In pancreatic α -cells, the activation of the K_{ATP} channels causes a depolarization of the membrane, which in turn inhibits the activity of the Na^+ and Ca^{2+} channels in these cells, since the isoforms of these channels in α -cells are activated in low voltages and inactivated in high voltages, thus inhibiting glucagon secretion (MacDonald et al., 2007).

Considering malathion is among the organophosphate pesticide most applied around the world and its effects on the endocrine pancreas is not fully understood, we aimed to evaluate the acute effects of malathion on structural and electrophysiological aspects of murine α and β cells.

2 Material and Methods

2.1 Reagents

RPMI 1640 cell culture medium, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), dimethyl sulfoxide (DMSO), the antibiotics penicillin and streptomycin, Hoechst 33342 (HO), propidium iodide (PI), bovine serum albumin, and collagenase from *Clostridium histolyticum* were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Osmium tetroxide and Spurr's low viscosity embedding media kit were from Elctron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA) Malathion 1000 EC was obtained by Cheminova (Cheminova A/S, Harboøre, Denmark). Malathion 1000EC

Cheminova is constituted of 1000g/L (100% m/v) of diethyl (dimethoxythiophosphorylthio) succinate and 191 g/L (19,1% m/v) of other ingredients. From here we will refer to this solution as malathion, which was applied for all experiments. Amphotericin B and fetal bovine serum were obtained from Gibco/Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA US).

2.2 Ethics statement

Animal care and experimental procedures were reviewed and approved by the Federal University of Santa Catarina Committee for Ethics in Animal Experimentation (approval ID: 9212220420) and were conducted in accordance with the Brazilian National Council for Animal Experimentation Protocol (CONCEA).

2.3 Animals and handling

For the *ex vivo* exposure experiments, 3-month-old male Wistar rats were supplied by the Federal University of Santa Catarina's Animal Breeding Center, and maintained in controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and a 12-hour light/dark cycle (lights on from 6:00-18:00) in our animal facilities. Animals had access to food (commercial standard chow for rats, Nuvilab CR-1; Nuvital, Brazil) and filtered tap water *ad libitum*.

For the electrophysiology experiments, 3-month-old male C57BL/6J mice were purchased from Harlan Laboratories (Barcelona, Spain) and housed in our animal facilities in controlled conditions of temperature, light cycle, chow, and water access as described above. All methods were carried out in accordance with national guidelines and regulations of our institution.

2.4 Experimental design for *ex vivo* exposure to malathion

2.4.1 Malathion stock solution

For the *ex vivo* experiments, 3 stock solutions of malathion were prepared at 0.05, 0.25, and 0.5 M in 1% DMSO. The stock solutions were then diluted to obtain the final concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mM in Krebs solution composed of (in mM): 115 NaCl, 24 NaHCO₃, 5 KCl, 1 MgCl₂.6H₂O, 2.5 CaCl₂.2H₂O, 15 N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5.6 glucose, 1% DMSO (used as vehicle), supplemented with 0.5% bovine serum albumin.

2.4.2 Islet isolation

Male Wistar rats were anaesthetised by inhalation with halothane and euthanised through decapitation in a guillotine. The islets were then isolated by the collagenase digestion method, as previously described (Rafacho PMID18362843). Briefly, the pancreas was perfused with collagenase (0.8 mg/mL) in 10 mL of cold Hank's solution composed of (in mM): 136.8 NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 CaCl₂·2H₂O, 0.8 MgSO₄·7H₂O, 0.4 Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 5.6 glucose, pH 7.4. The islets were then incubated at 37°C for 22 min and isolated from the digested tissue by hand-picking in a stereomicroscope and kept in cold Hank's solution.

2.4.3 Exposure of isolated islets to malathion

To evaluate the *ex vivo* effects of malathion on isolated pancreatic islets, freshly isolated islets were separated into batches of 600-800 and incubated for 1 h at 37°C in plastic culture dishes (35 mm diameter) with 0.1, 0.5, or 1 mM of malathion in Krebs solution and 1% DMSO under perfusion of a carbogen mixture (95% O₂ + 5% CO₂), pH 7.4. For the control condition (CTL), islets were incubated with 7 mL of a Krebs + 1% DMSO solution, and for the subsequent conditions, the islets were exposed to the same solution with added 0.1 (Mal 0.1), 0.5 (Mal 0.5) or 1 mM (Mal 1.0) of malathion.

2.4.4 Assessment of islet viability via confocal microscopy

Cell viability was determined through staining islets with the DNA binding dyes HO and PI, immediately after previous malathion exposure, and visualised with a confocal microscope, as previously described (Abdelli et al., 2007; Hoorens et al., 1996). Briefly, following the malathion exposure period, batches of 150-300 isolated islets were washed 3 times, for 2 minutes, in Hank's solution and then incubated for 10 min at 37°C with Hank's solution containing HO (20 µg/mL) and PI (10 µg/mL). The stained islets were then washed 3 times, for 2 minutes, in Hank's solution and posteriorly fixed for 15 min with 10% buffered formalin (90 mL H₂O_d, 10 mL formaldehyde, 0.045 M Na₂HPO₄, 0.033 M NaH₂PO₄, pH 6,8), washed an additional 3 times, for 2 minutes, and added to wells of confocal microscopy plates (SPL confocal dish PS/glass hole punched). The islets were visualised in a confocal microscope (Leica DMI6000 B Microscope, Wetzlar, Germany) with UV laser

excitation at 405 nm for HO and diode laser excitation at 514 nm for PI. Viable and necrotic cells were determined as cells with clearly visible nuclei stained in blue or purple, indicating the presence of only HO or HO and PI, respectively. The number of viable and necrotic cells was then counted manually by two separate blinded researchers, with the software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA), using three separate fields in the Z-axis, avoiding counting the same nucleus twice, of 10 different islets for the CTL group and 15 different islets for treatment groups. The percentage of cell death was then calculated using the following equation: necrotic nuclei (%) = ((IP-stained nuclei×100)/ (total of nuclei)).

2.4.5 Scanning and transmission electron microscopy

The determination of islet ultrastructural integrity was performed immediately after malathion exposure through a scanning electron microscope. In brief, after incubation with vehicle or malathion, 100-200 islets were fixed with Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde, 0.1 M sodium cacodylate, 2% paraformaldehyde) for 12 h at 4°C. The islets were then washed with 0.1 M sodium cacodylate and post-fixed with 1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer for 2 h at room temperature. Follow post-fixation, the islets were washed and dehydrated with acetone at concentrations of 30%, 50%, 70% 90% and 100%. The islets were then placed in stubs with carbon adhesive tape, and dried with hexamethyldisilazane (HMDS) and visualized in a scanning electron microscope (JEOL JSM-6390LV, JEOL, Akishima, Tokyo, Japan) at the Central Laboratory of Electron Microscopy of the Federal University of Santa Catarina.

For determination of α - and β -cell ultrastructural integrity, the islets were fixed and dehydrated following the methods described above, with the addition of the inclusion of the islets in Spurr resin after dehydrating with acetone, in proportions of resin to acetone of 1:3 (12 h), 1:2 (12 h), 1:1 (24 h), 2:1 (24 h), 3:1 (24 h) and pure resin (24 h). The resin was then cured with the incubation of the blocks in a drying oven at 70°C for 48 h. The hardened blocks were then cut with a diamond knife (DIATOME) in ultrathin slices (60-70 μ m) in an ultramicrotome (Leica EM UC 7, Wetzlar, Germany) and placed in 200 mesh copper grids for contrasting with uranyl acetate and lead citrate (Reynolds, 1963) for visualization in a transmission electron microscope (JEM-1011 TEM, JEOL, Akishima, Tokyo, Japan).

