

**PEDRO HENRIQUE COSTA NEVES**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E STATUS OXIDATIVO INDUZIDOS PELA  
EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO CLORPIRIFÓS EM *ARTIBEUS LITURATUS*  
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas

**VIÇOSA**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

N518a  
2024

Neves, Pedro Henrique Costa, 1996-

Alterações morfológicas e status oxidativo induzidos pela  
exposição subcrônica ao clorpirifós em *Artibeus lituratus*  
(Chiroptera: Phyllostomidae) / Pedro Henrique Costa Neves. –  
Viçosa, MG, 2024.

1 dissertação eletrônica (35 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Animal, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.460>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Pesticidas. 2. Toxicologia ambiental. 3. Estresse  
oxidativo. 4. Histopatologia. 5. Morcegos. I. Freitas, Mariella  
Bontempo Duca de, 1974-. II. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal. III. Título.

CDD 22. ed. 632.951

**PEDRO HENRIQUE COSTA NEVES**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E STATUS OXIDATIVO INDUZIDOS PELA  
EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA AO CLORPIRIFÓS EM *ARTIBEUS LITURATUS*  
(CHIROPTERA: PHYLLOSTOMIDAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05/03/2024

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** PEDRO HENRIQUE COSTA NEVES  
Data: 04/08/2024 12:13:53-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Pedro Henrique Costa Neves

(Discente)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARIELLA BONTEMPO DUCA DE FREITAS  
Data: 05/08/2024 11:14:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Mariella Bontempo Freitas

(Orientadora)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a meus pais, meu irmão, amigos, familiares e colegas pelo apoio e presença.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariella Bontempo Freitas pelo aprendizado, confiança e por sempre estar de portas abertas.

Aos membros da banca de avaliação Prof. Dr. Jener Sampaio Zuanon e Dr<sup>a</sup>. Manoela Maciel dos Santos Dias pelas contribuições com o trabalho e pela disponibilidade.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Animal, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal e ao Laboratório de Ecofisiologia de Quirópteros, assim como a todos os técnicos, docentes, estudantes, colegas e amigos que prestaram grande ajuda durante a realização do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

## RESUMO

NEVES, Pedro Henrique Costa, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, março de 2024.  
**Alterações morfológicas e status oxidativo induzidos pela exposição subcrônica ao clorpirifós em *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae).** Orientadora: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

O clorpirifós é um pesticida organofosforado que se configura como um dos mais utilizados no Brasil nos últimos anos. Devido a diversos aspectos fisiológicos e ecológicos, morcegos se configuram como animais silvestres que acabam entrando em contato direta ou indiretamente com pesticidas utilizados em cultivos agrícolas. Esse contato acarreta danos sobre a saúde, reprodução e conservação das espécies afetadas. O objetivo desse estudo foi mensurar os efeitos causados pela exposição oral subcrônica do clorpirifós em morcegos frugívoros neotropicais. Morcegos machos adultos da espécie *Artibeus lituratus* foram capturados com redes de neblina, e, após período de aclimatação, divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (CT) (n=7), alimentados com frutos sem tratamento e o grupo Clorpirifós (CP) (n=8), alimentados diariamente com frutos tratados com uma calda de Capataz® (ingrediente ativo clorpirifós: 480,00 g/L; 48,0% m/v) a 15mL/L (dose comercial, recomendada pelo fabricante). Após 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados e devidamente armazenados para análises do status oxidativo, histológicas e hormonais. Os resultados mostraram que a exposição ao clorpirifós causou redução da atividade enzimática da catalase (CAT) no tecido hepático, aumento da atividade de glutathione s-transferase (GST) testicular e aumento na concentração de proteínas carboniladas (PC) no tecido renal. Na histologia renal foi observado redução do epitélio tubular e da área glomerular dos animais tratados com clorpirifós, assim como aumento de ocorrência de infiltração leucocitária, congestão vascular e marginação leucocitária. Os resultados obtidos indicam que a exposição ao clorpirifós em doses ambientalmente relevantes foi capaz de gerar alterações deletérias no status oxidativo e aspectos morfológicos de morcegos frugívoros.

**Palavras-chave:** Pesticida; Ecotoxicologia; Estresse oxidativo; Histopatologia; Morcegos.

## ABSTRACT

NEVES, Pedro Henrique Costa, M.Sc., Federal University of Viçosa, March 2024.

**Morphological changes and oxidative status induced by subchronic exposure to chlorpyrifos in *Artibeus lituratus* (Chiroptera: Phyllostomidae).** Advisor: Mariella Bontempo Duca de Freitas.

Chlorpyrifos is an organophosphorus pesticide that has been among the most widely used in Brazil in recent years. Due to various physiological and ecological factors, bats are wild animals that often come into direct or indirect contact with pesticides used in agricultural crops. This contact can lead to adverse effects on the health, reproduction, and conservation of affected species. The objective of this study was to measure the effects of subchronic oral exposure to chlorpyrifos in neotropical frugivorous bats. Adult male bats of the species *Artibeus lituratus* were captured using mist nets and, after an acclimation period, were divided into two experimental groups: a control group (CT) (n=7), fed with untreated fruits, and a Chlorpyrifos group (CP) (n=8), fed daily with fruits treated with a solution of Capataz® (active ingredient chlorpyrifos: 480.00 g/L; 48.0% m/v) at 15 mL/L (commercial dose recommended by the manufacturer). After 14 days of treatment, the animals were euthanized, and tissues were collected and properly stored for analyses of oxidative status, histological, and hormonal assessments. The results showed that exposure to chlorpyrifos led to a reduction in catalase (CAT) enzymatic activity in the hepatic tissue, an increase in testicular glutathione S-transferase (GST) activity, and an increase in carbonylated protein (PC) concentration in the renal tissue. Histological examination of the kidneys revealed a reduction in tubular epithelium and glomerular area in chlorpyrifos- treated animals, as well as increased occurrence of leukocytic infiltration, vascular congestion, and leukocytic margination. The results indicate that exposure to chlorpyrifos at environmentally relevant doses can induce deleterious changes in oxidative status and morphological aspects of frugivorous bats.

**Keywords:** Pesticide; Ecotoxicology; Oxidative stress; Histopathology; Bats;

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 Autorizações.....	11
2.2 Reagentes químicos.....	11
2.3 Animais .....	12
2.4 Delineamento experimental.....	12
2.5 Massa corporal e índices teciduais .....	13
2.6 Análises do status oxidativo.....	13
2.6.1 Preparação do tecido .....	13
2.6.2 Produção de Óxido Nítrico.....	13
2.6.3 Determinação de Malondialdeído.....	14
2.6.4 Oxidação de proteínas .....	14
2.6.5 Atividade da Superóxido dismutase .....	14
2.6.6 Atividade da Catalase.....	15
2.6.7 Atividade da Glutathion S-transferase .....	15
2.6.8 Determinação de Proteína total .....	15
2.7 Análise histológica .....	16
2.8 Determinação dos níveis hormonais .....	16
2.9 Análise estatística .....	17
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
3.1 Massa corporal e índices teciduais.....	17
3.2 Status oxidativo.....	18
3.2.1 Fígado.....	18
3.2.2 Testículo .....	19
3.2.3 Rim.....	20
3.2.4 Coração.....	21
3.3 Histologia.....	22
3.3.1 Histomorfometria renal.....	21
3.3.2 Histopatologia renal.....	22
3.4 Níveis hormonais .....	24
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>30</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em função da grande capacidade produtiva agrícola, o Brasil se destaca no cenário internacional como um dos maiores produtores do setor e, ligado a isso, como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Em 2022, o peso total em toneladas de agrotóxicos e afins negociados em todo o território brasileiro foi calculado em 800,652 mil, o que representa um aumento de 11% em relação ao ano anterior (IBAMA, 2022). Desde 2008, o crescimento no consumo de pesticidas no Brasil foi de 190%, enquanto o do mercado global foi de 93% (JOLY et al., 2019). Fatores como o aumento de consumo de sementes transgênicas e resistência de pragas tem tornado os pesticidas menos efetivos, acarretando uma maior frequência na aplicação, uso de doses maiores e de misturas, e maior toxicidade dos produtos. Essas mudanças justificam também a discrepância entre o crescimento de quase 400% no consumo de pesticidas no Brasil na década de 90, enquanto houve apenas 8% de incremento de área plantada (GEORGHIOU; SAITO, 1983; SPARKS; NAUEN, 2015). Na atualidade, não apenas o consumo crescente de pesticidas no território brasileiro se faz presente como também a estagnação das políticas de controle e tolerância dos mesmos em ambientes naturais. Um exemplo disso é o limite máximo de resíduos de glifosato permitido em água potável no Brasil que é atualmente cerca de 5 mil vezes maior do que o tolerado na União Européia, enquanto o de 2,4-D é cerca de 300 vezes maior (BOMBARDI, 2017; IBAMA, 2022)

Uma das classes de pesticidas mais utilizados no mundo é a dos organofosforados (CORTINA-PUIG et al., 2010). O consumo de organofosforados se intensificou a partir da década de 70 como forma de substituir o uso de pesticidas organoclorados que acabaram sendo restringidos ou proibidos devido a sua alta toxicidade (COSTA, 2018; TORQUETTI; GUIMARÃES; SOTO-BLANCO, 2021a). Os inseticidas atuam fosforilando a enzima acetilcolinesterase (AChE) em animais, inibindo a atividade da mesma de hidrolisar a molécula do neurotransmissor acetilcolina (ACh), resultando no acúmulo dessa nas sinapses. Assim, o impulso nervoso que chega até a fenda sináptica não é interrompido, gerando uma hiper estimulação nervosa. Como resultado são geradas contrações musculares resultantes de síndrome colinérgica, que culmina em paralisia e morte do organismo alvo (COSTA, 2018; KWONG, 2002). Porém, os organofosforados

também podem apresentar certo grau de toxicidade para organismos não-alvos, como seres humanos e outros mamíferos (NASCIMENTO; MELNYK, 2016).