2.5 Experimental design for *in vitro* exposure to Malathion

2.5.1 Cell culture

To analyse the *in vitro* effects of malathion, the insulin-producing cell line RINm5F originated from insulinoma of rats, was used at passages between 80-100. The cells were donated by the Medizinische Hochschule Hannover, DE. The culture was maintained in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FBS, 1% antibiotics (Penicillin/Strepto), 2.5 µg/ml of Amphotericin B, and incubated at a temperature of 37°C and humidity at 5% CO₂.

2.5.2 Malathion stock solution

To evaluate the effects of the organophosphate pesticide malathion on *in vitro* cell viability, a total volume of 1000 mL stock solution with a final concentration of 1 mM was freshly prepared. For this, 0.3 µL of malathion was diluted in 999.7 µL of RPMI 1640 medium without phenol and without FBS. For the preparation of the solutions used for the experiments, solutions were made in RPMI 1640 medium without phenol and supplemented with 10% FBS to achieve desired lower values: 100, 10 and 1 µM.

2.5.3 Cell viability assay

Cells were inoculated in clear flat bottom 96-well plates at an initial density of 30,000 cells per well, allowed to attach for 24 h and incubated with different concentrations of malathion. Cell viability was measured using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, which is a colorimetric test to measure viability through mitochondrial activity, where the reduction of MTT shift its colour from yellow to purple. This conversion is directly proportional to the amount of metabolically active cells. After incubation, to obtain the solubilisation of the Formazan crystals and stop the reaction, DMSO was used. In this cell viability assay, 100 µL of MTT (final concentration of MTT 0.05 mg/mL) were added to each well and the cells were incubated for 30 min, then the MTT solution was removed and 100 µL of DMSO was added to each well. After 10 min of solubilisation the absorbance was read in the spectrophotometer (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, US) at a wavelength of 570 nm.

2.6 Experimental design for electrophysiological experiments

2.6.1 Cell culture

Mice were euthanized by cervical dislocation. Islets were isolated by collagenase digestion as previously described (Gonzalez et al. 2013). To obtain isolated cells, islets were dispersed by trypsin digestion, and cells were cultured overnight at 37°C in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100 IU/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin and 11.1 mM glucose.

2.6.2 Electrophysiological Recordings: K⁺ currents

Islets were dispersed into single cells and plated on poly-L-Lysine pre-coated slip slides (10 mm). After at least 24 h cells were exposed to 3 nM Malathion. For the patch-clamp recordings of voltage-gated K⁺ currents the standard whole-cell patch-clamp was used, as previously described. Data was obtained using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments Co., Union City, CA, USA). Patch pipettes were pulled from borosilicate capillaries (Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) using a flaming/brown micropipette puller P-97 (Sutter Instruments Co. Novato, CA, USA) and heat polished at the tip using an MF-830 microforge (Narishige, Japan). The bath solution contained (in mM): 135 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.1 MgCl₂, 10 HEPES, and 5 glucose (pH: 7.4 with NaOH). For recordings of voltage-gated K⁺ currents, the pipette was filled with (in mM): 120 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 3MgATP, 10 EGTA, and 10 HEPES (pH: 7.15 with KOH).

After filling the pipette with the pipette solution, the pipette resistance was 3-5MΩ. A tight seal (>1GΩ) was established between the cell membrane and the tip of the pipette by gentle suction. The series resistance of the pipette usually increased to 6-15MΩ after moving to the whole-cell. Series resistance compensation was used (up to 70%) for keeping the voltage error below 5 mV during current flow. Finally, data were filtered (2KHz) and digitized (10KHz) using a Digidata 1550B1 (Molecular Devices, CA, USA). α-cells were functionally identified by the presence of both an A-current and steady-state inactivation of the Na⁺ current.

2.7 Statistics

Results were expressed as mean ± standard deviation for parametric data and median ± interquartile for non-parametric data. Data symmetry was tested by the

normality tests of Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, and D'Agostino and Pearson, and defined as with normal distribution if passed by at least one of the three mentioned tests. One-way ANOVA analysis of variance was used followed by Bonferroni or Tukey's tests for multiple comparisons. For the correlation between concentration and cell death, as for the IC50 calculation, a non-linear regression concentration-response curve with variable slope was used. In all tests the limit for statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3 Results

3.1 Viability of pancreatic islets exposed to different concentrations of Malathion

Analysis of islet cell viability in response to different concentrations of malathion revealed that, in the *ex vivo* settings, pancreatic islets are more resilient to cell death at lower concentrations, as malathion exposure only decreased cell viability at higher concentrations of 0.5 and 1 mM (Fig. 1A). Quantitatively, the increased PI fluorescence in islets exposed to higher concentrations was further supported by a higher number of necrotic nuclei counted (Fig. 1B), compared to the CTL and Mal 0.1 groups, where no statistical difference was identified. In accordance with the qualitative and quantitative observations of the relation between malathion concentration and cell viability, the analysis of correlation showed a weak correlation between these two parameters (Fig. 1C).

3.2 Structural integrity of pancreatic islets exposed to different concentrations of malathion

The scanning electron microscopy (SEM) images captures from exposed pancreatic islets to different concentrations of malathion further supported our previous results from confocal microscopy. In the CTL and Mal 0.1 groups the islets display preserved basement membrane capsule and preserved cellular morphology, with membrane blebbing only visible in the Mal 0.1 islets. However, islets from the Mal 0.5 and Mal 1.0 groups displayed degeneration of the enveloping capsule and loss of plasma membrane integrity (Fig. 2).

3.3 Ultrastructural outcomes of β - and α -cells exposed to different concentrations of malathion *ex vivo*

Our transmission electron microscopy (TEM) images from islets exposed to malathion, show that even at the lowest concentration, the β - and α -cells exhibited signs of cell damage and increased autophagy (Fig. 3). This contrasts with our results of cell viability, where no increase in cell death was observed at the lowest concentration (Fig. 1B). When analysing our TEM images, cells exposed to malathion displayed membrane blebbing, as well as permeabilization of the plasma membrane when exposed to higher concentrations of malathion (Mal 0.5 and Mal 1.0) (Fig. 3A). A shift in mitochondrial morphology was observed with the increase in the concentration of malathion, with an apparent mitochondrial fragmentation, and membrane permeabilization and matrix dissolution in the Mal 0.5 and Mal 1.0 groups (Fig. 3B). At the lowest concentration (Mal 0.1), a more pronounced formation of autophagic vesicles was observed in α -cells compared to β -cells (Fig. 3A). At the higher concentrations (Mal 0.5 and Mal 1.0) an increase in the perinuclear space was observed in the different cell types (Fig. 3A). An increased number of α -cells displayed condensation of the chromatin in the Mal 0.1 group compared to the β -cells of the same group, whereas all cell types displayed a superior number of pyknotic and necrotic nuclei at the Mal 0.5 and Mal 1.0 groups (Fig. 3A).

3.4 Viability of RINm5F insulin-producing cells exposed to different concentrations of Malathion

Figure 4 (A, B and C) shows a concentration/response curve of cells exposed to malathion where the percentage of viable cells was calculated relative to the CTL group. After performing the cell viability test by the MTT reduction method, no significant differences in cell viability were observed at concentrations lower than 1 μ M of the compound after 3 h of exposure (Figure 4A). However, a significant decrease in the viability of RINm5F insulin-producing cells was clearly observed after 24 h of exposure (Fig. 4B). This effect is more intensely observed after exposure for 48 h (Fig. 4C). The concentration of the pesticide that inhibits 50% of cell viability (iC_{50}) was estimated at 1.2 μ M at 24 h of exposure and 0.9 μ M at 48 h of exposure. This indicates a time and concentration effect of malathion, dispelling a non-specific effect of the pesticide.

3.5 Electrophysiological recording in pancreatic β - and α -cells

Our electrophysiology experiments show that the acute exposure (1 h) of pancreatic mouse α - and β -cells to ≈ 3 nM malathion did not affect voltage-gated K^+ (K_v) currents in these cells (data not shown). However, chronic exposure for 24 h led to increased K_v currents in pancreatic α -cells without apparent effects on mouse β -cells (Fig. 5A-D).

4 Discussion

Chronic exposure to high concentrations of glucose and fatty acids can damage different cell types, including pancreatic islet cells, by a variety of mechanisms (Kaneto et al., 2022; Lenzen, 2008). Pancreatic β -cells are vulnerable cells regarding injuries (Gerber e Rutter, 2017; Lenzen, 2008). This study aimed to evaluate the direct effects of malathion on islets cells and our main findings were that acute exposure to toxic malathion concentration reduced the viability of pancreatic islet cells and promoted signs of α - and β -cells damage. We also demonstrated that at non-toxic concentrations malathion affected β -cell viability and α -cell electrophysiological properties in a time-dependent manner.

The number of studies with malathion exposure evaluating its impact on glucose metabolism are limited but seemed to be consensual that acute (Da Luz Abreu et al., 2019; Rezg et al., 2008, Rodrigues et al PMID3792264) or chronic (Abdollahi et al., 2004; Lasram et al., 2015; Panahi et al., 2006; Pournourmohammadi et al., 2007) malathion administration at high doses impact murine glucose homeostasis and insulin action. Studies using pancreatic islets to better understand how the exposure to this pesticide induces these outcomes are even fewer. These studies, however, show that malathion exposure impairs insulin release and antioxidant status in pancreatic islets (Panahi et al., 2006; Pournourmohammadi et al., 2007). We demonstrated reduced islet cell viability with macroscopic alterations in islet morphology (degeneration of the basement membrane capsule) at the highest concentrations (0.5 and 1 mM). This observation is important since a correlation has been made between loss of the islet basement and insulinitis (Korpos et al., 2013), which might support the reduced viability caused by the high malathion concentrations observed in our islets. Nonetheless, in the lowest concentration of malathion (0.1 mM) the formation of membrane blebs were observed, suggesting that

the cells in this concentration might have been in early apoptosis, as previously reported in a fish cell line exposed to even lower concentrations of malathion (70 μ M) for 48 hours (Chen et al., 2006). The formation of membrane blebs is involved in cell migration and apoptosis. In apoptosis, it plays an important role in the packaging of cellular debris, phagocytic markers involved in cell communication, as well as the formation of apoptotic bodies (Aoki et al., 2020).

To better understand the effects of malathion over islet cell viability, we investigated the ultrastructural changes resultant of malathion exposure in the different cell types of the pancreatic islets, specifically pancreatic α - and β -cells. Our TEM images revealed increased vacuolisation and the presence of autophagic vesicles in the malathion-treated cells, an effect previously reported in neuroblastoma cells, in which increased autophagy was described after malathion exposure in concentrations of 0.25 and 1 mM, in line with the concentrations used in our *ex vivo* experiments, but for a longer period of 8 hours (Venkatesan et al., 2017). A well reported effect of malathion is the induction of oxidative stress, leading to mitochondrial dysfunction and cell death (Pournourmohammadi et al., 2007; Karami-Mohajeri et al., 2014; Ouardi et al., 2019; Hosseini et al., 2021). In our study, malathion exposure led to mitochondrial fragmentation, alteration to a spheric morphology, and matrix dissolution at the highest concentrations (0.5 and 1 mM). The mitochondrial alterations caused by malathion exposure are similar to those induced *in vivo* in β -cells exposed to another organophosphate pesticide called Endosulfan, where a spheric and hypertrophic morphology was reported (Kalender et al., 2004), as well as being similar to the mitochondrial morphology seen in individuals with T2D, which is explained by adaptations to counteract the ROS formation and overcome the oxidative stress present in this pathology (Anello et al., 2005).

Environmental contaminants are known to be additional risk factors for the development of diabetes (Hectors et al., 2011), but the relationship between the two phenomena is not yet well established. One of the hypotheses is that compounds may actively contribute to the development and/or progression of the disease or that people with diabetes have a reduced ability to excrete or metabolize pollutants to which they are exposed (Pournourmohammadi et al., 2007). In fact, oxidative stress has been described as an outcome of human exposure to malathion (Medithi et al.,

2020), and might be a contributor to the correlation of malathion blood concentration and insulin resistance, already described (Raafat et al., 2012).

In addition to the induction of oxidative damage, one of the described effects of organophosphate pesticides is the endoplasmic reticulum (ER) stress (Hagar et al., 2002). This effect may result of increased oxidative damage, leading to lipid peroxidation (Akhgari et al., 2003; Ouardi et al., 2019), amounting to increased cytoplasmic Ca^{2+} levels (Chen et al., 2006). In our results, dilations of the perinuclear space and the ER could be observed in the malathion-treated cells. This may suggest that the malathion-treated cells were undergoing oxidative damage and ER stress, although the quantification of molecular markers for both injuries would be necessary to confirm these statements.

The exposure period is an important component of malathion toxicity, where effects that are not observed in acute exposure become evident in sub chronic and chronic periods of exposure (Xiang e Rodgers, 1997). Considering this, we performed *in vitro* experiments with insulin-producing cells (RINm5F cell-line), using a higher exposure period and lower concentrations of malathion. As a result, a time/concentration hazardous effect of malathion was demonstrated in this study. Non-toxic concentrations of malathion, in the range of 10 nM, induced a clear impact in RINm5F cells viability, contrasting with our results of acute pancreatic islet exposure. The difference in the effects obtained with different times of exposure can be explained by the metabolism of the malathion molecule by CYP enzymes, such as CYP3A2, CYP1A6, and CYP2B6 (Buratti et al., 2005; Galántai et al., 2011), generating metabolites with more pronounced cytotoxic effects (Rieger et al., 2017; Xiang e Rodgers, 1997). However, as we did not quantify either the protein abundance of the CYP enzymes involved in malathion metabolization or the levels of any metabolites in treated cells, we cannot ascertain that the difference in cell viability in the different incubation periods occurs through this specific mechanism.