O clorpirifós (CP) é um dos organofosforados mais utilizados no Brasil possuindo ações inseticida, formicida e acaricida. Segundo o Relatório de Comercialização de Agrotóxicos de 2022 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o clorpirifós está entre os dez agrotóxicos mais comercializados do Brasil. Seu uso é permitido em culturas de algodão, soja, milho, café, citros, banana, maçã, dentre outras. Entretanto, resíduos de CP já foram encontrados em alimentos de culturas nas quais o uso deste pesticida é proibido no Brasil, como uva, morango, pimentão e abobrinha. Nos ciclos 2018-2019 e 2022 do Programa de Análise de Resíduos em Alimentos (PARA), o clorpirifós foi detectado em 3,1% das amostras, das quais 1,7% foram irregulares, ocupando assim o quarto lugar entre os ingredientes ativos com maior número de detecções irregulares (ANVISA, 2015). Em humanos, sua absorção ocorre pelo trato gastrointestinal, pele ou inalação (ANVISA, 2021).

Por conta de seus efeitos neurotóxicos em fetos e crianças, na última década o clorpirifós foi banido da União Européia, China e Canadá (EFSA, 2019; EPA, 2021; HUANG; CUI; DUAN, 2020; MARA, 2013; PMRA, 2021). Além disso, se encontra em tramitação o processo de proibição do uso de CP em todo o território dos EUA, enquanto na Austrália o seu uso doméstico e em espaços públicos já foi desautorizado. (APVMA, 2023; EPA, 2021). Os principais aspectos toxicológicos que levaram à reavaliação da liberação do clorpirifós estão relacionados aos efeitos: I) genotóxicos, como aberrações cromossômicas, síntese de DNA não programada e danos ao DNA causados por estresse oxidativo, e II) neurotóxicos, observados tanto em estudos *in vivo* quanto em evidências epidemiológicas que relacionam a exposição ao clorpirifós com efeitos danosos para o neurodesenvolvimento em crianças. (ANVISA, 2021; EC, 2019).

Dentre os efeitos já observados da exposição de organismos não-alvo ao clorpirifós estão toxicidade reprodutiva, anormalidades no desenvolvimento larval e embrionário, carcinogênese e alterações no sistema imune (UBAID UR RAHMAN et al., 2021). Além disso, o CP atua como desregulador endócrino, e já foram observadas alterações causadas pelo clorpirifós na síntese, concentração plasmática e expressão gênica de hormônios gonadais, tireoidianos, hipofisários, e outros (ANGELIS et al., 2009; GORE, 2001; RAWLINGS; COOK; WALDBILLIG, 2010; UMOSEN et al., 2012; VENEROSI et al.,

2012; VENTURA et al., 2016). Histopatologias e alterações morfológicas teciduais já foram observadas em diversos grupos de vertebrados em diferentes órgãos, como gônadas, fígado, cérebro e brânquias (ELMAZOU DY; ATTIA; EL-SHENAWY, 2011; EZZI et al., 2016; HOSSAIN et al., 2022; MARIGOUDAR et al., 2018; MISHRA; GOPESH; SINGH, 2022). Efeitos tóxicos como alterações na síntese de macromoléculas, impedimento da diferenciação neuronal e da transdução de sinais, desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos também são desencadeados pela intoxicação com o clorpirifós (EATON et al., 2008; SAULSBURY et al., 2009).

A avaliação do status oxidativo em ensaios toxicológicos pode ocorrer através da mensuração tanto da atividade de enzimas envolvidas nas reações de oxi-redução de espécies reativas de oxigênio (EROs) quanto de produtos resultantes do dano oxidativo celular.

A respiração celular por si só é um processo que naturalmente gera espécies reativas que desempenham papéis de sinalização celular em diversas vias. Estima-se que entre 0,1 a 4% do oxigênio utilizado no processo de respiração celular pode se converter no radical superóxido ( $O_2^-$ ). Além disso, as EROs podem também ser produzidas naturalmente nas vias de oxiredução de enzimas como xantina oxidase e NADPH oxidase, na síntese de prostaglandinas, nos processos fisiológicos de resposta imune dos leucócitos, entre outras vias bioquímicas. Entretanto, diversos elementos podem se comportar como estressores e aumentar os níveis basais de EROs, como por exemplo, pesticidas. A atuação dessas moléculas xenobióticas pode ocorrer através das reações de oxi-redução realizadas por elas ou através de alterações na vias bioquímicas da célula, como por exemplo, induzindo processos inflamatórios teciduais.

O radical superóxido tem seus níveis controlados no interior das células através da ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que é capaz de converter o radical em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Essa se apresenta como uma molécula menos reativa, podendo ser convertido naturalmente em água e gás oxigênio, reação que pode também ser catalisada pela ação da enzima catalase (CAT). Tanto o radical superóxido quanto o peróxido de hidrogênio são capazes de realizar reações de oxi-redução com ânions de ferro ( $Fe^{+2}$  e  $Fe^{+3}$ ) gerando assim o radical livre hidroxila. A enzima glutathiona s-transferase (GST) embora não tenha sua atuação ligada a uma molécula específica, atua na célula

catalisando reações de conjugação entre glutathione (GSH) e moléculas oxidadas, tornando essas mais solúveis e com maior capacidade de serem excretadas.

O desbalanço dos níveis normais das enzimas antioxidantes e das EROs é capaz de gerar danos oxidativos oriundos da reação entre os radicais e componentes celulares estruturais e funcionais. O malondialdeído (MDA) se configura como um produto final da oxidação dos lipídeos de membrana após a reação desencadeada entre os mesmos e radicais livres, principalmente a hidroxila. Além do MDA, peróxidos lipídicos e outros aldeídos de baixo peso molecular são originados a partir da peroxidação lipídica e possuem a capacidade de serem mensurados em amostras orgânicas através da sua reação com o ácido tiobarbitúrico. Outra macromolécula que pode sofrer efeitos negativos após reagir com EROs são as proteínas. Essas moléculas podem participar de diversas vias metabólicas celulares e, por isso, alterações na sua estrutura terciária são capazes de torná-las disfuncionais. A inserção de um grupo orgânico carbonil na estrutura das proteínas, gera proteínas carboniladas (PC), um indicativo de danos oxidativos decorrentes do desbalanço entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do organismo analisado.

Os morcegos são representados atualmente por 1445 espécies. No Brasil, há ocorrência de 181 espécies, o que posiciona a ordem Chiroptera como a segunda mais diversa de mamíferos no país (ABREU et al., 2021; ASM, 2021). Essa grande diversidade é refletida na variedade de morfologias, dietas e comportamentos das espécies do grupo, permitindo assim que ocupem diferentes nichos ecológicos e habitats (HOFFMASTER; VONK; MIES, 2016). Dessa forma, morcegos se apresentam como organismos capazes de oferecer diferentes serviços ecossistêmicos em todos os biomas em que ocorrem. Dentre os serviços mais estudados e com maior potencial de terem seus valores mensurados estão a polinização, dispersão de sementes e supressão de artrópodes pragas e vetores de doenças (KUNZ et al., 2011; MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005).

Em áreas florestais Neotropicais, pelo menos 549 espécies de angiospermas tem seus frutos dispersados por morcegos da família Phyllostomidae. Dentre as famílias vegetais com maior número de gêneros que apresentam dispersão de frutos por morcegos estão inclusas espécies com grande importância na regeneração florestal e sucessão vegetal, como *Solanum*, *Cecropia*, *Piper* e *Vismia* (KUNZ et al., 2011; LOBOVA; GEISELMAN; MORI, 2009; MUSCARELLA; FLEMING, 2007).

Em função de seus variados hábitos alimentares, de explorarem grandes áreas de forrageio, da alta demanda energética do vôo, e por apresentarem alta longevidade e alto consumo alimentar, fatores relacionados também à sua elevada atividade metabólica, os morcegos estão particularmente mais expostos a contaminantes ambientais que outros mamíferos silvestres. (AUSTAD; FISCHER, 1991; MENZIES et al., 2016). O contato e absorção de pesticidas por morcegos podem ocorrer de forma direta, através do consumo de água e alimento contaminados, inalação de aerossóis e absorção pela pele (TORQUETTI; GUIMARÃES; SOTO-BLANCO, 2021a). Indiretamente, os morcegos podem também entrar em contato com pesticidas através da ingestão de artrópodes presas contaminados, e no caso de lactentes, pelo consumo de leite materno contaminado (SCHMIDT et al., 2001; THIES; THIES; MCBEE, 1996). Além disso, já foi observada em morcegos a transferência de pesticidas organoclorados entre fêmeas gestantes e embriões através da placenta (THIES; MCBEE, 1994).

Nesse sentido, o estudo dos possíveis danos que os pesticidas podem causar nos morcegos é de grande relevância, uma vez que apesar de haver um consenso de que ao mesmo tempo em que os pesticidas e demais contaminantes ambientais são um risco para a sobrevivência e conservação dos morcegos, há também uma grande lacuna no entendimento dos seus reais efeitos em indivíduos expostos em condições similares às que eles encontram na natureza. Assim, o presente estudo se propôs a investigar o efeito do clorpirifós sobre diferentes parâmetros fisiológicos e morfológicos de morcegos filostomídeos expostos ao pesticida clorpirifós.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Autorização**

A pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio (SISBIO Nº 78915-1) e pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Viçosa (registro Nº 63/2021).

### **2.2. Reagentes Químicos**

Foi utilizada a formulação comercial Capataz<sup>®</sup>, que tem como ingrediente ativo o clorpirifós (480,00 g/L; 48,0% m/v) (formulação: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate), fabricado pela empresa Ourofino Agrociência (Uberaba, Minas Gerais, Brasil).