Although there is still no consistent data on immortalised pancreatic β cells, there is evidence suggesting toxic effects of malathion on others cell types (Moore et al., 2009; Shafiee et al., 2010). Malathion may cause an increase in intracellular Ca^{+2} in pancreatic β cells, which could cause a loss of function of the Ca^{+2} /calmodulin-dependent protein kinase, involved in the regulation of insulin secretion (Panahi et al., 2006). The increase in intracellular Ca^{2+} levels has been previously described as

a mechanism of toxicity in RINm5F cells induced by arsenic, another environmental contaminant, and results of oxidative damage and ER stress, leading to cell death (Lu et al., 2011).

It becomes evident that malathion may disrupt intracellular ionic balance, specifically Ca^{2+} homeostasis, through a series of mechanisms relating to ultrastructural alterations and apoptosis (Chen et al., 2006; Panahi et al., 2006). Likewise, it has been demonstrated in several cell types including neurons and pancreatic β cells that cell shrinkage mediated by K^+ efflux through K_v channels is an early event of apoptosis, and that this step may take place before ultrastructural and biochemical changes (Kim et al., 2012; Remillard e Yuan, 2004). Indeed, cell death has been associated with enhanced K_v currents in rat INS-1 and mouse MIN-6 cells as well as in primary islets from human, rat and mice (Kim et al., 2012; Yao et al., 2013; Zhou et al., 2018, 2016). According to the ultrastructural image analysis and viability assays, pancreatic β cells were sensitive to the acute and chronic exposure of malathion, leading to significant signs of cell death and apoptosis at later steps of this process. A similar outcome was obtained in pancreatic α -cells. Electrophysiological experiments were performed in isolated islet cells. To obtain an optimal seal for the electrophysiological recordings, patch-clamp was only performed in those islet cells with a smooth membrane and with no signs of shrinkage or rough membrane that could preclude or interfere with the optimal recording of currents. Thus, in this experimental setting our experiments are likely reflecting the effect of malathion at very initial steps in pancreatic islet cells. Therefore, overall the electrophysiological results indicate that pancreatic α -cells might be more sensitive to malathion-induced changes in K_v currents and apoptosis, while β -cells seem to be more resilient to this process, and might involve other alternative or additional pathways (Kim et al., 2012; Remillard e Yuan, 2004).

It is important to highlight we did not demonstrate the effect of pure malathion. Instead we opted by the formulation containing malathion; the one with the highest concentration form available in the market as described before. Whether by on side it can fragilize our conclusion due to presence of other unknown ingredients, by other side it is the commercial available formulation where farmworkers, home-garden applicants, public/zoonosis control sector applicants, and virtually all people that are indirectly contaminated by the malathion are exposed.

5 Conclusions

Our study has demonstrated that the acute exposure to malathion results in lower viability in pancreatic islets of rats accompanied by ultrastructural alterations in pancreatic α - and β -cells. Additionally, a time/concentration effect of malathion is observed, where although in the acute exposure the pancreatic islets sustain cell viability in the lowest concentration, when exposed for a longer period, reduces cell viability and electrophysiological impairments as observed in RINm5F cells and primary mouse α -cells, respectively. The α cells are more sensitive to the toxic effects of malathion, considering the ultrastructural and electrophysiological impairments observed in this cell type, the latter of which was not seen in primary mouse β cells. Thus, the endocrine pancreas is a susceptible tissue for malathion toxicity further explaining how the exposure to this environmental contaminant may relate to the development of diabetes.

6 Appendices

Figure 1

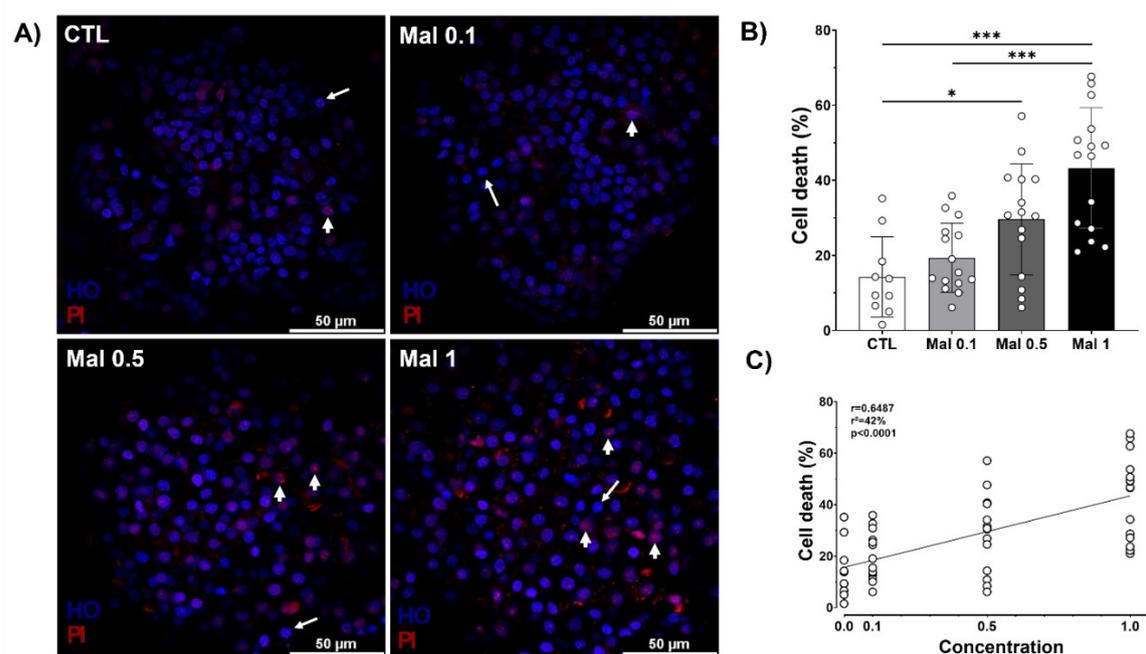


Figure 1. Acute exposure to malathion reduces cell viability of pancreatic islet cells. (A) Confocal microscopy images showing representative pancreatic islets of rats exposed to malathion in different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM). (HO) Hoechst-stained nuclei displayed in blue and (PI) propidium iodide nuclei displayed in red. Arrows indicate viable nuclei with only HO staining, and arrowheads indicate necrotic nuclei with co-localization of HO and PI. (CTL) Control islets treated with vehicle (Krebs + 1% DMSO). (B) Quantification of cell death in the confocal images, in 3 separate fields in the Z axis of 15 different islets exposed to different concentrations of malathion. Cell death is

expressed as percentage and calculated according to the following equation: necrotic nuclei (%) = $((\text{IP-stained nuclei} \times 100) / (\text{total of nuclei}))$. (n=10-15 islets/groups, one-way ANOVA, followed by Tuckey's test, $p < 0.0001$). (C) Correlation between the concentrations used for the islet exposure experiments and the percentage of cell death (n=10-15 islets/group, linear regression, $p < 0.0001$). Results are expressed as mean \pm SD, ns $p > 0.05$, post-hoc comparisons: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Figure 2