A dose comercial de Capataz<sup>®</sup> utilizada (15mL/L) foi recomendada pelo fabricante para cultura de frutas. Para diluição, foi utilizada água destilada.

### **2.3. Animais**

Morcegos machos adultos (n=15) de *Artibeus lituratus* foram coletados durante a estação chuvosa de 2022 por rede de neblina em fragmentos da Mata Atlântica, no ponto de coordenadas 20°48'07" S e 42°51'31" W, na região de Viçosa, Minas Gerais. Os animais capturados foram identificados por meio de chave de identificação de morcegos brasileiros (VIZZOTTO AND TADEI, 1973) e levados para o morcegário experimental do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa, que apresenta recintos individuais com 2m<sup>3</sup> cada (um grupo experimental por vez) e alimentados com mamões previamente pesados, água *ad libitum* e sob efeitos da temperatura ambiente e ciclo de luz natural. Antes de serem ofertadas, as frutas eram lavadas com água e sabão para retirar as impurezas. Os recintos eram visitados diariamente, durante todo o experimento, para limpeza e substituição dos alimentos e água.

### **2.4. Delineamento Experimental**

Após um período de uma semana para aclimação, os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos experimentais, sendo o grupo controle (CT) (n=7), alimentados com frutos sem tratamento e o grupo CP (n=8), alimentados diariamente com frutos tratados com uma calda de Capataz<sup>®</sup> (ingrediente ativo clorpirifós: 480,00 g/L; 48,0% m/v) a 15mL/L (dose comercial, recomendada pelo fabricante). O fruto utilizado durante o tratamento foi o mamão e as porções diárias para cada animal foram de aproximadamente 150g. Nos grupos tratados com o pesticida, o Capataz<sup>®</sup> foi diariamente diluído em água e a solução foi pulverizada de forma homogênea em toda a casca do mamão, de acordo com as concentrações e instruções fornecidas pelo fabricante. Após a secagem, as frutas foram oferecidas aos animais com a casca voltada para cima. Os

animais foram alimentados por volta das 18:00h e receberam água *ad libitum* durante todo o tempo em que permaneceram no recinto.

Após 14 dias de tratamento diário, os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical seguido por decapitação e pesados individualmente em balanças de precisão. Em seguida, o rim direito foi retirado através de incisão longitudinal mediana na região ventral dos animais, pesados, fixados em solução Karnovsky e conservados em álcool etílico 70% para as análises histológicas. Além disso, rim esquerdo, fígado, testículo esquerdo e coração foram retirados e pesados para análises hormonais e do status oxidativo. O sangue também foi coletado logo após a eutanásia, centrifugado a 1500g por 15 minutos. O soro foi separado e dividido em alíquotas de 0,5 mL. Os tecidos e soro coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a temperatura de aproximadamente -80 °C para análises posteriores.

## **2.5 Massa corporal e índices teciduais**

Fígado, testículos e rins de cada animal foram pesados em balanças de precisão. A fórmula para cálculo do índice dos órgãos foi: *peso do órgão/peso corporal total multiplicado por 100*. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

## **2.6 Análises do status oxidativo**

### **2.6.1 Preparação dos homogenatos**

Fragmentos de 150 mg cada tecido, sendo eles fígado, rim esquerdo, testículo esquerdo e coração foram homogeneizados em tampão fosfato 0,2 mol/L com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 1 mmol/L, pH 7,4, e centrifugado a 12000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido-dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST), da concentração de malondialdeído (MDA), de óxido nítrico (NO) e de proteínas totais. O pellet foi utilizado para mensuração da concentração de proteínas carboniladas (PC). As análises foram determinadas usando leitor de microplacas ELISA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) ou espectrofotômetro (UV-Mini 1240, Shimadzu, Japão).

### **2.6.2 Catalase (CAT)**

A atividade de catalase foi determinada através da taxa de degradação de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 60 mM, seguindo a metodologia de HADWAN; ABED (2016) com modificações. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi adicionada a 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (20 mmol/L) ou em 100  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio e sódio (50 mmol/L, pH 7,4) para cálculo do branco. Após 3 minutos do início da reação entre a amostra e o substrato, a mesma foi parada com a adição de 150  $\mu\text{L}$  de molibdato de amônia (32,4 mmol/L). A leitura foi realizada no leitor de microplacas a 374 nm. Simultaneamente, foi realizada a leitura da absorbância de uma curva padrão com concentrações já conhecidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cujos valores foram utilizados para conversão das concentrações lidas nas amostras. Os resultados foram expressos em unidades de catalase por miligrama de proteína (U CAT/mg proteína).

### **2.6.3 Superóxido Dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada, baseando-se na capacidade desta enzima em catalisar a reação de conversão do superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ) a peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), diminuindo assim a razão de auto-oxidação do pirogalol, seguindo a metodologia de DIETERICH et al., (2000). A leitura foi feita a 570 nm e os resultados foram expressos em unidade de superóxido dismutase por miligrama de proteína (U SOD/mg proteína).

### **2.6.4 Glutathione S-transferase (GST)**

A conjugação da glutathione reduzida (GSH) com o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (HABIG et al., 1976, adaptado). Desta atividade é descontada a reação basal obtida pela leitura da reação entre a GSH do ensaio e o CDNB, sem a presença da amostra. O ensaio enzimático de 1 minuto é realizado em uma solução mix de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, CDNB 40 mM e GSH 40 mM. Os resultados foram expressos em nmol/min/g.

### **2.6.5 Malondialdeído (MDA)**

A mensuração do malondialdeído (MDA) indica o índice de peroxidação lipídica ocorrido nas membranas celulares, já que o mesmo se forma como produto dessa reação. A determinação do MDA se baseou na capacidade desse produto de reagir com o ácido tiobarbitúrico segundo BUEGE; AUST, (1978). Para a realização da mesma foi adicionada uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  de amostra à mistura de ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0,375% e ácido clorídrico 0,25M. A mesma foi aquecida em banho-maria por 40 minutos a 90 °C, resfriado por 5 minutos no gelo, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos a 15 °C e submetida a leitura de absorvância a 540 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína.

#### **2.6.6 Proteínas carboniladas**

Grupos carbonil nas proteínas foram mensuradas segundo Levine et al. (1994). Foram utilizados os pellets resultantes da homogeneização dos tecidos. A oxidação sofrida pelas proteínas foi determinada baseado na reação dos grupos carbonil com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e mensurado através da luminescência obtida pela leitura a 374 nm. O total de proteínas carboniladas (PC) foi calculado baseado no coeficiente de extinção molar de  $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e expresso em nmol/mL.

#### **2.6.7 Óxido Nítrico**

A produção de nitrito, subproduto do óxido nítrico (NO), foi quantificada de acordo com a reação padrão de Griess. Assim, 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada amostra foi colocado em microplaca e adicionado volume igual de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N-(1-Naftil) etilenodiamina e 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (TSIKAS, 2007). A absorvância foi determinada em um leitor de microplacas a 570 nm. A conversão da absorvância em concentrações micromolares de NO foi obtida a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0–100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) e expressa como concentrações de NO ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ ).

#### **2.6.8 Proteínas totais**

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo método LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Os resultados de SOD, CAT, PC e MDA foram normatizados pela quantidade de proteína total.

## **2.7 Determinação dos níveis hormonais**

Os níveis de testosterona total e tiroxina (T4) livre foram mensurados usando alíquotas de soro sanguíneo em ensaio imunoenzimático (EIA) em microplaca, seguindo os protocolos do Teste para Determinação Quantitativa da Concentração de Testosterona Total e do Teste para Determinação Quantitativa da Concentração de Tiroxina Livre (USA Diagnostica).

## **2.8 Análises histológicas**

O rim direito e fragmentos do fígado de cada animal foram fixados em solução Karnovsky (Paraformaldeído-Glutaraldeído) por 24 horas e então colocados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos e embebidos em metacrilato de glicol (Historesin®, Leica, Alemanha). Após a inclusão, foram feitos cortes semi-seriados de 3 µm de espessura em micrótomo rotatório (RM2265®, Leica, Alemanha), com intervalos de 30µm entre eles, utilizando-se navalhas de vidro. Foram obtidos 10 cortes por fragmento que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e com azul de toluidina. As lâminas foram montadas com Entellan® (Merck) e analisadas sob microscopia de luz. Em seguida, imagens digitais foram feitas por meio do fotomicroscópio Olympus CX40 (Olympus, Tóquio, Japão), totalizando 10 imagens por animal. As imagens obtidas do rim foram analisadas morfometricamente pela contagem de interseção de pontos sobre glomérulos, espaço capsular, epitélio e lúmen dos túbulos renais, totalizando 2660 pontos por animal. Além disso, também foram mensurados a área glomerular total de 20 glomérulos por animal. Para análises histopatológicas renais, foram realizadas contagens de infiltração de leucócitos, congestão vascular e marginação leucocitária, totalizando 2660 pontos por animal. No tecido hepático os parâmetros histomorfométricos analisados foram as porcentagens de núcleo, citoplasma, vaso e mensuração do diâmetro de núcleo. As análises foram feitas por grades com 266

interseções do Software Image Pro Plus 4.5® (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) e os resultados foram expressos em %.

## 2.9. Análises estatísticas

A distribuição dos dados foi determinada pelos testes Shapiro-Wilk e Kolmogorov–Smirnov, usando o software GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram submetidos ao teste t não pareado para comparações de médias entre os grupos. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1. Massa corporal e índices teciduais

A massa de corpo total assim como os índices hepatossomático e gonadossomático se mantiveram inalterados quando feitas as comparações entre os grupos tratados e controle. O índice renal somático ( $p = 0.0481$ ) se apresentou alterado indicando diminuição da proporção entre a massa dos rins e a massa do corpo total dos animais do grupo tratado com Clorpirifós (Tabela 1).

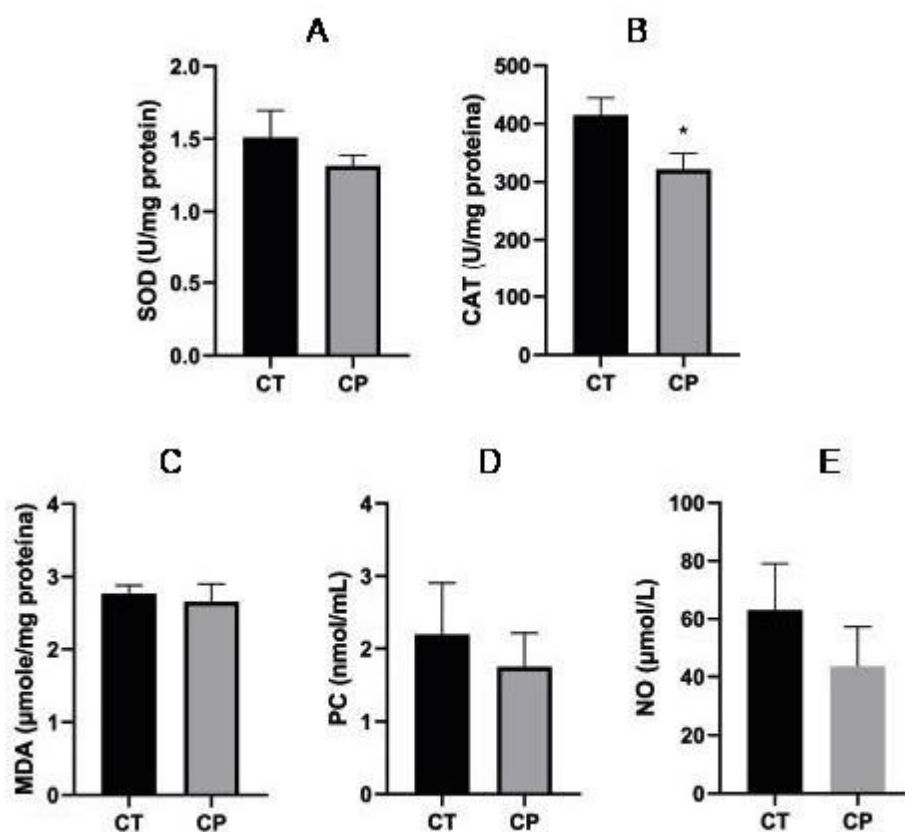
	CT	CP
<b>Massa corporal (g)</b>	68.23 $\pm$ 2.31 <sup>a</sup>	61.85 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>
<b>Índice hepatossomático (%)</b>	3.66 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>
<b>Índice gonadossomático (%)</b>	0.38 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
<b>Índice renalsomático (%)</b>	1.10 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.92 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>

Tabela 1. Massa corporal, índices hepatossomático, gonadossomático e renalsomático de morcegos *A. lituratus* dos dois grupos experimentais. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

### 3.2 Status oxidativo

#### 3.2.1 Fígado

No tecido hepático foi observada diminuição na atividade da CAT no grupo CP ( $p=0,0363$ ) em relação ao CTR (Fig. 1-B), sendo que as demais enzimas mensuradas não sofreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos (Fig. 1). Os demais parâmetros oxidativos mensurados se mantiveram inalterados.

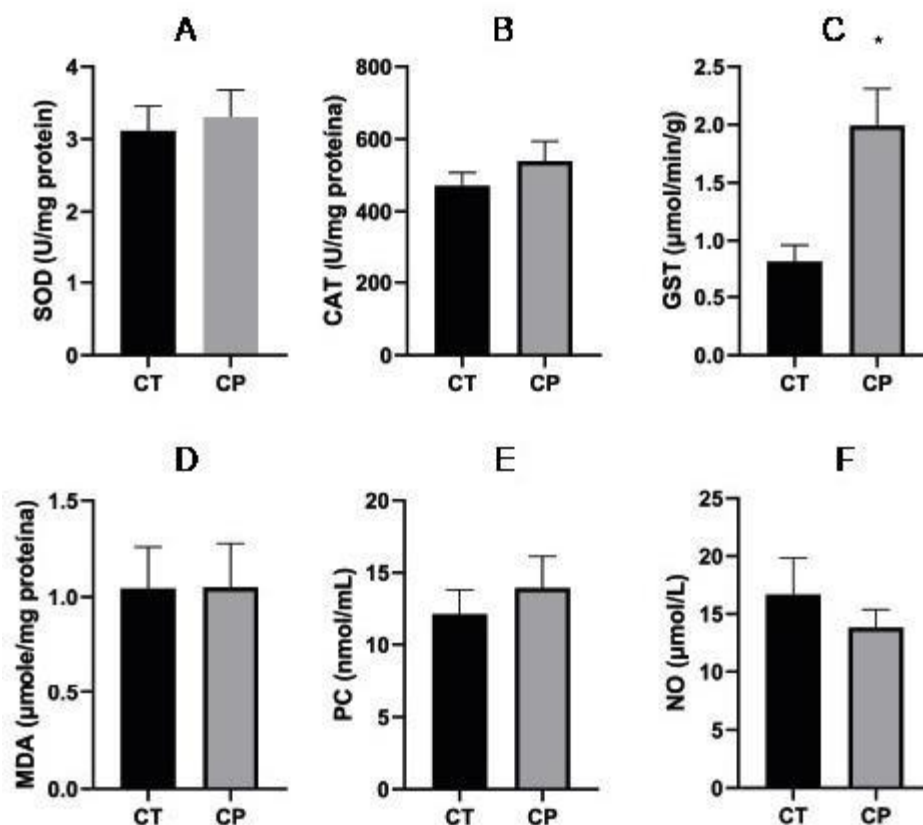


**Figura 1.** Status oxidativo do fígado de morcegos *A. lituratus* após exposição ao clorpirifós. A: Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD); B: Atividade

enzimática da Catalase (CAT); C: Malondialdeído (MDA); D: Proteínas carboniladas (PC); E: Óxido Nítrico (NO). CT: grupo Controle, CP: grupo Clorpirifós. \* *asterisco* indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### 3.2.2 Testículo

Nos testículos dos animais do grupo CP foi observado um aumento da atividade da enzima GST ( $p=0,0175$ ) quando comparado com o grupo controle (Fig. 2 - C). Os demais parâmetros não apresentaram alterações significativas após a comparação entre os dois grupos experimentais.

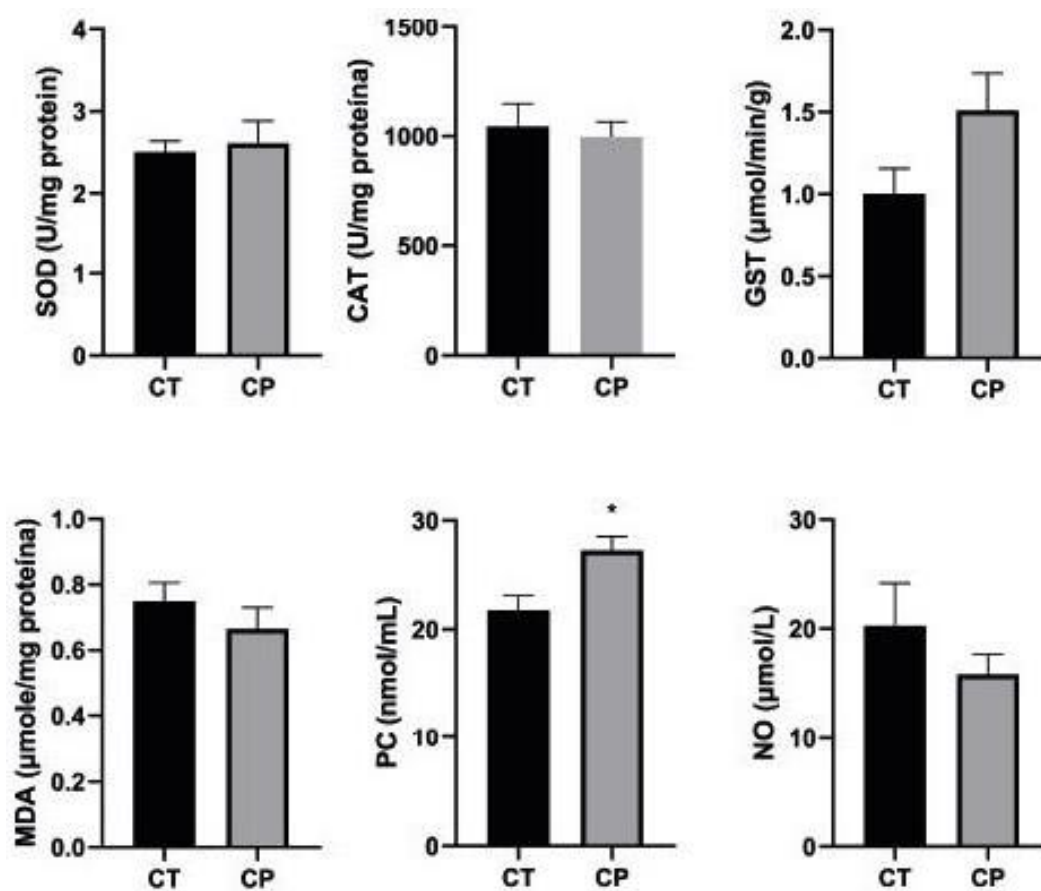


**Figura 2.** Status oxidativo do testículo de morcegos *A. lituratus* após exposição ao clorpirifós. A: Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD); B: Atividade enzimática da Catalase (CAT); C: Glutathione S-transferase (GST) D: Malondialdeído (MDA); E: Proteínas carboniladas (PC); F: Óxido Nítrico (NO). CT: grupo Controle, CP:

grupo Clorpirifós. \* *asterisco* indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### 3.2.3 Rim