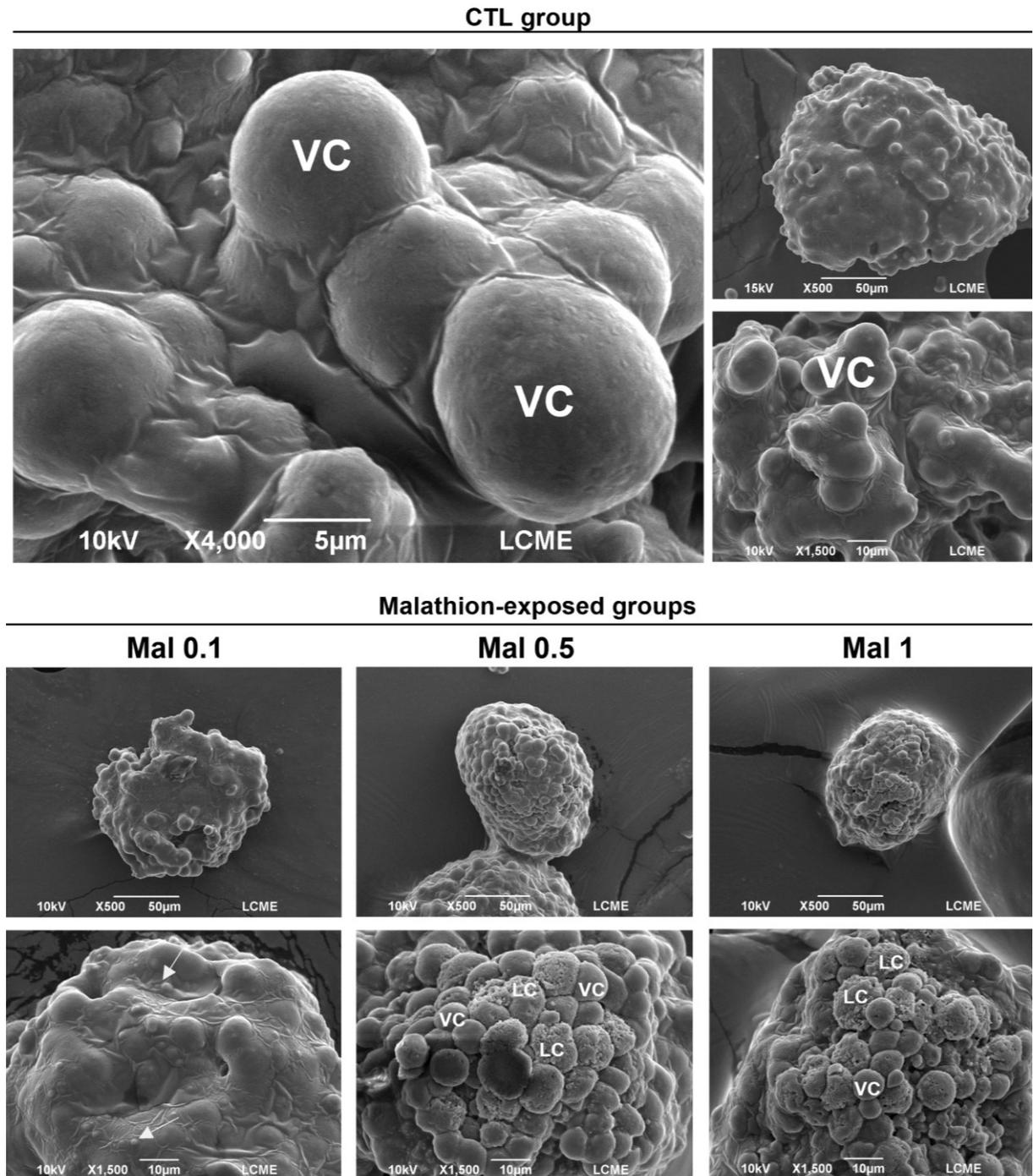


Figure 2. Malathion effects over the structural integrity of exposed pancreatic islets. Scanning electron microscopy images of isolated pancreatic islets exposed to different concentrations of Malathion (0.1, 0.5 and 1 mM) for 1 h. (LC) indicates lysed cells and (VC) indicates viable cells, white arrows point to membrane blebs. (n=150-200 islets/group).

Figure 3

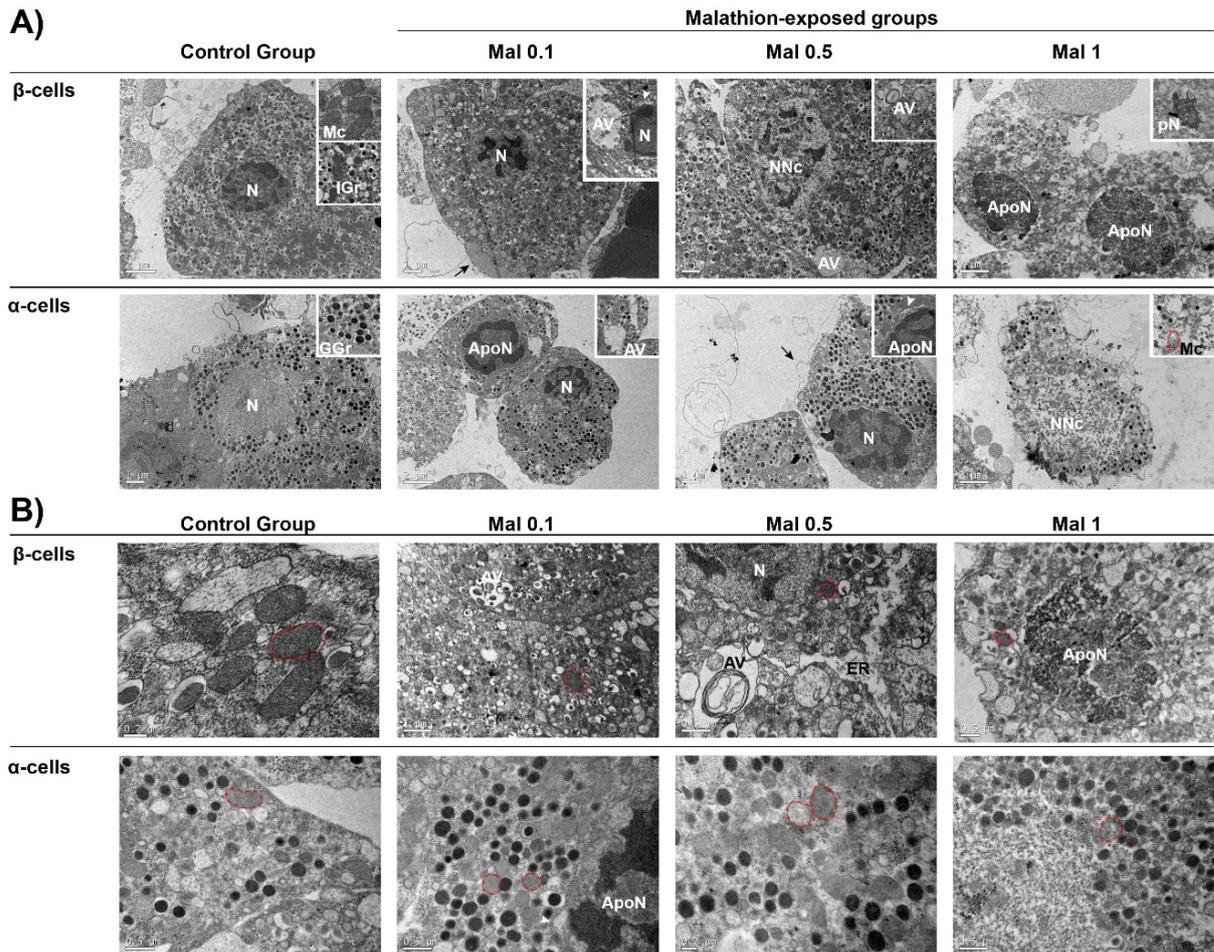


Figure 3. Ultrastructural alterations caused by malathion exposure in pancreatic islet cells. Transmission electron microscopy images of **(A)** cell phenotype and **(B)** intracellular components morphology observed in pancreatic and β and α cells from isolated islets exposed to malathion in different concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM) for 1 h. (ApoN) indicates apoptotic nuclei, (AV) indicates autophagic vesicles, (ER) refers to endoplasmic reticulum, (GGr) refers to glucagon granules, (IGr) refers to insulin granules, (Mc) and red circles point to mitochondria, (N) indicates normal nuclei, (NNc) indicates necrotic nuclei, and (pN) shows a pyknotic nucleus. Black arrows point to membrane blebs and white arrowheads point to dilated perinuclear space. (n=3/group).

Figure 4

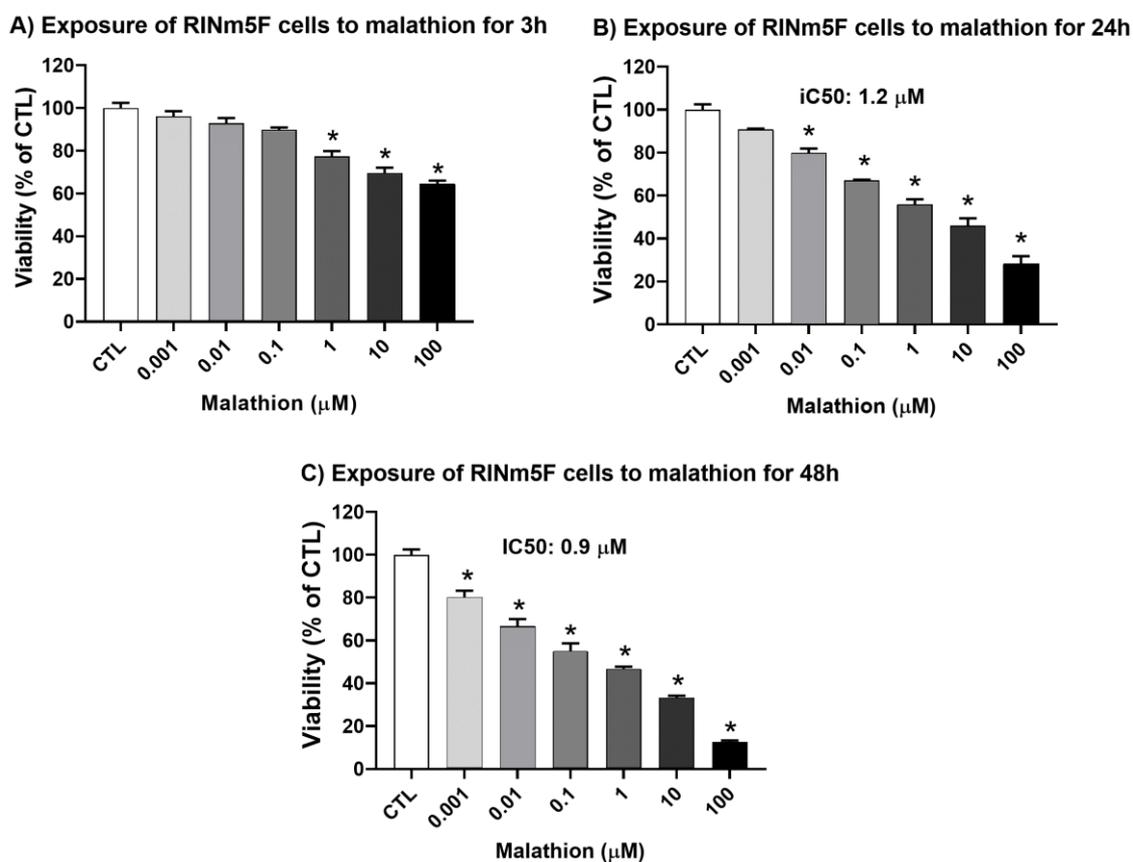


Figure 4. Malathion reduced the RINm5F cell viability. Cell viability after exposure for 3 h (A), 24 h (B) and 48 h (C) to increasing concentrations of malathion compared to cells cultured in the absence of the compound (CTL). Data showed as percentage of the CTL, obtained in the spectrophotometric reader at 570 nm. Results are expressed as mean percentage of viability \pm SD and analysed by ANOVA followed by Bonferroni, ns $p > 0.05$, post-hoc comparisons: $*p < 0.05$. Data are representative of five independent experiments in quadruplicates.

Figure 5

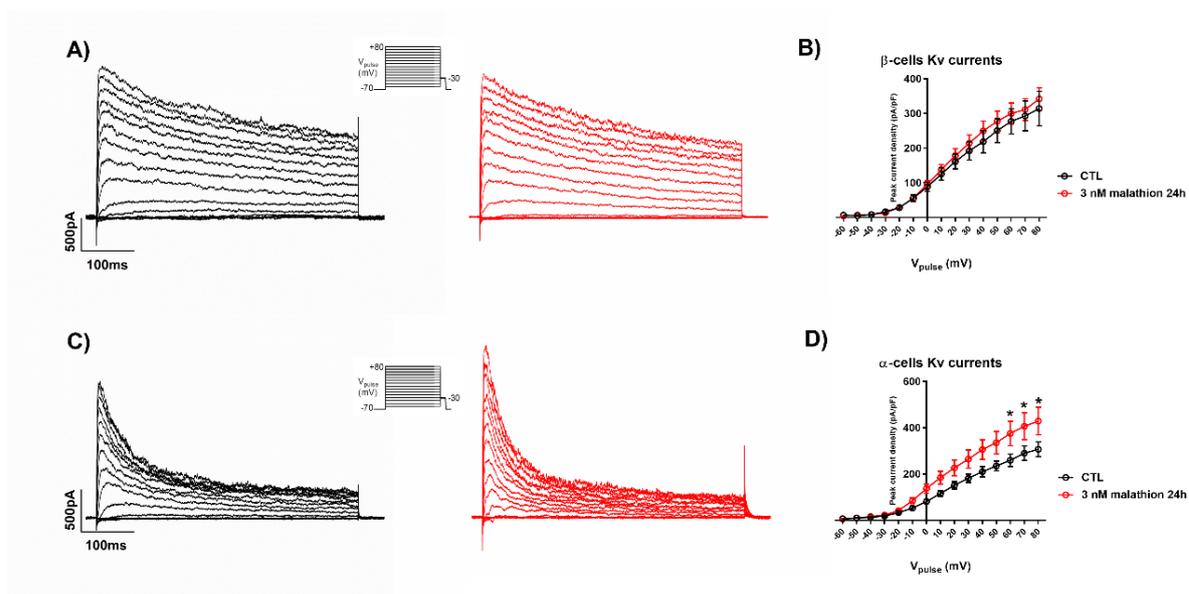


Figure 5. Electrophysiological impairments induced by malathion exposure in pancreatic β and α cells. (A) Representative recordings of K^+ currents in response to depolarising voltage pulses (-60 mV to $+80$ mV from a holding potential of -70 mV, 500 ms duration, inset) in pancreatic β -cells treated with vehicle (black trace) or 3 nM malathion (red trace) for 24 h. (B) relationship between K^+ current density (K^+ currents in pA normalised to the cell capacitance in pF) and the voltage of the pulses in pancreatic β cells. Control (CTL) ($n = 9$) and malathion ($n = 16$). (C) Representative recordings of K^+ currents in response to depolarising voltage pulses (-60 mV to $+80$ mV from a holding potential of -70 mV, 500 ms duration, inset) in pancreatic α cells treated with vehicle (black trace) or 3 nM Malathion (red trace) for 24 h. (D) relationship between K^+ current density (K^+ currents in pA normalised to the cell capacitance in pF) and the voltage of the pulses in pancreatic α cells. Control ($n = 14$) and malathion ($n = 5$). *CTL vs. 3 nM malathion; * $p < 0.05$, two-way ANOVA.