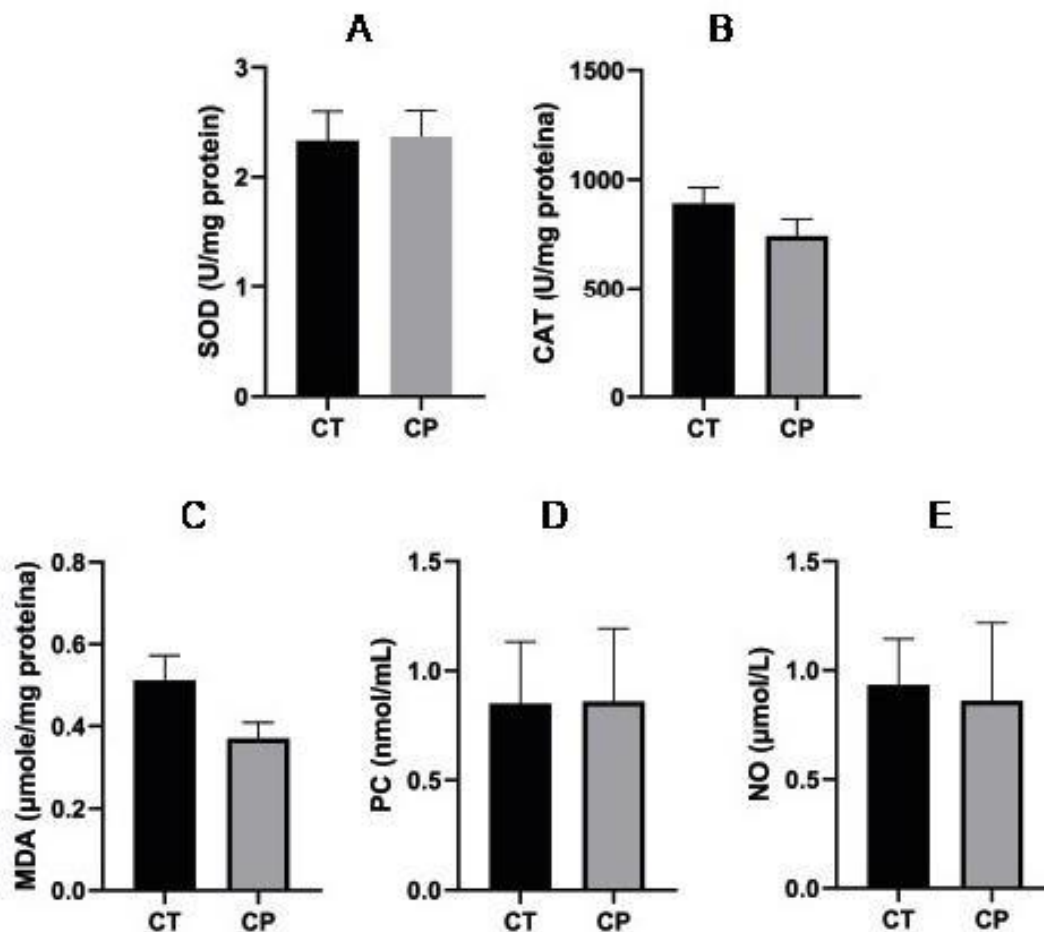
No tecido renal ocorreu o aumento da concentração de proteínas carboniladas no grupo CP ( $p=0.0114$ ) em comparação ao controle (Fig. 3 - D). Não foram observadas diferenças significativas nos demais marcadores oxidativos (Fig. 3).



**Figura 3.** Status oxidativo renal de morcegos *A. lituratus* após exposição ao clorpirifós. A: Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD); B: Atividade enzimática da Catalase (CAT); C: Glutathione S-transferase (GST) D: Malondialdeído (MDA); E: Proteínas carboniladas (PC); F: Óxido Nítrico (NO). CT: grupo Controle, CP: grupo Clorpirifós. \* *asterisco* indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM.

### 3.2.4 Coração

Não foi observada nenhuma alteração nos parâmetros analisados no coração dos animais quando comparados o grupo controle com o grupo tratado (Fig. 4).

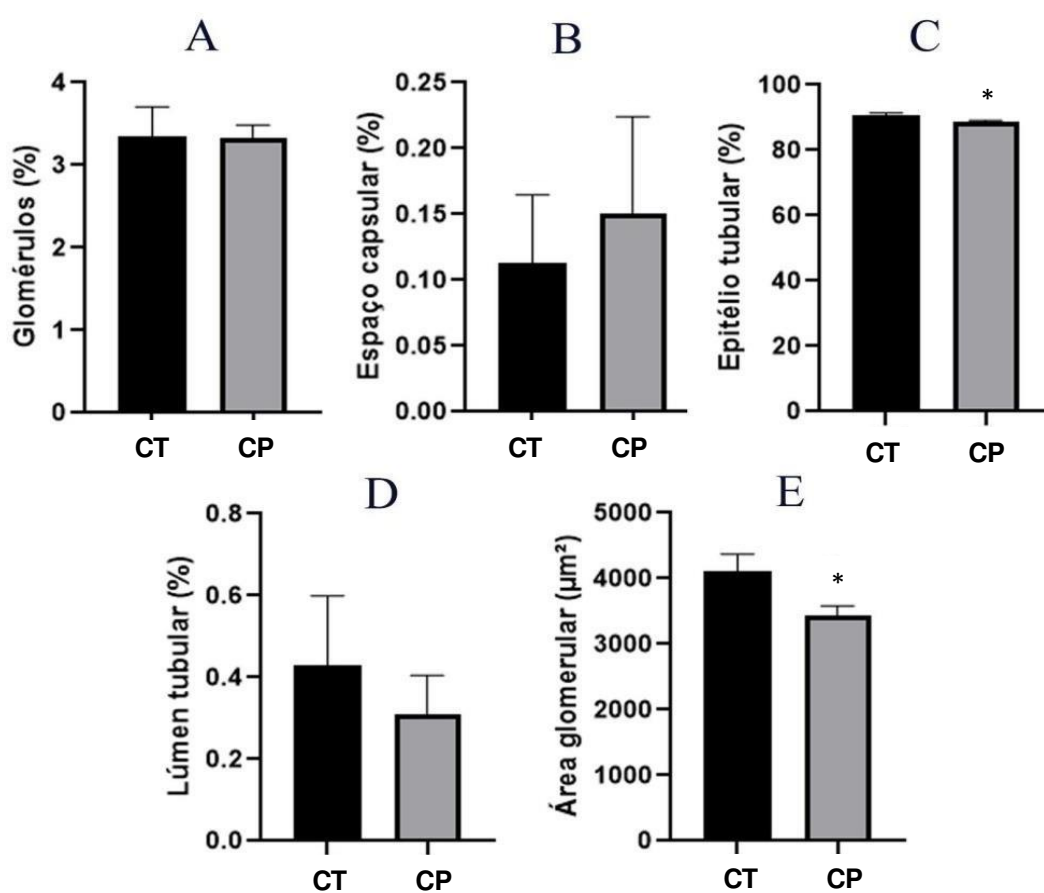


**Figura 4.** Status oxidativo do coração de morcegos *A. lituratus* após exposição ao clorpirifós. A: Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD); B: Atividade enzimática da Catalase (CAT); C: Malondialdeído (MDA); D: Proteínas carboniladas (PC); E: Óxido Nítrico (NO). CT: grupo Controle, CP: grupo Clorpirifós. \* *asterisco* indica diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM.

## 3.3 Análises histológicas

### 3.3.1 Histomorfometria renal

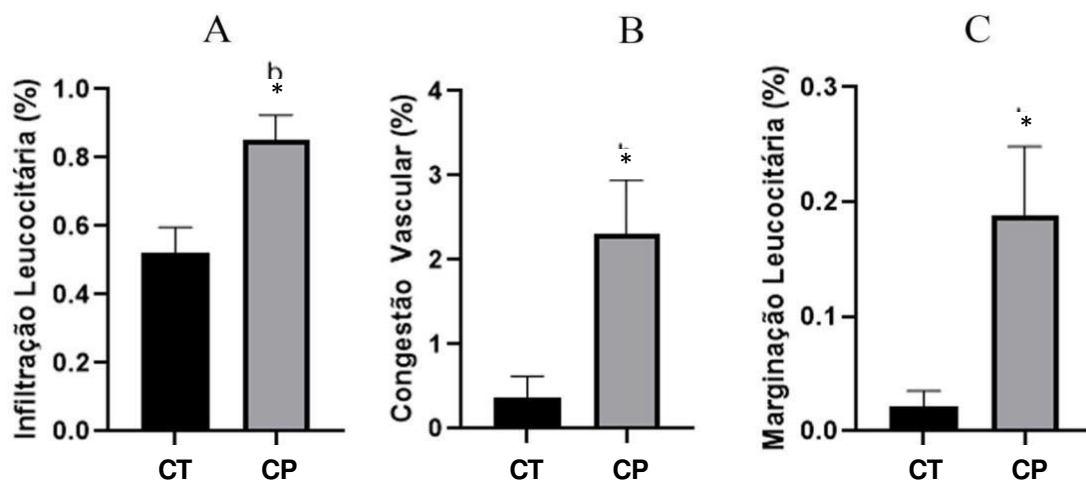
Nas análises histomorfométricas foram encontradas algumas mudanças significativas na morfologia do tecido renal de morcegos *Artibeus lituratus* expostos ao pesticida clorpirifós, quando comparados ao grupo controle (CT). Foram observadas redução na porcentagem de pontos sobre os túbulos renais ( $p=0,0246$ ) e redução na área glomerular ( $p=0,0386$ ) dos animais tratados, em relação aos animais do grupo CT. Porém, não foram observadas diferenças significativas na contagem de pontos sobre glomérulos ( $p=0,6312$ ), espaço capsular ( $p=0,6695$ ) e lúmen tubular ( $p=0,5366$ ) dos animais do grupo CP em relação ao CT (Fig.5).