7 References

- Abdelli, S., Abderrahmani, A., Hering, B.J., Beckmann, J.S., Bonny, C., 2007. The c-Jun N-terminal kinase JNK participates in cytokine- and isolation stress-induced rat pancreatic islet apoptosis. *Diabetologia* 50, 1660–1669. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0704-2>
- Abdollahi, M., Donyavi, M., Pournourmohammadi, S., Saadat, M., 2004. Hyperglycemia associated with increased hepatic glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 137, 343–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.03.009>

- Aguilar-Garduño, C., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Rodríguez-Barranco, M., Hernández, A.F., Bassol, S., González-Alzaga, B., Cebrián, M.E., 2013. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. *Toxicology* 307, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.11.001>
- Akhgari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R., Sabzevari, O., 2003. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 205–211. <https://doi.org/10.1191/0960327103ht346oa>
- Anello, M., Lupi, R., Spampinato, D., Piro, S., Masini, M., Boggi, U., Del Prato, S., Rabuazzo, A.M., Purrello, F., Marchetti, P., 2005. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 48, 282–289. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1627-9>
- Aoki, K., Satoi, S., Harada, S., Uchida, S., Iwasa, Y., Ikenouchi, J., 2020. Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb. *Mol. Biol. Cell* 31, 833–844. <https://doi.org/10.1091/MBE19-12-0691>
- Ashcroft, F.M., Rorsman, P., 2013. KATP channels and islet hormone secretion: New insights and controversies. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 660–669. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.166>
- Brissova, M., Fowler, M.J., Nicholson, W.E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1087–1097. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>
- Buratti, F.M., D’Aniello, A., Volpe, M.T., Meneguz, A., Testai, E., 2005. Malathion bioactivation in the human liver: The contribution of different cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab. Dispos.* 33, 295–302. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.001693>
- Chen, X.Y., Shao, J.Z., Xiang, L.X., Liu, X.M., 2006. Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 142, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.010>

- Da Luz Abreu, E., Savall, A.S.P., Boneberg, A.A., Martins, B.B., Gervini, V.C., Sampaio, T.B., Fajardo, A.R., Paroul, N., Roos, D.H., Pinton, S., 2019. (3Z)-5-Chloro-3-(Hydroxyimino)indolin-2-one attenuates hyperglycemia, increased hepatic glycogen content and hepatic damage induced by malathion acute exposure in rats. *Nutr. Metab.* 16, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12986-019-0374-3>
- Da Silva Xavier, G., 2018. The cells of the islets of langerhans. *J. Clin. Med.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- Donley, N., 2019. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 18, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0488-0>
- Galántai, R., Emody-Kiss, B., Somosy, Z., Bognár, G., Horváth, G., Forgács, Z., Gachályi, A., Szilasi, M., 2011. Does malaoxon play a role in the geno- and cytotoxic effects of malathion on human choriocarcinoma cells? *J. Environ. Sci. Health. B.* 46, 773–779. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.597703>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K.B., Ostolaza, H., Martín, C., 2020. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Gerber, P.A., Rutter, G.A., 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxidants Redox Signal.* 26, 501–518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>
- Hagar, H.H., Azza H, Fahmy, 2002. A biochemical, histochemical, and ultrastructural evaluation of the effect of dimethoate intoxication on rat pancreas. *Toxicol. Lett.* 133, 161–170. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00128-5)
- Hectors, T.L.M., Vanparys, C., Van Der Ven, K., Martens, G.A., Jorens, P.G., Van Gaal, L.F., Covaci, A., De Coen, W., Blust, R., 2011. Environmental pollutants and type 2 diabetes: A review of mechanisms that can disrupt beta cell function. *Diabetologia* 54, 1273–1290. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2109-5>
- Hoorens, A., Van De Castele, M., Klöppel, G., Pipeleers, D., 1996. Glucose promotes survival of rat pancreatic β cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J. Clin. Invest.* 98, 1568–1574.

<https://doi.org/10.1172/JCI118950>

- Hosseini, S.A., Zarandi, A.F., Karami-Mohajeri, S., 2021. Effects of malathion exposure on glucose tolerance test in diabetic rats; emphasis on oxidative stress and blood concentration of malathion by gas chromatography mass spectrometry. *Anal. Methods Environ. Chem. J.* 4, 60–71. <https://doi.org/10.24200/amecj.v4.i02.141>
- Hoyeck, M.P., Matteo, G., MacFarlane, E.M., Perera, I., Bruin, J.E., 2022. Persistent organic pollutants and β -cell toxicity: a comprehensive review. *Am. J. Physiol. Metab.* 322, E383–E413. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00358.2021>
- IDF, 2021. IDF Diabetes Atlas 10th edition, 10^o ed, International Diabetes Federation.
- Kalender, Y., Kalender, S., Uzunhisarcikli, M., Ogutcu, A., Açikgoz, F., Durak, D., 2004. Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. *Toxicology* 200, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.03.017>
- Kaneto, H., Kimura, T., Shimoda, M., Obata, A., Sanada, J., Fushimi, Y., Matsuoka, T., Kaku, K., 2022. Molecular Mechanism of Pancreatic β -Cell Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomedicines* 10, 818. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040818>
- Karami-Mohajeri, S., Hadian, M.R., Fouladdel, S., Azizi, E., Ghahramani, M.H., Hosseini, R., Abdollahi, M., 2014. Mechanisms of muscular electrophysiological and mitochondrial dysfunction following exposure to malathion, an organophosphorus pesticide. *Hum. Exp. Toxicol.* 33, 251–263. <https://doi.org/10.1177/0960327113493300>
- Kim, S.J., Widenmaier, S.B., Choi, W.S., Nian, C., Ao, Z., Warnock, G., McIntosh, C.H.S., 2012. Pancreatic B-cell prosurvival effects of the incretin hormones involve post-translational modification of Kv2.1 delayed rectifier channels. *Cell Death Differ.* 19, 333–344. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.102>
- Korpos, É., Kadri, N., Kappelhoff, R., Wegner, J., Overall, C.M., Weber, E., Holmberg, D., Cardell, S., Sorokin, L., 2013. The peri-islet basement membrane, a barrier to infiltrating leukocytes in type 1 diabetes in mouse and human. *Diabetes* 62, 531–542. <https://doi.org/10.2337/db12-0432>
- Lasram, M.M., El-Golli, N., Lamine, A.J., Douib, I.B., Bouzid, K., Annabi, A., El