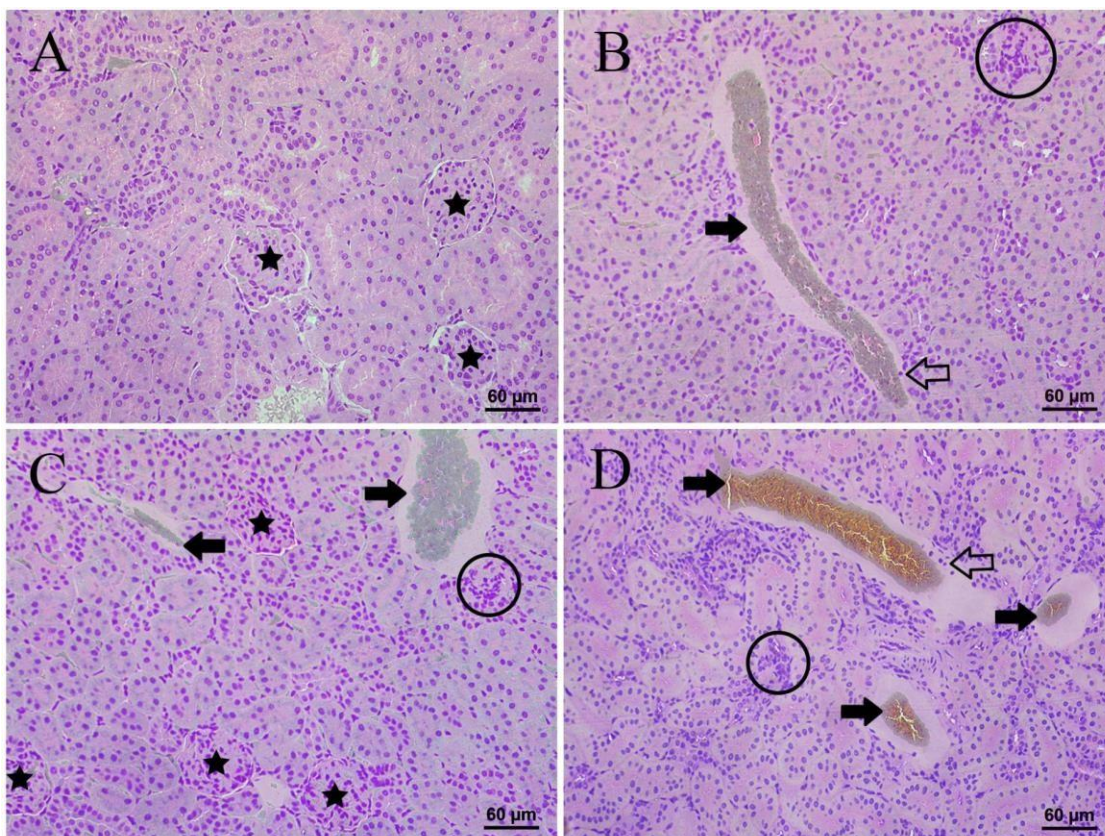
**Figura 5:** Efeitos da exposição ao clorpirifós durante 21 dias sobre parâmetros histomorfométricos no rim de *Artibeus lituratus*. A: Pontos sobre glomérulos (%), B: Pontos sobre espaço capsular (%), C: Pontos sobre epitélio tubular (%), D: Pontos sobre lúmen tubular, E: Área glomerular ( $\mu\text{m}^2$ ). \* asterisco indica diferença significativa entre os grupos CT e o grupo CP ( $p < 0,05$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM.

### 3.3.2 Histopatologia renal

Nas análises histopatológicas foram observadas um aumento significativo de pontos sobre infiltrado leucocitário ( $p=0,0082$ ), congestão vascular ( $p=0,0298$ ) e marginação leucocitária ( $p=0,0286$ ) nos animais do grupo CP, quando comparados ao grupo CT. (Fig. 6 e 7).



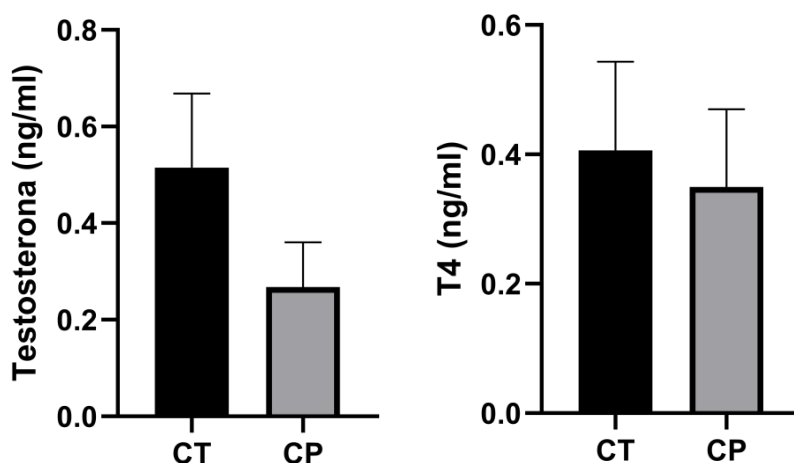
**Figura 6:** Efeitos da exposição ao clorpirifós durante 21 dias sobre parâmetros histopatológicos no rim de *Artibeus lituratus*. (A) Infiltrado Leucocitário, (B) Congestão Vascular, (C) Marginação Leucocitária. \* asterisco indica diferença significativa entre o grupo CT e o grupo CP ( $p < 0,05$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM.



**Figura 7:** Fotomicrografia do tecido renal de *Artibeus lituratus* dos grupos CT e CP. A) Grupo CT: glomérulo (asterisco); B) Grupo CP: congestões vasculares (setas pretas), marginação leucocitária (setas vazadas) e infiltrado leucocitário (círculo); C) Grupo CP: glomérulo (asterisco) e congestão vascular (seta preta) e infiltrado leucocitário (círculo); D) Grupo CP: congestões vasculares (setas pretas), marginação leucocitária (seta vazada) e infiltrado leucocitário (círculo). Coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). A barra de escala representa 60  $\mu\text{m}$ .

### 3.4 Análises hormonais

Não foram observadas alterações dos níveis de testosterona total ( $p=0,1812$ ) e de tiroxina (T4) ( $p=0,7615$ ) nos animais tratados com clorpirifós quando comparado com os do grupo controle.(Fig. 8).



**Figura 8:** Efeitos da exposição do clorpirifós sobre os níveis hormonais dos animais dos grupos controle (CT) e tratado (CP). ( $p < 0,05$ ). Os valores são a média  $\pm$  EPM.

#### 4. Discussão

Os efeitos deletérios causados por organofosforados em quirópteros já foram observados em morcegos das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae e Mormoopidae (SANDOVAL-HERRERA et al., 2023; TORQUETTI; GUIMARÃES; SOTO-BLANCO, 2021b). Dentre alguns dos efeitos relatados estão a depleção na atividade das acetilcolinesterases plasmática e cerebral, aumento de mortalidade e perda de coordenação motora (CLARK, 1986; CLARK; RATTNER, 1987). Essa classe de pesticidas é capaz também de causar alterações metabólicas em morcegos, como aumento da concentração de glicogênio muscular, aumento da concentração de lipídeos no fígado, aumento do diâmetro celular e ocorrência de vacuolização nos hepatócitos em *A. lituratus* expostos experimentalmente a doses recomendadas pelo fabricante (AMARAL et al., 2012). Metodologias de cromatografia gasosa já identificaram a presença dos organofosforados clorpirifós, diazinon e metil paration na carcaça de morcegos de vida livre. Clorpirifós e diclorvós já foram também encontrados em amostras de guano de morcegos vespertilionídeos. (EIDELS R. JOHN O. WHITAKER, 2012; EIDELS; WHITAKER JR; SPARKS, 2007). Mais recentemente, em um levantamento na Alemanha em 2022, o clorpirifós foi um dos 209 contaminantes encontrados no fígado de morcegos (SCHANZER et al., 2022). Entretanto, a incapacidade de organofosforados se bioacumularem com facilidade em tecidos orgânicos faz com que outros parâmetros sejam

utilizados para indicar o contato de animais de vida livre com esses contaminantes. Dessa forma, metodologias que investigam alterações não relacionadas diretamente ao mecanismo de ação dos organofosforados podem complementar o entendimento sobre a exposição entre estes e organismos não-alvo (ALBERS, 2002; SCHMIDT et al., 2001). Testes da atividade da colinesterase cerebral realizados com morcegos de vida livre já evidenciaram que esses animais estão expostos a organofosforados na natureza (EIDELS R. JOHN O. WHITAKER, 2012; EIDELS; WHITAKER JR; SPARKS, 2007; SANDOVAL-HERRERA et al., 2023) A ação dos organofosforados sobre a atividade da acetilcolinesterase é um fenômeno bioquímico muito específico já que poucas substâncias são capazes de causar o mesmo efeito. Em função disso, a redução dos níveis plasmáticos do neurotransmissor observada em animais de vida livre é um indicativo de que os mesmo apresentaram contaminação por essa classe de pesticida (JEBALI et al., 2013; RICHARDSON et al., 2019).

Considerando mais especificamente o pesticida clorpirifós, além das já relatadas ocorrências diretas do pesticida em morcegos, estudos experimentais determinaram a ocorrência de aumento da frequência de micronúcleos (genotoxicidade) e redução da atividade da colinesterase (neurotoxicidade) após a exposição a este contaminante. Além desses parâmetros fisiológicos, testes comportamentais já evidenciaram alterações no padrão de vôo, na memória associativa e nos reflexos motores de morcegos expostos ao pesticida (SANDOVAL-HERRERA et al., 2022, 2023).

Os resultados observados no presente estudo apresentam uma perspectiva sobre tecidos de morcegos que não estão diretamente ligados ao mecanismo de ação do clorpirifós.

O rim é um órgão que possui uma importante função na excreção e desintoxicação por meio da filtração sanguínea, sendo a principal via de eliminação de componentes tóxicos do organismo (RAMOS-H; MEDELLÍN; MORTON-BERMEA, 2020). No entanto, por receber um alto fluxo sanguíneo, o rim é alvo de substâncias químicas tóxicas que podem, a longo prazo, causar danos teciduais e conseqüentemente, nas funções renais e na homeostase do organismo (MILLER, 2002). As análises histológicas do tecido renal demonstraram alterações importantes após a exposição ao clorpirifós. A redução da porcentagem de pontos sobre os túbulos renais e da área glomerular podem indicar um encolhimento dessas estruturas, apontando uma possível degeneração tecidual como

resposta a essa exposição. Essa alteração pode também refletir a redução do índice renalsomático que os morcegos do grupo tratado com o clorpirifós apresentaram. Tais alterações podem levar a uma diminuição na TFG (Taxa de Filtração Glomerular) (OWOEYE et al., 2014). Diversos fatores podem afetar a TFG, incluindo alterações hormonais e do sistema nervoso e a autorregulação do fluxo sanguíneo renal, acarretando no reestabelecimento dos níveis basais da taxa de filtração (LEATHERBY et al., 2021). Com a filtração glomerular reduzida, é possível que ocorra retenção de toxinas que deveriam ser eliminadas pela urina, acarretando danos teciduais (OWOEYE et al., 2014), bem como maior dificuldade para manutenção da homeostase hidroeletrólítica.

As análises histopatológicas realizadas por este estudo reforçam que o tecido renal dos animais do grupo CP sofreu danos quando comparados ao grupo CT. A maior incidência de infiltrado leucocitário indica um possível processo inflamatório tecidual. O aumento da marginalização de leucócitos para o endotélio também pode ser vista como uma resposta inflamatória, pois, ao entrar em contato com o endotélio, os leucócitos tendem a migrar da luz vascular para o interstício tecidual e, ao estar dentro do tecido, os leucócitos migram para o foco inflamatório. Já o elevado número de congestionamento de vasos sanguíneos pode ter sido causado pelo comprometimento de saída do fluxo sanguíneo venoso ocasionado pelo caráter tóxico do clorpirifós.

Em conformidade com nossos resultados, ratos expostos por via oral à formulação comercial do clorpirifós (6,75 mg/kg de peso corporal) por 28 dias consecutivos, também apresentaram alterações histomorfométricas e histopatológicas em seus tecidos renais, evidenciadas pela ruptura na estrutura glomerular e degeneração tubular grave, e pela presença de necroses, congestões vasculares e intensa infiltração de células inflamatórias (KÜÇÜKLER et al., 2021). Em exposição por doses menores, porém mais longas, os resultados das análises renais também foram parecidos com os nossos achados: ratos expostos oralmente ao clorpirifós (2,5 mg/kg de peso corporal) por oito semanas, apresentaram redução e degeneração do glomérulo e dos túbulos renais, e infiltração de leucócitos (NISH; HUNDAL, 2015). Estudos envolvendo outros pesticidas da classe dos organofosforados também obtiveram resultados semelhantes: ratos expostos por inalação ao diclorvós, em doses recomendadas pelo fabricante, durante 5 semanas, também apresentaram redução no diâmetro glomerular e nas dimensões dos corpúsculos renais, o que poderia prejudicar a função glomerular de ultra-filtração (OWOEYE et al., 2014).

Os processos inflamatórios observados neste estudo são reversíveis, porém se persistissem por mais tempo, poderiam levar à morte celular (ANDERTON et al., 2020) e ocasionar danos mais severos ao tecido renal, o que comprometeria o seu funcionamento e colocaria em risco as funções de excreção e regulação osmótica ligadas ao tecido renal, essenciais à sobrevivência dos animais.

O aumento na concentração de proteínas carboniladas no rim é um indicativo da ocorrência pregressa de dano oxidativo causado pelo clorpirifós. Isso explica a ocorrência de histopatologias e alterações morfológicas observadas no tecido renal. Estudos com vertebrados indicam que os organofosforados dimetoato, malation, fenitrotona, diclorvós e diazinon também são capazes de gerar oxidação de proteínas no tecido renal de forma similar ao que ocorreu nesse estudo (AYED-BOUSSEMA et al., 2012; BUDIN et al., 2013; OYAGBEMI et al., 2018; PATIL; DAVID, 2013; VAHIDIRAD et al., 2018).

O aumento da atividade da enzima GST no testículo já foi observado em ratos submetidos a doses orais de pesticidas organofosforados, juntamente com depleção dos níveis de GSH tecidual. Entretanto, apenas quando submetidos a doses sub-agudas esses resultados foram observados (KHAN et al., 2001, 2002). Isso sugere que exposições prolongadas e com doses baixas a pesticidas dessa classe pode gerar esse tipo de alteração. Dessa forma, esse tipo de tratamento estimula a conjugação da GSH com outros compostos que poderiam gerar danos oxidativos e teciduais. Além do aumento da atividade enzimática de GST e da redução dos níveis de GSH, já foi também observado em ensaios *in vitro* com células de Leydig TM3 expostas a organofosforados o aumento da expressão de genes *Gsta1*, responsáveis pela codificação dessa enzima. De forma complementar, o aumento da concentração da enzima glutathione peroxidase (GPX) também ocorreu (CHEN et al., 2015). Essa enzima também atua de forma similar a GST, conjugando moléculas de glutathione com compostos potencialmente tóxicos para a célula.

A redução na atividade de CAT no fígado dos animais tratados com clorpirifós corrobora com resultados observados em outros estudos, indicando que, mesmo após o período de tratamento, há um desbalanço na capacidade antioxidante do tecido, ou que o pesticida pode estar afetando as vias de expressão e produção dessa enzima. A catalase está diretamente ligada na metabolização do peróxido de hidrogênio, e, sendo esse um composto tóxico para a célula, e um desequilíbrio dos níveis normais desta enzima pode indicar que danos oxidativos podem estar ocorrendo no tecido em questão.

Em relação aos efeitos do CP na regulação hormonal, foi observado que a média dos valores da concentração de testosterona dos animais do grupo CP (0,2677) foi menor que o observado nos animais do grupo controle (0,5149), embora essa diferença entre os valores não se apresente estatisticamente significativa. Ratos tratados com clorpirifós em doses bem abaixo da LD<sub>50</sub> apresentaram redução dos níveis de testosterona sérica, além de apresentarem também redução da concentração de GSH, resultado que corrobora com as análises oxidativas do presente estudo (Abdel-Razik, 2021). As possíveis explicações para diminuição nas concentrações séricas de testosterona podem estar relacionadas com mudanças no funcionamento hipofisário, gerando níveis desbalanceados de gonadotropinas e outras possíveis alterações reprodutivas (Sarkar et al., 2000). Os efeitos da exposição do clorpirifós sobre a síntese e concentração de testosterona também poderia ser explicado pela ação do 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP) sobre as vias hormonais. O TCP se configura como um metabólito final do clorpirifós em organismos, e sua presença é capaz de alterar não apenas a quantidade de testosterona produzida pelas células de Leydig mas também de reduzir os níveis de proteína *Star* (steroidogenic acute regulatory protein) e as reações de fosforilação envolvidas na síntese de hormônios esteróides. Tanto a exposição direta ao TCP, quanto a exposição direta ao clorpirifós foram capazes de causar essas alterações, evidenciando assim o efeito do pesticida sobre a capacidade reprodutiva de mamíferos (Li, et al, 2020). Entretanto, os níveis séricos de testosterona no presente estudo apresentaram uma variação alta entre animais do mesmo grupo, como pode ser evidenciado pelos valores de EPM no grupo CT (0,1535) e no grupo CP (0,0925). Essa oscilação pode estar relacionada aos aspectos fisiológicos dos animais, já que fatores como idade e ocorrência de doenças e infecções podem estar relacionadas com depleção na síntese e concentração de testosterona em mamíferos (KETCHEM; BOWMAN; ISALES, 2023).

## 5. Conclusão

Os resultados observados demonstram que a exposição subcrônica a doses ambientalmente relevantes do pesticidas organofosforados clorpirifó foi capaz de gerar prejuízos morfológicos e fisiológicos a morcegos frugívoros, especialmente dano oxidativo decorrente da oxidação de proteínas e ocorrência de histopatologias nos rins. As alterações no status oxidativo de rins, fígado e testículo e na morfologia renal são capazes de gerar

alterações em diversos tecidos e em vários níveis em animais não-alvo, podendo comprometer assim a saúde, reprodução e sobrevivência dos indivíduos, bem como a viabilidade da espécie e os serviços ecológicos que ela desempenha nos biomas, já ameaçados por fatores antrópicos nos ambientes em que ela ocorre.

## 6. Referências bibliográficas

ABREU, E. et al. **Lista de Mamíferos do Brasil, versão 2021-1 (Abril)**. Disponível em: <<https://www.sbmz.org/mamiferos-do-brasil/>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

ALBERS, P. H. **Handbook of Ecotoxicology**. [s.l.] CRC Press, 2002.

AMARAL, T. S. et al. Metabolic and histopathological alterations in the fruit-eating bat *Artibeus lituratus* induced by the organophosphorous pesticide fenthion. **Acta Chiropterologica**, v. 14, n. 1, p. 225–232, 2012.

AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. **Higher Taxonomy**. Disponível em: <<https://www.mammaldiversity.org/taxa.html>>. Acesso em: 8 ago. 2021.

ANGELIS, S. DE et al. Developmental Exposure to Chlorpyrifos Induces Alterations in Thyroid and Thyroid Hormone Levels Without Other Toxicity Signs in Cd1 Mice. v. 108, n. 2, p. 311–319, 2009.