- Fazaa, S., Abdelmoula, J., Gharbi, N., 2015. 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. *Gen. Comp. Endocrinol.* 215, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.10.002>
- Lenzen, S., 2008. Oxidative stress: The vulnerable β -cell. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 343–347. <https://doi.org/10.1042/BST0360343>
- Lu, T.H., Su, C.C., Chen, Y.W., Yang, C.Y., Wu, C.C., Hung, D.Z., Chen, C.H., Cheng, P.W., Liu, S.H., Huang, C.F., 2011. Arsenic induces pancreatic β -cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 201, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.019>
- MacDonald, P.E., De Marinis, Y.Z., Ramracheya, R., Salehi, A., Ma, X., Johnson, P.R.V., Cox, R., Eliasson, L., Rorsman, P., 2007. A KATP channel-dependent pathway within α cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of langerhans. *PLoS Biol.* 5, 1236–1247. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050143>
- Marroquí, L., Alonso-Magdalena, P., Merino, B., Fuentes, E., Nadal, A., Quesada, I., 2014. Nutrient regulation of glucagon secretion: Involvement in metabolism and diabetes. *Nutr. Res. Rev.* 27, 48–62. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000031>
- Medithi, S., Kasa, Y.D., Jee, B., Kodali, V., Jonnalagadda, P.R., 2020. Organophosphate pesticide exposure among farm women and children: Status of micronutrients, acetylcholinesterase activity, and oxidative stress. *Arch. Environ. Occup. Heal.* 77, 109–124. <https://doi.org/10.1080/19338244.2020.1854646>
- Moore, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2009. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* 25, 221–226. <https://doi.org/10.1002/tox.20492>
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* 91, 549–599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>
- Nili-Ahmadabadi, A., Pourkhalili, N., Fouladdel, S., Pakzad, M., Mostafalou, S.,

- Hassani, S., Baeeri, M., Azizi, E., Ostad, S.N., Hosseini, R., Sharifzadeh, M., Abdollahi, M., 2013. On the biochemical and molecular mechanisms by which malathion induces dysfunction in pancreatic islets in vivo and in vitro. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.04.003>
- Ouardi, F.Z., Anarghou, H., Malqui, H., Ouasmi, N., Chigr, M., Najimi, M., Chigr, F., 2019. Gestational and Lactational Exposure to Malathion Affects Antioxidant Status and Neurobehavior in Mice Pups and Offspring. *J. Mol. Neurosci.* 69, 17–27. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1252-6>
- 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 dehydrogenase and glucokinase. *Toxicol. Mech. Methods* 16, 161–167. <https://doi.org/10.1080/15376520500191623>
- Pluth, J.M., Nicklas, J.A., O'Neill, J.P., Albertini, R.J., 1996. Increased frequency of specific genomic deletions resulting from in vitro malathion exposure. *Cancer Res.* 56, 2393–2399.
- Pournourmohammadi, S., Ostad, S.N., Azizi, E., Ghahremani, M.H., Farzami, B., Minaie, B., Larijani, B., Abdollahi, M., 2007. Induction of insulin resistance by malathion: Evidence for disrupted islets cells metabolism and mitochondrial dysfunction. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88, 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.02.001>
- Raafat, N., Abass, M.A., Salem, H.M., 2012. Malathion exposure and insulin resistance among a group of farmers in Al-Sharkia governorate. *Clin. Biochem.* 45, 1591–1595. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.07.108>
- Ramirez-Vargas, M.A., Flores-Alfaro, E., Uriostegui-Acosta, M., Alvarez-Fitz, P., Parra-Rojas, I., Moreno-Godinez, M.E., 2018. Effects of exposure to malathion on blood glucose concentration: a meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 3233–3242. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0890-5>
- Remillard, C. V., Yuan, J.X.J., 2004. Activation of K⁺ channels: An essential pathway in programmed cell death. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 286. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00041.2003>

- Reynolds, E.S., 1963. THE USE OF LEAD CITRATE AT HIGH pH AS AN ELECTRON-OPAQUE STAIN IN ELECTRON MICROSCOPY. *J. Cell Biol.* 17, 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., Gharbi, N., 2008. Caffeic acid attenuates malathion induced metabolic disruption in rat liver, involvement of acetylcholinesterase activity. *Toxicology* 250, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.017>
- Rieger, D.K., Dos Santos, A.A., Suñol, C., Farina, M., 2017. Involvement of superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 80, 1106–1115. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357305>
- Rorsman, P., Ashcroft, F.M., 2018. Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: Of mice and men. *Physiol. Rev.* 98, 117–214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
- Shafiee, H., Mohammadi, H., Rezayat, S.M., Hosseini, A., Baeri, M., Hassani, S., Mohammadirad, A., Bayrami, Z., Abdollahi, M., 2010. Prevention of malathion-induced depletion of cardiac cells mitochondrial energy and free radical damage by a magnetic magnesium-carrying nanoparticle. *Toxicol. Mech. Methods* 20, 538–543. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.518173>
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G.P.S., Handa, N., Kohli, S.K., Yadav, P., Bali, A.S., Parihar, R.D., Dar, O.I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., Thukral, A.K., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Appl. Sci.* 1, 1–16. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Song, Yan, Chou, E.L., Baecker, A., You, N.C.Y., Song, Yiqing, Sun, Q., Liu, S., 2016. Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: A systematic review and meta-analysis. *J. Diabetes* 8, 516–532. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12325>
- Vale, A., Lotti, M., 2015. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning, 1^o ed, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X>

- Venkatesan, R., Park, Y.U., Ji, E., Yeo, E.-J., Kim, S.Y., 2017. Malathion increases apoptotic cell death by inducing lysosomal membrane permeabilization in N2a neuroblastoma cells: a model for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Cell Death Discov.* 3, 17007. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.7>
- WHO, 2016. Global Report on Diabetes, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Xiang, S., Rodgers, K., 1997. Effects of malathion metabolites on degranulation of and mediator release by human and rat basophilic cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 51, 159–175. <https://doi.org/10.1080/00984109708984019>
- Xiao, X., Clark, J.M., Park, Y., 2017. Potential contribution of insecticide exposure and development of obesity and type 2 diabetes. *Food Chem. Toxicol.* 105, 456–474. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.003>
- Yao, X.G., Chen, F., Li, P., Quan, L., Chen, J., Yu, L., Ding, H., Li, C., Chen, L., Gao, Z., Wan, P., Hu, L., Jiang, H., Shen, X., 2013. Natural product vindoline stimulates insulin secretion and efficiently ameliorates glucose homeostasis in diabetic murine models. *J. Ethnopharmacol.* 150, 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.043>
- Zhou, T., Du, M., Zhao, T., Quan, L., Zhu, Z., Chen, J., 2018. ETA as a novel Kv2.1 inhibitor ameliorates β -cell dysfunction and hyperglycaemia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 45, 1257–1264. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13011>
- Zhou, T.T., Quan, L.L., Chen, L.P., Du, T., Sun, K.X., Zhang, J.C., Yu, L., Li, Y., Wan, P., Chen, L.L., Jiang, B.H., Hu, L.H., Chen, J., Shen, X., 2016. SP6616 as a new Kv2.1 channel inhibitor efficiently promotes β -cell survival involving both PKC/Erk1/2 and CaM/PI3K/Akt signaling pathways. *Cell Death Dis.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.119>