ANVISA. **Monografia de agrotóxicos: C20 - Clorpirifós**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>>.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos - PARA. p. 2–5, 2015.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). **Documento preparatório – Reavaliação Clorpirifós**, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoainformacao/perguntasfrequentes/agrotoxicos/reavaliacao-de-agrotoxicos-2/MotivosClorpirifos.pdf>>

APVMA (AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY). Chlorpyrifos chemical review. n. December 2022, 2023.

AUSTAD, S. N.; FISCHER, K. E. Mammalian aging, metabolism, and ecology: Evidence

- from the bats and marsupials. **Journals of Gerontology**, v. 46, n. 2, 1991.
- AYED-BOUSSEMA, I. et al. Genotoxicity associated with oxidative damage in the liver and kidney of mice exposed to dimethoate subchronic intoxication. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 2, p. 458–466, 2012.
- BOMBARDI, L. M. **GEOGRAFIA DO USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E CONEXÕES COM A UNIÃO EUROPEIA**. 1. ed. São Paulo: FFLCH - USP, 2017.
- BUDIN, S. B. et al. Antioxidant activity of tocotrienol rich fraction prevents fenitrothion-induced renal damage in rats. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 2, p. 111–118, 2013.
- CHEN, G. et al. TPP and TCEP induce oxidative stress and alter steroidogenesis in TM3 Leydig cells. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 100–110, 2015.
- CLARK, D. R. Toxicity of methyl parathion to bats: Mortality and coordination loss. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 191–195, 1986.
- CLARK, D. R.; RATTNER, B. A. Orthene® toxicity to little brown bats (*Myotis lucifugus*): Acetylcholinesterase inhibition, coordination loss, and mortality. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 705–708, 1987.
- COSTA, L. G. Organophosphorus compounds at 80: Some old and new issues. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 1, p. 24–35, 2018.
- EATON, D. L. et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. SUPPL.2, p. 1–125, 2008.
- EC (EUROPEAN COMMISSION). Final Renewal report for the active substance chlorpyrifos. **Chlorpyrifos SANTE/11938/2019 Rev 1**, 2019.
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. **EFSA Journal**, v. 17, n. 8, 2019.
- EIDELS R. JOHN O. WHITAKER, J. Screening of Insecticides in Bats from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 121, n. 2, p. 133–142, 2012.
- EIDELS, R. R.; WHITAKER JR, J. O.; SPARKS, D. W. Insecticide residues in bats and guano from Indiana. **Proceedings of the Indiana Academy of Science**, v. 116, n. 1, p. 50–57, 2007.
- ELMAZOU DY, R. H.; ATTIA, A. A.; EL-SHENAWY, N. S. Protective role of propolis against reproductive toxicity of chlorpyrifos in male rats. **Pesticide Biochemistry and**

- Physiology**, v. 101, n. 3, p. 175–181, 2011.
- EPA. Chlorpyrifos; Tolerance Revocations. **Federal Register / Vol. 86, No. 165 / Monday, August 30, 2021 / Rules and Regulations**, v. 86, n. 165, p. 21–42, 2021.
- EZZI, L. et al. Histopathological and genotoxic effects of chlorpyrifos in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 4859–4867, 2016.
- GEORGHIOU, G. P.; SAITO, T. **Management of resistance in arthropods**. New York: Plenum Press, 1983.
- GORE, A. C. Environmental Toxicant Effects on Neuroendocrine Function. v. 14, n. 2, p. 235–246, 2001.
- HOFFMASTER, E.; VONK, J.; MIES, R. Education to action: Improving public perception of bats. **Animals**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2016.
- HOSSAIN, M. A. et al. Toxic effects of chlorpyrifos on the growth, hematology, and different organs histopathology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 7, p. 0–7, 2022.
- HUANG, X.; CUI, H.; DUAN, W. Ecotoxicity of chlorpyrifos to aquatic organisms: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, n. May, 2020.
- IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 8 ago. 2021.
- JEBALI, J. et al. Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: utility in the assessment of aquatic environment contamination. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 13, n. 4, p. 525–537, 2013.
- JOLY, C. A. et al. 1º Diagnóstico Brasileiro de Biodiversidade & Serviços Ecossistêmicos. **1º Diagnóstico Brasileiro de Biodiversidade & Serviços Ecossistêmicos**, 2019.
- KETCHUM, J. M.; BOWMAN, E. J.; ISALES, C. M. Male sex hormones, aging, and inflammation. **Biogerontology**, v. 24, n. 1, p. 1–25, 2023.
- KHAN, I. A. et al. Effects of phosphorothionate on the reproductive system of male rats. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 36, n. 4, p. 445–456, 2001.
- KHAN, I. A. et al. Acute and sub-acute effects of 2-butenic acid-3-(diethoxy phosphinothioyl) methyl ester (RPR-II) on testis of albino rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 40, n. 2, p. 162–168, 2002.
- KUNZ, T. H. et al. Ecosystem services provided by bats. **Annals of the New York**

**Academy of Sciences**, v. 1223, n. 1, p. 1–38, 2011.

KWONG, T. C. Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology.

**Therapeutic Drug Monitoring**, v. 24, n. 1, p. 144–149, 2002.

LOBOVA, T. A.; GEISELMAN, C. K.; MORI, S. A. **Seed dispersal by bats in the Neotropics**. The Bronx, New York: New York Botanical Garden Press, 2009.

MARA (MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL AFFAIRS OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA). **The Ministry of Agriculture Announcement No. 2032**.

Disponível em:

<[http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219\\_3718683.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/ZZYGLS/201312/t20131219_3718683.htm)>.

MARIGOUDAR, S. R. et al. Comparative toxicity of chlorpyrifos: Sublethal effects on enzyme activities and histopathology of *Mugil cephalus* and *Chanos chanos*.

**Chemosphere**, v. 211, p. 89–101, 2018.

MENZIES, A. K. et al. Metabolic rate, latitude and thermal stability of roosts, but not phylogeny, affect rewarming rates of bats. **Physiology and Behavior**, v. 164, p. 361–368, 2016.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. **Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis**. Washington, DC: Island Press, 2005.

MISHRA, A. K.; GOPESH, A.; SINGH, K. P. Acute toxic effects of chlorpyrifos on pseudobranchial neurosecretory system, brain regions and locomotory behavior of an air-breathing catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch 1794). **Drug and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 670–679, 2022.

MUSCARELLA, R.; FLEMING, T. H. The role of frugivorous bats in tropical forest succession. **Biological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 573–590, 2007.

OYAGBEMI, A. A. et al. Polyphenol-Rich Fraction of *Parquetina nigrescens* Mitigates Dichlorvos-Induced Cardiorenal Dysfunction Through Reduction in Cardiac Nitrotyrosine and Renal p38 Expressions in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 15, n. 3, p. 269–284, 2018.

PATIL, V. K.; DAVID, M. Oxidative stress in freshwater fish, *Labeo rohita* as a biomarker of malathion exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 12, p. 10191–10199, 2013.

PMRA (PEST MANAGEMENT REGULATORY AGENCY). Update on the Re-evaluation of Chlorpyrifos. **Re-evaluation Note. REV2021-02**, v. 20, n. May, 2021.

RAWLINGS, N. C.; COOK, S. J.; WALDBILLIG, D. EFFECTS OF THE PESTICIDES

- CARBOFURAN, CHLORPYRIFOS, DIMETHOATE, LINDANE, TRIALLATE, TRIFLURALIN, 2,4- D, AND PENTACHLOROPHENOL ON THE METABOLIC ENDOCRINE AND REPRODUCTIVE ENDOCRINE SYSTEM IN EWES. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, n. October 2013, p. 37–41, 2010.
- RICHARDSON, J. R. et al. Neurotoxicity of pesticides. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 3, p. 343–362, 2019.
- SANDOVAL-HERRERA, N. et al. Common insecticide affects spatial navigation in bats at environmentally-realistic doses. **bioRxiv preprint**, p. 1–31, 2022.
- SANDOVAL-HERRERA, N. et al. Non-destructive methods to assess pesticide exposure in free-living bats. **Science of the Total Environment**, v. 870, n. February, 2023.
- SAULSBURY, M. D. et al. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. **Toxicology**, v. 259, n. 1–2, p. 1–9, 2009.
- SCHANZER, S. et al. Analysis of pesticide and persistent organic pollutant residues in German bats. **Chemosphere**, v. 305, n. April, p. 135342, 2022.
- SCHMIDT, A. et al. Bioaccumulation of pesticides in bats from Missouri. **ACS Symposium Series**, v. 771, n. November 2000, p. 8–21, 2001.
- SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.
- THIES, M. L.; MCBEE, K. Cross-placental transfer of organochlorine pesticides in mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 239–242, 1994.
- THIES, M. L.; THIES, K.; MCBEE, K. Organochlorine pesticide accumulation and genotoxicity in mexican free-tailed bats from Oklahoma and New Mexico. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 178–187, 1996.
- TORQUETTI, C. G.; GUIMARÃES, A. T. B.; SOTO-BLANCO, B. Exposure to pesticides in bats. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 142509, 2021a.
- TORQUETTI, C. G.; GUIMARÃES, A. T. B.; SOTO-BLANCO, B. Exposure to pesticides in bats. **Science of the Total Environment**, v. 755, 2021b.
- TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the l-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 851, n. 1–2, p. 51–70, 2007.

- UBAID UR RAHMAN, H. et al. A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. **Science of the Total Environment**, v. 755, p. 142649, 2021.
- UMOSEN, A. J. et al. Alleviating effects of melatonin on oxidative changes in the testes and pituitary glands evoked by subacute chlorpyrifos administration in Wistar rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 645–650, 2012.
- VAHIDIRAD, M. et al. Protective effect of captopril against diazinon induced nephrotoxicity and neurotoxicity via inhibition of ROS-NO pathway. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 287–293, 2018.
- VENEROSI, A. et al. Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos. **NeuroToxicology**, v. 33, n. 6, p. 1420–1426, 2012.
- VENTURA, C. et al. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 156, p. 1–9, 2016.